

А.А.Чиркин, Е.О.Данченко

**БИОХИМИЯ С ОСНОВАМИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

*Учебно-методический комплекс
для студентов биологического факультета*

УДК 577.1:613(075.8)
ББК 28.707:51.204.)я73
Ч

Авторы: зав. кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М.Машерова» доктор биологических наук, профессор **А.А.Чиркин** и профессор кафедры химии УО «ВГУ им. П.М.Машерова» доктор медицинских наук, доцент **Е.О.Данченко**

Рецензенты: зав. кафедрой биохимии Белорусского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор **А.Д.Таганович**, и зав. кафедрой физики Витебской государственной академии ветеринарной медицины, доктор биологических наук **А.Д.Наумов**

Учебно-методический комплекс содержит теоретический материал по биохимии с основами молекулярной биологии для студентов 3-го курса биологического факультета, обучающихся по специальностям «Биология. Химия» и «Биоэкология». Материалы комплекса будут полезны для других студентов, магистрантов и аспирантов биологического факультета.

УДК 577.1:613(075.8)
ББК 28.707:51.204.)я73

© Чиркин А.А., Данченко Е.О., 2006
© УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2006

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	6
Базовая программа дисциплины «Биохимия с основами молекулярной биологии»	7
Литература	12
Глава 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ	14
1.1. Определение	14
1.2. Признаки живой материи и происхождение жизни	14
1.3. Основные разделы и направления в биохимии	16
1.4. История биохимии	16
1.5. Общие представления о химическом составе живых организмов	17
Глава 2. БЕЛКИ: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ	19
2.1. Функции и классификации белков	19
2.2. Характеристика и классификации аминокислот	22
2.3. Физико-химические свойства белков	25
2.4. Первичная структура	26
2.5. Вторичная структура белка	29
2.6. Третичная структура	33
2.7. Четвертичная структура	34
2.8. Взаимосвязь структуры и функции	34
2.9. Специфичность белков	37
2.10. Самосборка белков	38
2.11. Количественное определение белков	39
2.12. Методы выделения индивидуальных белков	40
2.13. Протеомика	42
Глава 3. ФЕРМЕНТЫ	43
3.1. Характеристика ферментов	43
3.2. Классификация и номенклатура ферментов	45
3.3. Структурная организация ферментов	46
3.4. Функциональная организация ферментов	46
3.5. Механизм действия ферментов	48
3.6. Кинетика ферментативных реакций	50
3.7. Регуляция активности ферментов	55
3.8. Единицы измерения активности ферментов	57
3.9. Применение ферментов	57
Глава 4. МЕМБРАНЫ. ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ	58
4.1. Структура мембран	58
4.2. Модели строения мембран	63
4.3. Механизмы мембранного транспорта	63
Глава 5. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ	67
5.1. Функции метаболизма и определения	67
5.2. Регуляция метаболизма	68
5.3. Качественная и количественная оценка метаболизма	70
5.4. Компоненты пищи	71
5.5. Экология питания беспозвоночных	72
5.6. Экология питания позвоночных	72
5.7. Экологические проблемы запасаения и распределения пищевых молекул	73
Глава 6. БИОЭНЕРГЕТИКА	74

6.1. Аккумуляторы энергии в организме	75
6.2. Дыхательные цепи митохондрий	80
6.3. Окислительное фосфорилирование	85
6.4. Окислительные системы, не связанные с запасанием энергии	89
6.5. Свободно-радикальное окисление	92
Глава 7. ОБЩИЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА	94
7.1. Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата	94
7.2. Цикл трикарбоновых кислот	97
7.3. Биологическая роль общего пути катаболизма	99
Глава 8. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ	101
8.1. Функции и строение углеводов	101
8.2. Глюкоза как важнейший метаболит углеводного обмена	104
8.3. Гликолиз	104
8.4. Брожение	111
8.5. Пентозофосфатный путь обмена углеводов	113
8.6. Глюконеогенез	117
8.7. Синтез и распад гликогена	120
8.8. Метаболизм гексоз	127
Глава 9. ФОТОСИНТЕЗ	129
9.1. Фотосинтезирующий структуры	130
9.2. Фазы фотосинтеза	131
9.3. Пигменты фотосинтеза	131
9.4. Характеристика фотосистем	133
9.5. Механизм световой стадии фотосинтеза	134
9.6. Темновая фаза фотосинтеза	135
9.7. Бескислородные фотосинтезирующие организмы	138
9.8. Бесхлорофилльный фотосинтез	138
9.9. Хемосинтез	138
Глава 10. ОБМЕН ЛИПИДОВ	139
10.1. Общая характеристика липидов	139
10.2. Эйкозаноиды	141
10.3. Транспорт липидов	143
10.4. Окисление жирных кислот	147
10.5. Окисление глицерола	151
10.6. Синтез кетоновых тел	152
10.7. Синтез холестерина	154
10.8. Синтез жирных кислот	157
10.9. Метаболизм триацилглицеролов и фосфолипидов	162
Глава 11. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ	165
11.1. Транспорт аминокислот	165
11.2. Аминокислотный фонд организма	167
11.3. Типичные реакции обмена аминокислот	168
11.4. Трансаминирование	169
11.5. Дезаминирование аминокислот	170
11.6. Источники и пути обезвреживания аммиака в организме	173
11.7. Биологическая фиксация молекулярного кислорода	178
11.8. Декарбоксилирование аминокислот	180
11.9. Превращение углеродного скелета аминокислот	182

11.10. Метилирование и трансметилирование	184
11.11. Метаболизм фенилаланина и тирозина	187
11.12. Обмен нуклеотидов	190
Глава 12. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	195
12.1. Структура нуклеиновых кислот	195
12.2. Виды и функции РНК	201
Глава 13. МАТРИЧНЫЕ СИНТЕЗЫ	204
13.1. Репликация	204
13.2. Транскрипция	210
13.3. Биосинтез белка (трансляция)	215
13.4. Регуляция биосинтеза белка	220
13.5. Генная инженерия: технология рекомбинантных ДНК	222
Глава 14. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ГОРМОНЫ	225
14.1. Общая характеристика гормонов	226
14.2. Классификация гормонов	227
14.3. Характеристика рецепторов и механизмы действия гормонов	228
14.4. Гормоны гипоталамуса и гипофиза	232
14.5. Регуляция обмена белков, жиров и углеводов	234
14.6. Регуляция анаболических процессов, связанных с ростом и морфогенезом	245
14.7. Регуляция обмена воды и минеральных солей	255
14.8. Гормоны растений	262
Глава 15. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ВИТАМИНЫ	265
15.1. Определение и классификации	265
15.2. Количественное определение витаминов	266
15.3. Жирорастворимые витамины	268
15.4. Водорастворимые витамины	274
15.5. Витаминоподобные вещества	290
15.6. Взаимосвязь обмена веществ	293
Программные вопросы по биохимии с основами молекулярной биологии	297

Введение

Учебно-методический комплекс «Биохимия с основами молекулярной биологии» предназначен для студентов биологического факультета университетов по специальностям «Биология. Химия» и «Биоэкология». Такое сочетание специальностей не является случайным по следующим причинам:

1. Объем и содержательная часть дисциплины в соответствии с базовыми программами достаточно близки.

2. Для преподавателя биологии и химии в связи со структурой химического 12-летнего образования в школе потребуются введение профессионально ориентированного компонента, в том числе и межпредметного курса по выбору «Основы биохимии» (Рахманов С.К. и соавт. Проект Концепции химического образования в общеобразовательной школы с 12-летним сроком обучения //Хімія: проблеми викладання. – 2006. - № 11. – С.13-36). Поэтому, наряду с материалом общей биохимии студенту следует дать возможность ознакомиться с вопросами эволюционной, экологической и прикладной биохимии.

3. Для биоэколога необходимо не только изучить вопросы общей биохимии, но и получить знания по молекулярным основам взаимодействия живого организма с окружающей средой, иметь представления по биохимии растений, животных и человека, знать молекулы-мишени для действия эндогенных и экзогенных повреждающих факторов, биохимические механизмы защиты и биохимические проявления региональных и индустриальных патологий.

В данном учебно-методическом комплексе обобщен 5-летний опыт использования координированного преподавания студентам-биологам и студентам-биоэкологам 3-го курса дисциплины «Биохимия с основами молекулярной биологии».

Для удобства работы с учебно-методическим комплексом использованы следующие приемы изложения материала: 1) в базовой программе *курсивом* напечатаны фрагменты, дополнительно необходимые студентам-биоэкологам; 2) при изложении теоретического материала широко использован метод стратификации материала по пунктам; 3) основные термины приведены *курсивом*; 4) мелким шрифтом приведен материал для ознакомления.

Учебно-методический комплекс завершается перечнем программных вопросов для итогового контроля.

Авторы надеются, что предлагаемый учебнометодический комплекс окажется полезным для студентов очной и заочной форм обучения. Все замечания будут приняты с благодарностью.

Базовая программа дисциплины «Биохимия с основами молекулярной биологии»

Учебно-методический комплекс «Биохимия с основами молекулярной биологии» предназначен для студентов биологического факультета очной формы обучения по специальностям 1-02 04 04 Биология. Дополнительная специальность 1-02 04 04-01 Биология. Химия и по специальности 1-33 01 01 Биоэкология. Специализация 1-33 01 01 01 Общая экология. Заочная форма обучения: специализация 1-33 01 01 02 Охрана природы и рациональное использование природных ресурсов.

Программа по биологической химии с основами молекулярной биологии составлена с ориентацией на конечный результат обучения студентов на биологическом факультете. В соответствии с этим ставится следующая цель: научить студента применять при изучении последующих дисциплин и при профессиональной деятельности преподавателя сведения о химическом составе и молекулярных процессах живых организмов в состоянии нормы, а также в типичных ситуациях при изменениях параметров внутренней и внешней среды. В соответствии с этим программа составлена таким образом, что дается переход от химической организации к функциональной биохимии, а затем к прикладным ее разделам. Программа основана на учебно-исследовательском принципе изучения предмета.

Цель и задачи изучения дисциплины

Цель изучения дисциплины: формирование целостной системы знаний о химическом составе организма, превращениях химических веществ в тесной связи с функциями организма.

Задачи дисциплины

В результате усвоения этой дисциплины обучаемый должен **знать**

- химический состав и молекулярные основы функционирования биологических объектов;
- регуляцию путей метаболизма органических веществ в связи с жизнедеятельностью организмов;
- основные пути катаболизма и анаболизма низкомолекулярных биорегуляторов и биополимеров;
- источники энергетического и пластического обеспечения метаболизма в живых системах и особенности регуляции;
- основные биохимические понятия и термины;
- *химизм взаимоотношений биологических систем с окружающей средой.*

В результате усвоения этой дисциплины обучаемый должен **уметь**:

- подготовить образцы для биохимического анализа;
- оценивать состав основных органических веществ и ферментов биологических объектов;
- пользоваться приемами анализа полученных результатов на основе карты метаболизма;
- пользоваться справочниками для анализа процессов жизнедеятельности;
- составить план биохимического анализа для исследования взаимосвязей структуры и функций биологических объектов;
- *использовать пути метаболизма органических молекул в клетке для раскрытия механизмов отношений биологических систем друг с другом и с окружающей средой;*
- выполнять биохимические анализы с использованием общедоступного лабораторного оборудования и знания правил техники безопасной работы;

- обрабатывать данные биохимических экспериментов и лабораторных исследований биологического материала.

Весь материал разбит на 6 следующих разделов.

В соответствии с утвержденным учебным планом для биологического факультета на преподавание биологической химии с основами молекулярной биологии выделяется следующее количество часов:

Факультет, специальность, специализация	Всего часов	Аудиторные часы	Лекции	Лабораторные занятия	Проектирование	Итоговый контроль
Биологический, 1-02 04 04-01	195	140	66	74	Курсовая работа	Экзамен
Биологический, 1-33 01 01 01	180	126	70	56	Дипломная Работа	Экзамен
Биологический, 1-33 01 01 02	126	36	20	16	Дипломная работа	Экзамен

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

ВВЕДЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКУЮ ХИМИЮ

Предмет и задачи биологической химии с основами молекулярной биологии. Важнейшие этапы развития биохимии и молекулярной биологии. Место биохимии и молекулярной биологии в биологическом и *экологическом* образовании. Важнейшие разделы (статическая – биоорганическая химия, динамическая – метаболизм и функциональная биохимия) и направления (в зависимости от вида изучаемого объекта живой природы) биохимии. *Питание, окружающая среда и генотип – основные факторы влияния на жизнедеятельность организмов. Экологическая и популяционная биохимия.* Биохимия индивидуума и протеомика.

1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Основные химические компоненты живых организмов.

Белки, структура и функции

Белки как важнейший компонент живой ткани. Функции белков. Элементарный состав белков. Гидролиз белков. Аминокислоты – структурные мономеры белков. Строение и уровни организации белков. Простые и сложные белки, представители, краткая характеристика. Способность к специфическим взаимодействиям – основа биологических функций всех белков. Физико-химические свойства белков. Схема и методы выделения и очистки белков. Количественное определение суммарных и индивидуальных белков. Искусственный синтез пептидов и белков; *возможность загрязнения окружающей среды.*

1.3. Ферменты. Сходство и различия химических и биологических катализаторов. Специфичность действия ферментов, ее виды. Номенклатура и классификация ферментов. Характеристика классов ферментов. Единицы измерения количества и активности ферментов. Структурно-функциональная организация ферментов. Простые (однокомпонентные) и сложные (двухкомпонентные) белки-ферменты. Кофакторы – ионы металлов, органические соединения витаминной и невитаминной природы. Функциональная организация ферментов. Активный центр, его строение. Аллостерический центр, его значение. Механизм действия ферментов. Стадии ферментативного процесса, их характеристика. Кинетика ферментативного катализа, ее задачи. Уравнение Михаэлиса-Ментен. Способы графического изображения. Константы диссоциации (K_s) и Михаэлиса (K_m), их определение и

значение. Уравнение Лайнуивера-Берка. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента, pH среды, температуры. Влияние активаторов и ингибиторов на ферментативную реакцию. Полиферментные комплексы, значение организации ферментов в них. Множественные молекулярные формы ферментов. Изоферменты, их роль. Применение ферментов. Источники получения ферментов. Использование ферментов в разных областях народного хозяйства. *Экология человека и ферменты*. Ферменты как аналитические реагенты.

1.4. Введение в обмен веществ. Биохимия питания. *Питание, метаболизм и выделение продуктов метаболизма как этапы обмена веществ в рамках концепции взаимосвязей организмов в экосистемах*. Состав пищи человека. Энергетическая и биологическая ценность пищи. Молекулярные механизмы переваривания веществ в желудочно-кишечном тракте. Гниение белков в толстом кишечнике, механизмы обезвреживания продуктов гниения. Микрофлора кишечника – источник витаминов. Катаболизм и анаболизм как две стороны метаболизма, их стадии и взаимосвязь. Понятие о карте метаболизма. Основные конечные продукты метаболизма. Методы изучения обмена веществ.

1.5. Строение и функции клеточных мембран. Структурно-биохимическая организация клетки. Модели молекулярной организации мембран. Способы транспорта веществ через мембраны. Биохимия межклеточных взаимодействий. *Вызванные экологическими факторами заболевания, связанные с первичным нарушением мембран*. Липосомы и протеолипосомы как способ введения веществ в клетки.

Энергетический обмен. Экзергонические и эндергонические реакции. Термодинамическая шкала химических веществ, макроэргические соединения. Сопряжение эндергонических и экзергонических реакций. АТФ как важнейший аккумулятор и источник энергии. Молекулярно-структурная организация митохондрий. Дыхательная цепь. Термодинамические закономерности последовательности переносчиков и каскадные изменения свободной энергии при переносе электронов. Структура основных переносчиков и химизм переноса электронов. Окислительное фосфорилирование, его количественное выражение – коэффициент P/O. Сопряжение дыхания и фосфорилирования. Характеристика хемиосмотической гипотезы Митчела. Трансмембранный электрохимический потенциал как промежуточная форма запасаения энергии при окислительном фосфорилировании; механизм его образования. Строение и функции протонной АТФ-синтазы. Дыхательный контроль. *Разобщение и ингибирование окислительного фосфорилирования как важная проблема экологии*. Терморегуляторная функция тканевого дыхания. Молекулярные моторы.

Микросомальное окисление. Биологическая роль монооксигеназных систем митохондрий. *Роль диоксигеназной системы в обезвреживании ароматических соединений*. Свободнорадикальное окисление в клетках. Радикальные формы кислорода. Цепные реакции пероксидного окисления, возможность прекращения процесса путем обезвреживания радикалов. Проксиданты и антиоксиданты. Роль радикальных форм кислорода в физиологии и патологии клетки, в окислении ненасыщенных жирных кислот в биомембранах (пероксидное окисление липидов). Обезвреживание пероксида водорода, образующегося в реакциях окисления. Нарушения энергетического обмена: гипоксические и гипоэнергетические состояния.

1.6. Общие пути катаболизма. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: последовательность реакций, строение пируватдегидрогеназного комплекса. Цикл трикарбоновых кислот: последовательность реакций и характеристика ферментов. Связь между метаболитами общего пути катаболизма и цепями переноса электронов в митохондриях. Аллостерические

механизмы регуляции. Витамины и витаминоподобные вещества, производные которых выполняют коферментную роль в общих путях катаболизма; *биохимические основы повышения биологической ценности пищи путем введения сбалансированного поливитаминного комплекса.*

2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

2.1. Основные углеводы пищи и организмов животных. Переваривание углеводов и всасывание продуктов переваривания. Глюкоза как важнейший метаболит углеводного обмена. Общая схема источников и путей расходования глюкозы в организме. Ключевая роль глюкозо-6-фосфата в метаболизме углеводов. Гликоген как резервный полисахарид животных, его свойства. Синтез гликогена, химизм процесса. Мобилизация гликогена: гидролитический и фосфоролитический пути. Регуляция мобилизации гликогена. Взаимоотношения между ферментами синтеза и распада гликогена. Роль протеинкиназ и цАМФ в синхронизации этих процессов. Катаболизм глюкозы. Анаэробный и аэробный пути распада глюкозы, их общая характеристика. Анаэробный гликолиз, гликолитическая оксидоредукция. Субстратное фосфорилирование АДФ. Спиртовое брожение. Метаболизм этанола в организме, понятие об эндогенном этаноле. Пути обезвреживания этанола. Энергетический баланс аэробного и анаэробного окисления глюкозы. Аллостерические механизмы регуляции аэробного гликолиза – эффект Пастера. Глюконеогенез. Обходные реакции необратимых стадий гликолиза. Регуляторные ферменты глюконеогенеза, биологическая роль процесса. Взаимосвязь гликолиза в мышечной ткани с глюконеогенезом в печени – цикл Кори (глюкозо-лактатный цикл). Органы, поставляющие глюкозу в кровь (кишечник, печень, почки) и органы, потребляющие глюкозу. Пентозофосфатный путь превращения углеводов, химизм процесса; окислительные и неокислительные реакции. Функции. Роль НАДФН и фосфорибизилпирофосфата. Взаимосвязь пентозофосфатного пути с гликолизом и фотосинтезом. Представление о строении и функциях углеводной части гликолипидов и гликопротеинов. Нейраминаовая кислота. Фотосинтез. *Бесхлорофильный фотосинтез. Фотосинтез и действие экологических факторов.*

2.2. Функции липидов в живых системах. Важнейшие липиды тканей. Резервные липиды. Структурные липиды. Церамиды. Гликолипиды, цереброзиды, ганглиозиды; биологическая роль. Ферментативный гидролиз липидов. Условия, необходимые для переваривания липидов. Экзогенный и эндогенный транспорт липидов в организме. Состав и строение транспортных липопротеиновых комплексов, место образования. Липопротеинлипаза, активаторы, функция. Резервирование и мобилизация жиров в жировой ткани, регуляция этих процессов. Окисление глицерола. Активация жирных кислот, транспорт ацил-КоА в митохондрии, роль карнитина. Окисление жирных кислот, энергетика и биологическое значение процессов. Синтез высших жирных кислот. Синтез ненасыщенных жирных кислот; незаменимые жирные кислоты пищи. Синтез триацилглицеролов и фосфолипидов, их общие этапы, локализация. Представление о синтезе сфингофосфолипидов. Роль ацетил-КоА в биосинтезе кетонных тел, холестерина и жирных кислот. Прямой и обратный транспорт холестерина. Белки, переносящие эфиры холестерина. Накопление холестерина в организме как одна из ведущих причин старения и смерти (атеросклероз). *Радиационно-экологические дислипидопроteinемии и радиационно-индуцированный атеросклероз у населения Беларуси.*

2.3. Азотистый баланс, его состояния. Факторы, влияющие на удовлетворение потребности организма в белках. Переваривание белков. Основные транспортные системы для всасывания аминокислот. Катаболизм белков в тканях. Катапепсины. *Белки*

*теплового шока. Ингибиторы протеолиза. Судьба аминокислот в печени и тканях. Перенос аминокислот через мембраны клеток. Общая схема источников и путей расходования аминокислот в тканях. Превращения аминокислот по аминокруппе. Трансаминирование. Виды дезаминирования аминокислот. Декарбоксилирование аминокислот. Образование и обезвреживание биогенных аминов. Метилирование и трансметилирование как пути превращения аминокислот по радикалу. Реакции гидроксирования на примере превращений фенилаланина. Наследуемые дефекты обмена фенилаланина и тирозина (дефекты гидроксилаз и диоксигеназ). Отличия аминокислотного состава животных и растительных тканей. Растительные и животные белки в питании. Биосинтез заменимых аминокислот. Эволюция типов азотистого обмена по конечному продукту (аммонотелический, урикотелический, уреотелический типы). Аммиак как конечный продукт превращения азотсодержащих соединений у млекопитающих, источники его образования. Обезвреживание аммиака. Глюкозо-аланиновый цикл. Общее (конечное) обезвреживание аммиака путем синтеза мочевины и аммонийных солей, химизм процессов. *Обмен аминокислот и экология человека и животных.**

2.4. Представление о синтезе пуриновых нуклеотидов. Происхождение атомов пуринового скелета. Синтез пиримидиновых нуклеотидов, роль оротовой кислоты. Ключевая роль фосфорибозилпирофосфата в синтезе нуклеотидов. Аллостерические механизмы регуляции синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

2.5. Взаимосвязь обмена белков, углеводов, липидов. Понятие о коррекции обмена веществ метаболитами, низкомолекулярными биорегуляторами и биополимерами.

3. ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ И БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

3.1. Нуклеиновые кислоты, структура и функции

3.2. Синтез нуклеиновых кислот и белков (матричные синтезы). Репликация, ее механизм и биологическое значение. Стадии процесса. ДНК-полимеразы, их функции. Деление клеток, циклины и репликация. Биосинтез РНК (транскрипция), ее механизм и значение. ДНК-зависимая РНК-полимераза. Структурно-функциональная ориентация транскриптона (оперона). Посттранскрипционная модификация РНК (сплайсинг, процессинг, фолдинг). Обратимость транскрипции (ретровирусы). Синтез белков (трансляция), необходимые компоненты процесса. Регуляция биосинтеза белков. Индукция и репрессия синтеза полипептидных цепей. Активаторы и ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и белков, их использование (антибиотики) *и связь с экологическими факторами внешней среды. Мутации и мутагены. Онкогенные вирусы. Онкогены. Протоонкогены и механизм их превращения в онкогены. Механизм действия онкогенов. Полипептидные факторы роста и биохимические механизмы их действия. Факторы роста и онкогены. Полиморфизм белков. Варианты гемоглобина, некоторых ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и белков (изоформы гаптоглобина) в зависимости от территории проживания. Введение в генную инженерию: технология рекомбинантных ДНК.*

4. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

4.1. Витамины, их биохимические функции. Классификация и номенклатура. Функции витаминов. Витамины как внутриклеточные регуляторы метаболизма. Водорастворимые витамины. Жирорастворимые витамины. Витаминоподобные соединения, их роль в организме. Авитамины, характеристика, важнейшие

представители, их строение, влияние на обмен веществ, роль в молекулярных механизмах взаимодействий в экосистемах. Витамины и питание.

4.2. Общие механизмы регуляции метаболизма. Гормоны и гормоноподобные вещества, их характеристика. Гормоны как дистантные регуляторы клеточного метаболизма. Трансгипофизарный и паргипофизарный пути регуляции выработки гормонов. Классификации гормонов. Гидрофильные и липофильные гормоны, механизмы их действия. Гипоталамус – место трансформации электрического сигнала ЦНС в химические биорегуляторы – рилизинг-факторы. Тропные гормоны гипофиза и их значение в регуляции функции периферических желез. Проопиокортин и образование гормонов, эндорфинов и энкефалинов. Нейрогормоны – окситоцин и вазопрессин. Гормоны периферических эндокринных желез: йодтиронины, паратгормон, кальцитонин, адреналин, инсулин, глюкагон, глюкокортикоиды, минералокортикоиды, половые гормоны: строение, биосинтез, регуляция, недостаточность и избыток гормонов. Гормоноподобные биорегуляторы. Эйкозаноиды. *Феромоны и другие дистантные регуляторы в экосистемах.*

4.3. Минеральные вещества тканей человека и животных. Регуляция электролитного состава и объема внеклеточной жидкости вазопрессином, альдостероном, атриальным натрий-уретическим фактором. Макро- и микроэлементы. Региональные патологии (кариес, эндемический зоб, недостаточность селена). *Эволюционно отобранные и сохраняемые параметры водносолевого обмена у высших организмов являются мишенью для действия неблагоприятных экологических факторов.*

5. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Молекулярные процессы базальной жизнедеятельности клеток, тканей, органов и молекулярные процессы специфических функций клеток, тканей, органов как результат дифференциальной активности хроматина. Биохимические технологии оценки базальной и специфической активности клеток (оценка фенотипа, метаболитов). Биохимия различных систем органов: нейро-эндокринной, движения, пищеварения, дыхания, кровообращения, выделения, размножения.

6. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Место биохимии в экологических исследованиях. Молекулярные механизмы взаимосвязей в природных экологических системах. Антропогенные и техногенные воздействия. Общие представления о биохимических механизмах адаптации живых организмов к среде. Молекулярные механизмы гибели клеток методами апоптоза и некроза. Защитные системы организма. Развитие патологии в случае превышения мощности защитных механизмов действием неблагоприятных экологических факторов.

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М., Медицина, 1998.
2. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1998.
3. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1989
4. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Агар, Флинта, Лань, 1999
5. Чиркин А.А. Практикум по биохимии. Учебное пособие. Минск: ООО «Новое знание», 2002.

6. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия: теоретические основы, задания, ситуационные задачи. Витебск: УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2005.
7. Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки (в 3-х томах). М.: Мир, 1994.
8. Марри Р. и др. Биохимия человека (в 2-х томах). М.: Мир, 1993, 2004.
9. Ленинджер А. Основы биохимии (в 3-х томах). М.: Мир, 1986.
10. Страйер Л. Биохимия (в 3-х томах). М.: Мир, 1984.
11. Уайт А. и др. Основы биохимии (в 3-х томах). М.: Мир, 1981.
12. Харбери Д. Введение в экологическую биохимию. М.: Мир, 1985.

Дополнительная литература

1. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов, М.: МГУ, 1985
2. Доценко М.Л., Данченко Е.О., Чиркин А.А. Основы гепатологии. Учебное пособие. Витебск: ВГМУ, 2003.
3. Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. М.: Медицина, 1981.
4. Лопухин Ю.М. и др. Холестериноз. М.: Медицина, 1983.
5. Северин Е.С., Николаев А.Я. (ред.) Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.
6. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и синтез белка. М.: Высшая школа, 1986.
7. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1982.
8. Чиркин А.А., Прищепа И.М., Дударев А.Н. Основы ксенобиологии. Учебное пособие. Витебск: УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2004.
9. Чиркин А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК. УМК. Витебск: УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2005.
10. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990.
11. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000.
12. Тепперман Дж., Тепперман Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М.: Мир, 1989.
13. Campbell P.N., Smith A.D. Biochemistry Illustrated. Second Edition. ELBS, 1992, 288 p.
14. Ganten D., Ruckpaul K. (eds) Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Berlin Heidelberg New York: "Springer-Verlag", 2006, vol. 1,2. 4180 p.
15. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Harper's Biochemistry, twenty-third edition. Appleton and Lange, 1993, 806 p.
16. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. N.-Y.: "Worth Publishers", 2000, 1152 p.
17. Stryer L. Biochemistry. Fourth edition. W.H. Freeman and Company, 1995, New York, 1064 p.

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ

1.1. Определение. Биологическая химия – наука о химическом строении и функциях веществ, входящих в состав живой материи, и их превращениях в процессах жизнедеятельности. Совокупность этих превращений в постоянной взаимосвязи с окружающей средой обеспечивает функционирование живых организмов в условиях сбалансированности процессов синтеза и распада веществ в клетках и тканях.

Биохимия изучает химию живой природы в широком диапазоне: от человека и позвоночных до бактерий и вирусов.

В зависимости от объекта исследований условно выделяют: 1) биохимию микроорганизмов; 2) биохимию простейших; 3) биохимию растений; 4) биохимию животных (ветеринарную биохимию); 5) биохимию человека.

1.2. Признаки живой материи и происхождение жизни

Выделяют следующие основные признаки живой материи: 1) способность к метаболизму; 2) сложность, высокий уровень структурной организации живой материи. Единицей биологической активности организма считается клетка: молекулы → мембраны, субклеточные органеллы → клетки → ткани → органы → организм; 3) изменчивость – способность к самостоятельному реагированию на воздействие окружающей среды изменением химического состояния и функционирования; 4) способность к точному воспроизведению за счет передачи наследственной информации.

Жизнь на планете существует в виде особой оболочки – *биосферы*. Известны три основных идеи происхождения жизни на Земле.

1. Идея *панспермии*, согласно которой жизнь, представляет собой явление космического масштаба (Г. Гельмгольц, С. Аррениус, В.И. Вернадский, У. Томпсон). Появление ее на Земле объясняется проникновением на планету зародышей, постоянно путешествующих в космическом пространстве.

2. Идея *абиогенеза* (Э. Геккель) связывает проблему происхождения жизни на Земле путем образования сложных органических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) из простых в отсутствие живых существ. В XX веке была доказана принципиальная возможность абиогенного синтеза достаточно сложной биоорганики (С. Миллер, С. Фокс), в эксперименте были созданы модели протобионтов (коацерваты А.И. Опарина и Д. Холдейна, микросферы С. Фокса).

3. Создание теории *самоорганизующихся систем* на основе неравновесной термодинамики И. Пригожина. Согласно этой теории представляется возможным образование упорядоченных (высоко информатизированных) макромолекул из неупорядоченной массы вещества-предшественника с использованием механизмов матричного синтеза и естественного отбора. Узловые моменты развития жизни.

1. Предполагается, что при возрасте планеты в 4,5-4,6 млрд. лет пригодные для жизни водоемы появились 4,0-3,8 млрд. лет тому назад. В этот период в абиогенных условиях функционируют отбирающиеся, самосохраняющиеся и изменяющиеся в

сторону увеличения сложности организации системы *гиперциклы* (по М. Эйгену). Для них реальны автокатализ (самовоспроизведение), закономерные взаимопереходы высоко- и низкоэнергетических соединений (круговороты энергии и вещества), принципиальная перспектива повышать свою сложность на основе вновь создаваемой информации. На основании этих процессов могли сложиться основные атрибуты жизни – самовоспроизведение, самоорганизация, наследственность, случайная (мутационная) изменчивость, естественный отбор.

2. Появление *прокариот* 3,1 млрд. тому назад знаменует оформление жизни как проявление биосферы. В этот период возникают хемо- и фотоавтотрофы, гетеротрофы, детритофаги. Происходит стабилизация интенсивности мутационного процесса на уровне 10^{-5} - 10^{-7} мутаций на 1 locus ДНК за поколение. Названный уровень сохраняется и сегодня от кишечной палочки до человека. Благодаря чрезвычайной точности при репликации генома человека, включающего $3 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар, возможно примерно 3 информационных искажения (мутации) на реплицирующийся геном. В это же время формируются: 1) системы репаративного синтеза ДНК; 2) системы формирования нативной структуры белков и выбраковки молекул с неправильной трехмерной структурой с помощью белков теплового шока (шаперонов) и протеолиза убиквитин-меченых аномальных белков.

3. В интервале 1,9-1,7 млрд. лет тому назад концентрация кислорода в атмосфере Земли превысила 1% (*точка Пастера*), что позволило развивать механизмы аэробного гликолиза и тем самым поднять биоэнергетику живых организмов на качественно новый уровень. В это время развивались специализированные органеллы – митохондрии, которые стали не только «энергетическим сердцем» клетки, но и инициатором ее запрограммированной гибели методом апоптоза.

4. Период в интервале 2,0-1,5 млрд. лет тому назад – время становления *эукариотических организмов*. Произошло количественное и качественное увеличение возможности накопления информации в ДНК ядер клеток: если геном прокариот содержит в среднем 10^5 - 10^6 пар нуклеотидов, то у одноклеточных эукариот дрожжей - 10^7 пар нуклеотидов, а у млекопитающих и птиц - 10^8 - 10^9 пар нуклеотидов.

5. В интервале 600-540 млн. лет тому назад появляются многоклеточные организмы. Развиваются механизмы, контролирующие *частичное* использование информации ДНК: 1) ДНК в ядрах клеток упаковывается в виде хромосом; 2) возникают диплоидные формы жизни; 3) в различных клетках одного и того же организма при наличии в них одной и той же ДНК за счет функционирования разных участков ДНК (2-10% от всей ДНК) обеспечивается специализация функций. Это период оптимизации соотношений биоэнергетики организмов и их размеров, формирования межклеточных и межтканевых способов нервной и гуморальной регуляции.

6. В периоде 495-445 млн. лет тому назад эволюционно формируются группы позвоночных, для которых на первое место выходят проблемы видоспецифичности, что и привело к появлению системы иммунитета для контроля клеточного и белкового состава организмов.

7. При появлении сухопутных животных (354-290 млн. лет тому назад) и млекопитающих (250-200 млн. лет тому назад) произошла стабилизация величины удельного потребления энергии – 800000 кДж/г живой массы/жизнь. По названному параметру среди млекопитающих человек является исключением – для него эта норма в 4 раза выше.

Согласно В.Н. Ярыгину (2002) в основе эволюции лежит *приспособительное свойство* живых форм. *Адаптация* – это структурная, функциональная или поведенческая особенность живой системы, повышающая ее шансы на успех в

соответствующем местообитании. Выделяют четыре типа адаптаций, различающихся по уровню реализации и обеспечиваемому результату. Поведенческие адаптации реализуются на уровне целостного организма и обуславливают выживание в определенной среде и использование ее ресурсов; анатомические реализуются на уровне структур и обеспечивают заданный образ жизни; физиологические адаптации реализуются на уровне жизненных функций, приводя к соответствию организма условиям среды обитания; *биохимические адаптации реализуются на уровне метаболических функций, гарантируя реальность аналогичных функциональных отклонений в различающихся условиях среды жизни.* Отсюда здоровье, мерой которого является жизнеспособность, является интегральным показателем приспособительного потенциала (генеральная адаптация) живого существа.

1.3. Основные разделы и направления в биохимии:

1. Статическая биохимия – изучает химическую природу организма (биоорганическая химия).

2. Динамическая биохимия – изучает превращения химических веществ в организме (метаболизм).

3. Функциональная биохимия – изучает роль превращений химических веществ в организме в проявлении функций клеток, тканей, органов, организма.

Выделяют определенные разделы биохимии по направлениям исследований: техническая биохимия (молекулярные основы хлебопечения, сыроварения, виноделия и пр.); медицинская биохимия (биохимические процессы в организме человека в норме и при патологии), эволюционная биохимия (эволюция обмена веществ в рамках эволюции живых организмов); квантовая биохимия (изучает квантово-физические характеристики метаболитов и их превращений в живом организме); энзимология (изучает структуру, свойства и механизм действия ферментов) и др.

Нарушение здоровья и развитие заболеваний через нарушение метаболизма может быть вызвано следующими факторами: 1) физическими агентами (механическая травма, экстремальная температура, изменение давления, радиация, электрический шок); 2) химическими агентами и лекарствами (токсины, лекарства); 3) биологическими агентами (вирусы, риккетсии, бактерии, грибы, паразиты); 4) гипоксией (кровопотеря, нарушение транспорта кислорода кровью, отравление дыхательными ядами); 5) генетическими факторами; 6) иммунологическими реакциями (анафилаксия, аутоиммунные заболевания); 7) дисбалансом питания (недостаточное и избыточное питание); 8) эндокринным дисбалансом (дефицит и избыток гормонов).

1.4. История биохимии

Выделяют пять периодов в истории развития биохимических знаний.

Первый период – с древних времен до XV века (эпоха Возрождения) – это период практического использования биохимических процессов без знания их

теоретических основ: получение лекарств из биологических объектов, пивоварение, хлебопечение, виноделие.

Второй период – от эпохи Возрождения до середины XIX века – период накопления биохимических знаний и становления науки. Леонардо да Винчи открыл, что живой организм способен существовать только в такой атмосфере, в которой *может гореть пламя*. М.В. Ломоносов писал, что органы животных и растений состоят из более мелких частичек, и именно из неорганических. Биохимия как отдельная наука стала выделяться в начале XIX века. В 1828 году Вёлер продемонстрировал, что мочевины может быть синтезирована в лаборатории из неорганического вещества. Спустя семьдесят лет Э.Бухнер показал, что экстракты дрожжевых клеток переваривают крахмал так же эффективно, как и живые дрожжевые клетки. Обе эти работы нанесли существенный удар по витализму. В 50-х гг. XIX в. М.Бертло удалось синтезировать целый ряд органических соединений, свойственных живой природе. М.Шеврель заложил основы химии липидов. Нуклеиновые кислоты были выделены в 1869 г. Ф.Мишером.

Третий период в истории биохимии, начинающийся со второй половины XIX века, ознаменовался выделением биохимии как самостоятельной науки. К этому периоду относится деятельность А.Я.Данилевского, предсказавшего полипептидную теорию структуры белков, выдвинувшего идею об обратимости действия ферментов и создавшего первую в России кафедру биохимии в Казанском университете. Целые направления в биохимии открыли М.В.Ненцкий (биосинтез мочевины, строение гемоглобина), Н.И.Лунин (витамины), Э.Фишер (свойства аминокислот и открытие пептидной связи), О. Варбург, А.Н.Бах и В.И. Палладин (биологическое окисление), А.Гарден и В. Ионг (открытие НАД), Ф.Кнооп (бета-окисление жирных кислот), Д.Самнер и Д.Нортроп (выделение ферментов в виде кристаллов), Г.Кребс (описание первых биохимических циклов – синтез мочевины, 1932 год и цикл трикарбоновых кислот, 1937 год), В.А.Энгельгардт и М.В. Любимова (АТФ, сопряжение дыхания и фосфорилирования), А.Е.Браунштейн и М.Г.Крицман (трансаминирование) и др. Это был период накопления и первичной систематизации знаний.

Четвертый период начался в 40-50-х годах XX в. и связан с бурным развитием биохимии благодаря внедрению новых физических, физико-химических и компьютерных методов исследования. Перутц, Кендрию, Полинг широко применяли методы рентгеноструктурного анализа при исследовании биомолекул, Д.Уотсон и Ф.Крик предложили модель строения ДНК, А.Н.Белозерский использовал нуклеотидный состав ДНК как таксономический признак, А.С.Спирин и П.Доти описали вторичную и третичную структуры рибосомальной ДНК, М.Ниренберг, С.Очоа, Г.Корана расшифровали генетический код, П.Митчелл сформулировал хемиосмотическую теорию окислительного фосфорилирования и др. Биохимия прошлого века решила две важнейшие задачи – 1) создание карты метаболизма и 2) расшифровка генома живых организмов.

Биохимия 21 века, вероятно *пятый период* развития биохимии, будет посвящена характеристике каждого живого организма путем использования методологии *протеомики*, т.е. науки об индивидуальных особенностях белкового состава живого организма.

1.5. Общие представления о химическом составе живых организмов

В живых организмах присутствует более 70 химических элементов. В.И.Вернадский в книге «Биосфера» (1926) писал, что жизнь теснейшим

образом связана с химическим строением земной коры. Высказано предположение, что химический состав живых организмов может явиться таксономическим признаком.

Существует определенная зависимость между распространением элементов в биосфере, их биологической ролью и положением в периодической системе Менделеева. Вещества живых организмов более чем на 99% состоят из элементов первых трех периодов этой системы. Как правило, при переходе от легких к тяжелым элементам в пределах одной и той же подгруппы (например, $\text{Zn} \rightarrow \text{Cd} \rightarrow \text{Hg}$) возрастает токсичность элементов и одновременно уменьшается содержание их в биомассе. Высокой биологической активностью обладают многие соединения переходных металлов, к которым относятся элементы 4-го периода (с 21 по 30): Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn и др., поскольку они способны к образованию комплексов, играя в них роль центральных атомов. Элементы некоторых подгрупп периодической системы могут в той или иной степени заменять друг друга в биологических процессах (например, кальций и барий, хлор и бром). Одним из последствий глобальной катастрофы – аварии на Чернобыльской атомной электростанции – оказалось проявление биологического антагонизма элементов в парах цезий – калий, стронций – кальций, трансураниевые элементы – железо.

Около 98% массы биосферы составляют четыре элемента – водород, кислород, углерод и азот. Они легко спаривают электроны и образуют прочные ковалентные связи. Малые размеры атомов этих элементов также способствуют образованию коротких, прочных химических связей. Молекулы с такими связями более устойчивы к действию физических и химических факторов. Большое значение имеет также способность перечисленных элементов образовывать кратные связи (двойные, тройные), благодаря чему они превосходят многие элементы по числу и разнообразию соединений с уникальными свойствами.

В пересчете на сухую массу в организме человека содержится С – 50%, О – 20%, Н – 10%, N – 8,5%, Са – 4%, Р – 2,5%, К – 1%, S – 0,8%, Na – 0,4%, Cl – 0,4%, Mg – 0,1%, Fe – 0,01%, Mn – 0,001%, J – 0,00005%. При недостатке йода и фтора в воде и пище возникают гипотиреоз (эндемический зоб) и кариес зубов. При недостатке железа – железодефицитная анемия.

Элементы-органогены (С, О, N, H, P, S) образуют две группы органических веществ живых организмов – *биополимеры* и *низкомолекулярные биорегуляторы*.

По химическому составу тело человека и животных включает 5 основных классов веществ (для человека массой 65 кг): 1) белки 11 кг (17%); 2) жиры 9 кг (13,8%); 3) углеводы 1 кг (1,5%); 4) вода 40 кг (61,6%); 5) минералы 4 кг (6,1%).

В составе организмов присутствуют карбоновые кислоты, углеводороды, амины, спирты альдегиды. Есть вещества, характерные только для растительных тканей: эфирные масла, алкалоиды, дубильные вещества. В отдельные группы должны быть выделены вещества, присутствующие в тканях живых организмов в небольших количествах, но играющих первостепенную роль в регуляции обмена веществ: гормоны, витамины, антибиотики, фитонциды, ферменты и др.

Глава 2. БЕЛКИ: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ

Белки являются наиболее важными органическими молекулами живой материи. Белки встречаются в различных частях клетки животных и составляют около 50% сухого остатка клетки; в растениях содержится меньшее количество белков – 20-35%. Белки являются структурной и функциональной основой жизни. Термин «protein» происходит от греч. слова «proteios» (первичный). Берцелиус предложил называть протеинами группу органических веществ, наиболее важных для жизни. Мульдер в 1838 г. использовал термин протеин для высокомолекулярных азотсодержащих и наиболее распространенных веществ, присутствующих у животных и растениях.

Белки являются линейными неразветвленными полимерами построенными из аминокислот. Информация о структуре белка закодирована в ДНК. Все живые организмы используют 20 идентичных аминокислот и, за некоторым исключением, имеют одинаковый генетический код.

2.1. Функции и классификации белков

Функции белков могут быть разделены на 2 группы: 1) *Структурные функции.* Основными структурными белками являются *коллаген, эластин, α-кератин* и др. (формируют соединительную ткань). 2) *Динамические функции* выполняют белки: ферменты, гормоны, факторы свертывания крови, иммуноглобулины, мембранные рецепторы, резервные белки, сократительные белки, дыхательные белки и др.

Белки преимущественно состоят из 5 главных элементов: С – 50-55%, Н – 6-7,3%, О – 19-24%, N – 13-19%, S – 0-4%. Кроме вышеперечисленных, белки могут содержать также другие элементы такие как Р, Fe, Cu, I, Mg, Zn и др. Содержание азота, как правило, постоянно и составляет 16%.

Различные ткани отличаются по *содержанию белков*. В пересчете на сухую массу в селезенке содержится 84% белков, в легких – 82%, в мышцах – 80%, в костях – 24-28%.

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков. К белкам относятся *полипептиды с молекулярной массой выше 6-12 кДа*. Для определения молекулярной массы белков в настоящее время используют методы *гель-хроматографии, диск-электрофореза и аналитического ультрацентрифугирования*.

В таблице 2.1. приведена классификация белков по их *основным функциям*.

Таблица 2.1.

Классификация белков по функции

Функция	Характеристика
Ферменты или катализаторы, активаторы и ингибиторы ферментов	Для белков-ферментов характерна высокая степень структурирования молекулы, благодаря чему возможен катализ химической реакции в области активного центра и регуляция активности фермента через взаимодействие эффекторов с аллостерическим центром. Известны белки-активаторы (<i>апопротеин AI, CII</i>) и ингибиторы (<i>ингибиторы трипсина из поджелудочной железы, соевых бобов; ингибиторы протеиназ из яда гадюки, ингибитор химотрипсина из картофеля</i>).
Гормоны	Как правило, белки (м.м. 20-30 кДа), которые содержат небольшие фрагменты определяющие гормональную активность; относятся к группе непроникающих в клетку гормонов, на поверхности клеток взаимодействуют с рецепторами, гормональный эффект реализуется через внутриклеточные посредники (<i>гормоны гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной железы, паращитовидных желез, кальцитонин</i>).
Регуляторные белки	<i>Гистоны</i> стабилизируют структуру ДНК и регулируют функционирование генома (проявление матричной активности ДНК при ослаблении связей с гистонами); гетерогенная группа <i>негистоновых белков</i> (м.м. 5-200 кДа) участвует в формировании нуклеосом и взаимодействии с хроматином гормон-рецепторных комплексов, в регуляции процессов репликации, транскрипции и трансляции, белки теплового шока (стрессовые белки), G-белки регулирующие синтез циклических нуклеотидов, онкобелки и антионкобелки определяющие малигнизацию клетки.
Защитные белки	<i>Антитела (иммуноглобулины)</i> вырабатываются в ответ на введение антигенов, белки системы <i>свертывания крови</i> , белки системы <i>комплемента</i> , ферменты <i>обезвреживания ксенобиотиков</i> , <i>интерфероны</i> , <i>интерлейкины</i> , <i>лизоцимы</i> , <i>белки-антифризы</i> , <i>антивирусные белки растений</i> , <i>антибактериальные белки насекомых</i> .
Токсические белки	Высокомолекулярные белковые токсины микроорганизмов и растений представлены тремя типами белков. Мультимерные <i>дифтерийный и холерный токсины, токсин шигеллы</i> (AB ₅ протеины) построены из одной субъединицы типа А (20, 28 и 32 кДа соответственно) и пяти субъединиц типа В (25, 12 и 7,7 кДа соответственно); субъединицы В связываются с клеточной поверхностью, а субъединица А проникает внутрь клетки, где блокирует синтез белков на рибосомах. Аналогично действуют растительные токсины – <i>рицин, абрин, модецин, лектин</i> . <i>Энтеротоксин</i> стафилококка или <i>гемолизин</i> кишечной палочки, встраиваясь в плазматическую мембрану, образуют в ней поры, через которые теряются важные компоненты цитоплазмы клеток. <i>Токсины ядов змей</i> представлены малыми белками – 6,7-7 кДа (примерно 60 аминокислотных остатков). <i>Токсические пептиды</i> ядов скорпиона, пчелы и осы состоят в среднем из 45 аминокислотных остатков. Эти токсины связываются с холинэргическими белками и оказывают нейротоксическое действие.

Транспортные белки	<i>Альбумины и глобулины</i> – переносчики различных веществ в плазме крови. <i>Порины</i> – образуют в каналах поры для переноса веществ через клеточные мембраны. <i>Транслоказы</i> – обеспечивают обмен компонентами различных компартментов клеток.
Структурные белки	<i>Структурные белки мембран</i> являются их структурными компонентами, склонны к агрегации и специфическим взаимодействиям (процессы самосборки), содержат в своем составе до 20% гидрофобных аминокислотных остатков и до 40% приходится на долю α -спиральных участков. Эти белки легко взаимодействуют с фосфолипидами мембран. Структурные функции выполняют также белки межклеточного матрикса (<i>коллаген, ретикулин, кератин</i>), <i>кристаллины, белки ядерного матрикса, белки цитоплазматического скелета</i> .
Сократительные белки	Участвуют в механическом сокращении для осуществления движения (обладают, как правило, аденозинтрифосфатазной активностью): <i>актин и миозин</i> мышц, белки <i>центральных и периферических фибрилл</i> жгутиков и ресничек простейших, жгутиков сперматозоидов, <i>тубулин аппарата</i> движения хромосом в процессе митоза, <i>миксомиозин</i> – нитевидный белок из плазмодия гриба физариума и др.
Рецепторные белки	Во внутренней среде организма служат для взаимодействия с молекулами-биорегуляторами. Локализуются в мембранных структурах клеток, а также могут быть в растворенном состоянии. Клетка, содержащая рецептор, является клеткой-мишенью для управляющего химического сигнала, а также для взаимодействия с липопротеинами или вирусами. Для восприятия сигналов внешней среды известны фоторецепторные белки (<i>опсин</i>), для оценки вкуса <i>сладкочувствительный белок</i> , для восприятия запаха <i>обонятельный белок</i> , для восприятия звука <i>холинорецепторные белки</i> ; в жизнедеятельности живых организмов важное место занимает рецепция феромонов, аттрактантов, репеллентов, стрессогенных веществ ран.

Классификация по химической природе и растворимости является наиболее распространенной. Она основана на аминокислотном составе, структуре, размере и растворимости. Различают 2 группы: простые и сложные (конъюгированные).

1. *Простые белки* (альбумин, кератин и др.) состоят только из аминокислот и делятся на:

а) *фибрилярные белки* имеют палочкообразную форму, нерастворимы в воде и физически прочные. Они выполняют структурные и защитные функции.

б) *глобулярные белки* представляют собой компактные сферические молекулы, водорастворимы. Глобулярные белки выполняют динамические функции (ферменты, иммуноглобулины и транспортные белки гемоглобин и альбумин).

2. *Сложные (конъюгированные)* белки состоят из простого белка комбинированного с небелковым компонентом. Небелковая часть

называется *простетической группой* (или конъюгированной группой). Белок без простетической группы называется *апопротеином*. Белковая часть с простетической группой называется *холопротеином*. Простетическая группа играет ключевую роль в *функционировании белка*.

Кроме этого, выделяют группу белков, которая образуется в результате денатурации или деградации простых и конъюгированных белков.

Классификация на основе биологической (пищевой) ценности белков определяется наличием незаменимых аминокислот. Согласно этой классификации белки делятся на 3 группы:

1. *Полноценные белки* – содержат 10 незаменимых аминокислот в необходимых пропорциях для обеспечения нормального роста (например, яичный белок, казеин молока).

2. *Частично полноценные белки*. Эти белки содержат сниженное количество одной или более незаменимых аминокислот и могут обеспечивать только умеренный рост (например, белок пшеницы и риса содержат недостаточное количество лизина, триптофана).

3. *Неполноценные белки*. Эти белки не содержат одну или более незаменимых аминокислот. Не могут обеспечить нормальный рост организма (например, желатин не содержит аминокислоту триптофан).

2.2. Характеристика и классификации аминокислот

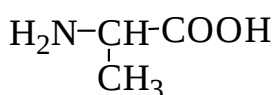
Аминокислоты являются *структурной единицей белков*. Аминокислоты содержат *аминогруппу* ($-\text{NH}_2$), *карбоксильную группу* ($-\text{COOH}$), *атом водорода и боковую цепь*, связанную с α -углеродным атомом. Одна из 20 аминокислот, пролин, является, иминокислотой ($-\text{NH}-$), остальные 19 являются α -аминокислотами.

В природе выявлено около 300 аминокислот. Из них 20 являются стандартными (протеиногенными) аминокислотами, которые обнаружены в структуре белков, полученных из различных организмов – животных, растений и микроорганизмов.

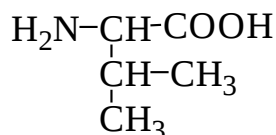
Существует несколько классификаций аминокислот, основанные на структуре и химической природе, заменимости, путях метаболизма и т.д.

Классификация аминокислот по полярности радикалов:

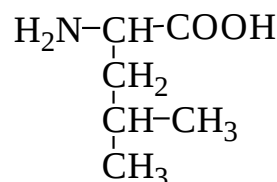
1. *Неполярные аминокислоты* (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин). Эти аминокислоты гидрофобны. Имеют незаряженный радикал.



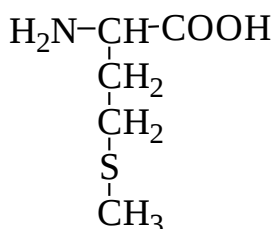
Аланин (Ала)



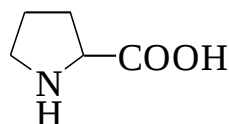
Валин (Вал)



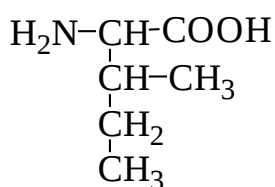
Лейцин (Лей)



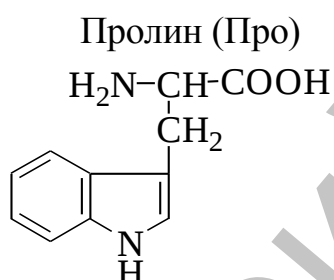
Метионин (Мет)



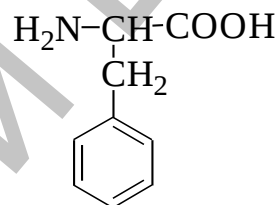
Пролин (Про)



Изолейцин (Иле)

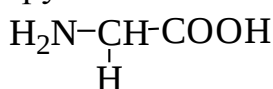


Триптофан (Три)

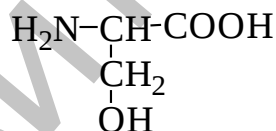


Фенилаланин (Фен)

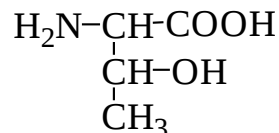
2. *Полярные, гидрофильные, незаряженные аминокислоты* (глицин, треонин, цистеин, тирозин, серин, аспарагин, глутамин). Содержат такие полярные функциональные группы как гидроксильная, сульфгидрильная и амидогруппа.



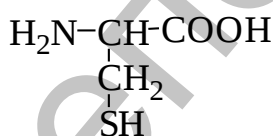
Глицин (Гли)



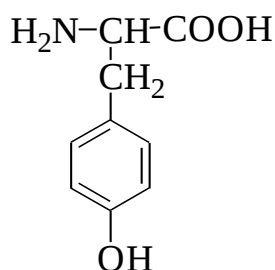
Серин (Сер)



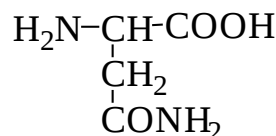
Треонин (Тре)



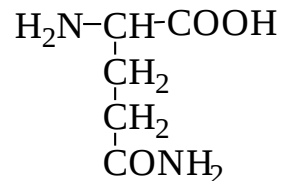
Цистеин (Цис)



Тирозин (Тир)

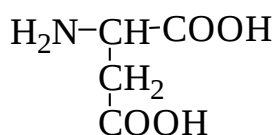


Аспарагин (Асн)

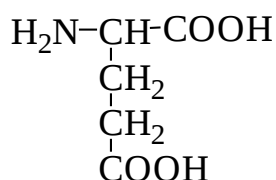


Глутамин (Глн)

3. *Кислые аминокислоты* (отрицательно заряженные аминокислоты) имеют отрицательный заряд (аспартат, глутамат) при pH 7,0

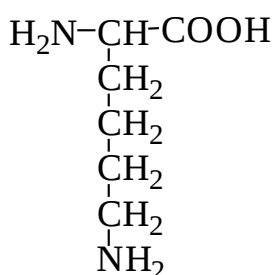


Аспарагиновая
кислота (Асп)

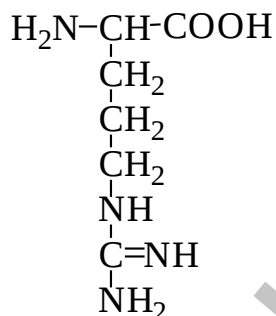


Глутаминовая
кислота (Глн)

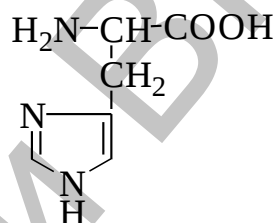
4. Основные аминокислоты (положительно заряженные аминокислоты) имеют положительный заряд при pH 7,0.



Лизин (Лиз)



Аргинин (Арг)



Гистидин (Гис)

Аминокислоты классифицируются на заменимые и незаменимые (эссенциальные).

1. *Незаменимые* (эссенциальные) аминокислоты не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей. Они необходимы для обеспечения и поддержания роста: аргинин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин.

2. *Заменимые аминокислоты*. Организм может синтезировать около 10 аминокислот для обеспечения биологических потребностей, поэтому поступление их с пищей не обязательно (аланин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамат, глутамин, глицин, пролин, серин, тирозин).

Углеродный скелет аминокислот является предшественником для *синтеза глюкозы или гликогена* (гликогенные аминокислоты: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, метионин, пролин, серин, треонин, валин, цистеин), *липидов* (кетогенные аминокислоты: лейцин) или *глюкозы и липидов* (гликогенные и кетогенные аминокислоты – изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан, тирозин)

Кроме 20 стандартных аминокислот, присутствующих в составе белков, существуют аминокислоты, имеющие важное биологическое значение.

1. *Производные аминокислот*. 20 стандартных аминокислот могут включаться в белки из-за универсальности генетического кода. Некоторые из них подвергаются специфической модификации после биосинтеза

белка. Эти производные аминокислот являются важными для структуры и функции белка. Например, коллаген содержит гидроксипролин и гидроксизин; гистоны – метилированные, фосфорилированные и ацетилированные аминокислоты.

2. *Непротеиногенные аминокислоты* не обнаруживаются в составе белков, но выполняют важные функции в организме. Например, орнитин, цитруллин являются промежуточными метаболитами в биосинтезе мочевины.

3. *D-аминокислоты*. Аминокислоты животных и растений являются L-аминокислотами. D-аминокислоты обнаружены в антибиотиках или в бактериальных стенках.

2.3. Физико-химические свойства белков

1. *Растворимость*. Белки формируют коллоидные растворы, что обусловлено размером частиц (размеры частиц 0,1-0,001 мкм). Для растворов белков характерны следующие характеристики: низкое осмотическое давление, высокая вязкость, низкая способность к диффузии. В лабораторной практике используют 2 свойства коллоидных растворов белков: нефелометрическое определение количества белка на основе эффекта Тиндаля; диализ – очистка белков от низкомолекулярных примесей.

2. *Амфотерность белков*. Белки обладают кислыми и основными свойствами из-за присутствия карбоксильных и аминогрупп. Изoeлектрическая точка белков (pI) – значение pH, при котором суммарный заряд белка равен нулю. В pI белок электронейтрален, поэтому обладает минимальной растворимостью, максимальной преципитацией и наименьшей буферной способностью. Изoeлектрическая точка определяется количеством NH_2 и COOH групп в молекуле белка. Если количество NH_2 и COOH групп равны, pI лежит в слабокислой среде (ионизация карбоксильных групп несколько выше, чем аминных) при $\text{pH} \leq 7$. Если количество $\text{NH}_2 > \text{COOH}$, то pI лежит в щелочной среде. Если количество $\text{NH}_2 < \text{COOH}$, то pI лежит в кислой среде. При $\text{pH} > \text{pI}$ заряд белка всегда отрицательный, так как карбоксильные группы переходят в форму COO^- , а аминные группы в форму NH_2 . При $\text{pH} < \text{pI}$ заряд белка положительный, т.к. при уменьшении pH все больше аминогрупп переходит в форму NH_3^+ , а диссоциация карбоксильных групп подавляется.

3. *Способность к осаждению (преципитации)*. Белки существуют в коллоидном растворе из-за наличия заряда и гидратации полярных групп. Белки могут быть преципитированы путем дегидратации или нейтрализации полярных групп.

Преципитация в pI. Белки мало растворимы в изoeлектрической точке. Например, белок молока казеин сворачивается, если молоко кислое.

Это объясняется тем, что молочная кислота, образуемая бактериями снижает рН, приближая его к изоэлектрической точке казеина (рI 4,6).

Высаливание. Процесс преципитации добавлением нейтральных солей (сульфата аммония или сульфата натрия) называется *высаливанием*. Этот процесс объясняется дегидратацией молекул белков солями, что приводит к молекулярной агрегации и преципитации. Количество соли, необходимой для преципитации зависит от молекулярной массы белка. Чем больше молекулярная масса белка, тем меньше соли необходимо для преципитации. Например, глобулины сыворотке осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония, в то время как альбумин – насыщенным раствором. Высаливание используется для разделения белков сыворотки крови. Добавление незначительного количества нейтральных солей повышает растворимость белков.

Осаждение солями тяжелых металлов. Ионы тяжелых металлов (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) вызывает осаждение белков. Металлы имеют положительный заряд и в щелочной среде вызывают преципитацию белков.

Осаждение анионами или алкалоидными реактивами. Белки осаждаются трихлоруксусной кислотой, сульфосалициловой кислотой, пикриновой кислотой, таниновой кислотой. Белки являются катионами и добавление анионов кислот приводит к комплексам белок-анион.

4. Электрофорез белков. В методе электрофореза белков сыворотки используют слабощелочные буферные растворы (т.е. $pH > pI$), чаще $pH = 8.6$. При этом белки заряжаются отрицательно и перемещаются к аноду. *Изоэлектрическое фокусирование.* Метод основан на том, что в изоэлектрической точке белок теряет заряд и теряет подвижность в электрическом поле. Трубку с гелем заполняют амфолинами, создающими градиент рН. В электрическом поле белок будет передвигаться до того значения, где он войдет в свое изоэлектрическое состояние и, потеряв заряд, остановится.

Белки являются полимерами, которые состоят из L- α -аминокислот. Различают 4 уровня структурной организации белка: *первичную, вторичную, третичную и четвертичную*.

2.4. Первичная структура

Первичная структура белка – *линейная специфическая* последовательность аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Пептиды и полипептиды состоят менее чем из 50 аминокислот, белки содержат более 50 аминокислот в пептидной цепи.

Пептидные связи образуются между α -аминогруппой одной аминокислоты и α -карбоксильной группой другой аминокислоты. При образовании пептидной связи выделяется молекула воды. Процесс

образования пептидной связи является *эндергоничным*, т.е. требует затраты энергии.

Характеристика пептидных связей:

- 1) *копланарность* – все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости (рис. 2.1);
- 2) атом водорода аминогруппы и атом кислорода карбонильной группы находятся в *транс*-положении;
- 3) связь между атомом углерода карбонильной группы и атомом азота имеет *частично двойной характер* из-за p, π -сопряжения (сопряжение свободной пары электронов атома азота с π -электронами двойной связи $C=O$), поэтому свободное вращение вокруг пептидной связи невозможно;
- 4) пептидная связь является ковалентной и стабильной связью.

Роль первичной структуры:

1. Последовательность аминокислот в первичной структуре белка определяет специфичность белка.
2. Первичная структура генетически детерминирована и воспроизводится в процессе транскрипции и трансляции.
3. Первичная структура белка является *основой* для формирования последующих структур белка за счет взаимодействия радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи.
4. Замена аминокислоты L-ряда на аминокислоту D-ряда может привести к полному *исчезновению биологической активности пептида*.

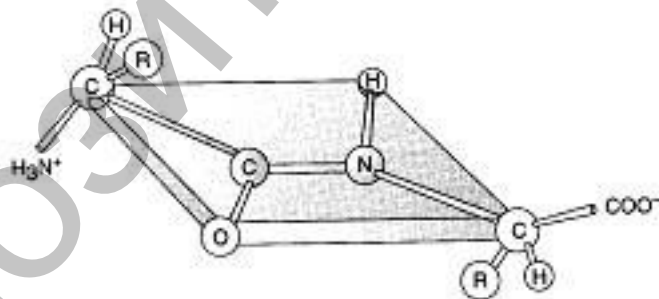
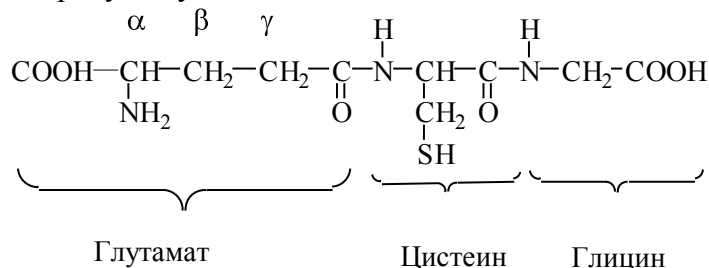


Рис. 2.1. Структура пептидной связи.

Пептид читается слева направо, начиная с аминокислоты, которая имеет свободную α -аминогруппу и заканчивается аминокислотным остатком, который имеет свободную α -карбоксильную группу. Для наименования пептида суффикс *-ин* (аланин), *-ан* (триптофан) и *-ат* (глутамат) заменяется на *-ил*, за исключением последней аминокислоты.

В живых организмах существуют *пептиды*, которые выполняют важные биологические функции. **Биологически активные пептиды состоят из менее, чем 10 аминокислот.**

1. *Глутатион* – трипептид, состоящий из γ -глутаминовой кислоты, цистеина и глицина и присутствует в клетке в восстановленной и окисленной форме.



Функции:

- кофермент для некоторых ферментов;
- предотвращает окисление сульфгидрильных групп (-SH) белков до дисульфидных (-S-S), что необходимо для функционирования белков и ферментов;
- восстановленная форма глутатиона предотвращает повреждение эритроцитов и защищает гемоглобин от окисления H_2O_2 ;
- глутатион необходим для транспорта аминокислот через мембраны эпителия кишечника и почек (γ -глутамильный цикл);
- глутатион является коферментом глутатионпероксидазы.

2. *Тиролиберин* – трипептид, секретируется гипоталамусом и стимулирует секрецию тиротропина в гипофизе.

3. *Окситоцин*. Синтезируется задней долей гипофиза и стимулирует сокращение матки. Состоит из 9 аминокислот.

4. *Вазопрессин* (антидиуретический гормон). Задерживает жидкость в организме и повышает артериальное давление. Состоит из 9 аминокислот, синтезируется задней долей гипофиза.

5. *Ангиотензины*. Ангиотензин I (декапептид) превращается в ангиотензин II (октапептид), вызывает сокращение сосудов.

6. *Брадикинин и каллидин* – нона- и декапептид, соответственно. Вызывают расслабление гладких мышц и являются продуктами протеолиза специфических α_2 -глобулинов плазмы. Поэтому эти пептиды содержат только протеиногенные аминокислоты. Могут образовываться в крови под действием яда змей.

7. *Грамицидин S* – антибиотик, синтезируемый *B. brevis*; является циклическим декапептидом, в составе которого, кроме протеиногенных аминокислот, имеется орнитин. Является ионофором, образуя в биологических мембранах каналы, образуют комплексы с ионами металлов.

8. *Аманитины* – токсичные октапептиды ядовитых грибов рода *Amanita*. Типичным представителем аманитинов является α -аманитин. Он блокирует синтез белка в клетках эукариот на стадии транскрипции. Замена в молекуле диоксиизолейцина на лейцин приводит к образованию нетоксичного соединения. В этих же грибах содержится ряд токсичных гептапептидов – *фаллоидинов*, имеющих сходное с аманитинами строение (бициклическое). Фаллоидины необратимо поражают печень млекопитающих. Роль противоядия фаллоидинам выполняет циклический декапептид – *антаманид*, содержащийся в тех же грибах, что и токсин.

В эволюционной биохимии особое внимание уделяется гомологичным (совпадающим) последовательностям аминокислот в анализируемых белках. Особая роль в структурном подобии белков принадлежит тождественным трипептидным группировкам, но в некоторых случаях находят совпадение в чередовании более обширных фрагментов. Так, Ю.Б.Филиппович (1999) сообщил, что в 52 рибосомных

белках тождественные трипептидные блоки повторяются 657 раз, тетрапептидные – 86 раз и пентапептидные – 11 раз. В ряде случаев первичные структуры различных белков включают половину или более тождественных пептидных фрагментов. Особенно близки по строению белки с одинаковой функцией. Например, у цитохромов, выделенных из сине-зеленых, красных и бурых водорослей, первичные структуры совпадают на 48-67%.

Полиморфизм белков - существование одного и того же белка в нескольких молекулярных формах, отличающихся по первичной структуре, физико-химическим свойствам и проявлениям биологической активности. Причинами полиморфизма белков являются рекомбинации и мутации генов. Изобелки - это множественные молекулярные формы белка, обнаруживаемые в пределах организмов одного биологического вида, как результат наличия более чем одного структурного гена в генофонде вида. Множественные гены могут быть представлены как множественные аллели или как множественные генные локусы.

Полиморфизм белков имеет следующее биологическое значение:

1) Полиморфизм белков в филогенезе - существование гомологичных белков у разных видов. У этих белков консервативными (неизменяемыми) остаются участки первичной структуры, отвечающие за функцию белка. Для замещения утраченных белков в организме человека используют такие гомологичные белки животных, в первичной структуре которых имеются минимальные различия (инсулин быка, свиньи, кашалота).

2) Полиморфизм белков в онтогенезе - существование гомологичных белков в разные отрезки жизненного цикла организма. У плода имеется гемоглобин F (фетальный гемоглобин, $\alpha_2\gamma_2$, имеет большое сродство к кислороду). После рождения он заменяется на гемоглобин A₁ ($\alpha_2\beta_2$).

3) Тканевой полиморфизм белков. Один и тот же фермент в разных клетках катализирует одну и ту же реакцию, но имеет отличия в первичной структуре - изоферменты. Изоферменты – это эволюционно закрепленные формы одного и того же фермента, приспособленные к функционированию в органах с отличающимися условиями протекания катализируемой химической реакции. Определение изоферментов в крови помогает диагностировать поражение определенной ткани.

4) Полиморфизм белков при патологии. Рассмотрим на примере множественных форм гемоглобинов. Они возникают в результате точечных мутаций, передаваемых по наследству. При этом чаще всего происходит замена кислой аминокислоты на основную или нейтральную:

в Нв С замена 6 глу в β -цепи на лиз;

в Нв Е замена 26 глу в β -цепи на лиз;

в Нв J замена 16 лиз в β -цепи на асп;

в Нв S замена 6 глу в β -цепи на вал;

В последнем случае возникает заболевание серповидно-клеточная анемия. Аномальные гемоглобины отличаются от нормального величиной заряда и электрофоретической подвижностью. Физико-химические изменения гемоглобинов сопровождаются нарушением транспорта кислорода.

2.5. Вторичная структура белка

Вторичная структура – способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру. Вторичная структура определяется первичной

структурой. Поскольку первичная структура генетически детерминирована, формирование вторичной структуры может происходить при выходе полипептидной цепи из рибосомы. Вторичная структура стабилизируется *водородными связями*, которые образуются между NH- и CO-группами пептидных связей.

Различают α -спираль, β -структуру и неупорядоченную конформацию (клубок).

Структура **α -спирали** была предложена *Pauling* и *Corey* (1951). Это разновидность вторичной структуры белка, имеющая вид регулярной спирали (рис. 2.2). α -Спираль – это палочкообразная структура, в которой пептидные связи расположены внутри спирали, а боковые радикалы аминокислот – снаружи. α -Спираль стабилизирована водородными связями, которые параллельны оси спирали и возникают между первым и пятым аминокислотными остатками. Таким образом, в протяженных спиральных участках каждый аминокислотный остаток принимает участие в формировании двух водородных связей.

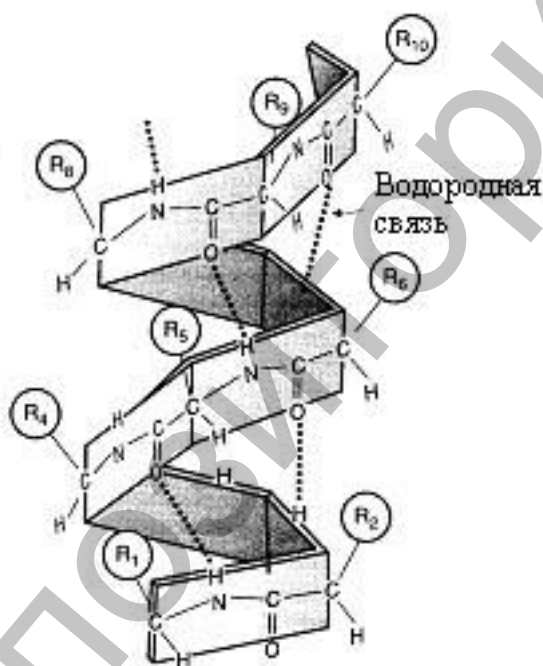


Рис. 2.2. Структура α -спирали.

На один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали 0,54 нм, на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Угол подъема спирали 26°. Период регулярности α -спирали равен 5 виткам или 18 аминокислотным остаткам. Наиболее распространены правые α -спирали, т.е. закручивание спирали идет по часовой стрелке. Образованию α -спирали препятствует пролин, аминокислоты с заряженным и объемными радикалами (электростатическое и механическое препятствие).

Другая форма спирали присутствует в **коллагене**. В организме млекопитающих коллаген – преобладающий в количественном отношении белок: он составляет 25% общего белка. Коллаген присутствует в различных формах, прежде всего, в соединительной ткани. Это левая спираль с шагом 0,96 нм и 3,3 остатка в каждом витке, более пологая по сравнению с α -спиралью. В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь невозможно. Коллаген имеет необычный аминокислотный состав: 1/3 составляет глицин, примерно 10% пролин, а также гидроксипролин и гидроксизин. Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путем посттрансляционной модификации. В структуре коллагена постоянно повторяется триплет гли-Х-У, причем положение Х часто занимает пролин, а У – гидроксизин. Имеются веские основания тому, что коллаген повсеместно присутствует в виде правой тройной спирали, скрученной из трех первичных левых спиралей. В тройной спирали каждый третий остаток оказывается в центре, где по стерическим причинам помещается только глицин. Вся молекула коллагена имеет длину около 300 нм.

β -Структура (β -складчатый слой). Встречается в глобулярных белках, а также в некоторых фибриллярных белках, например, фиброин шелка (рис. 2.3).

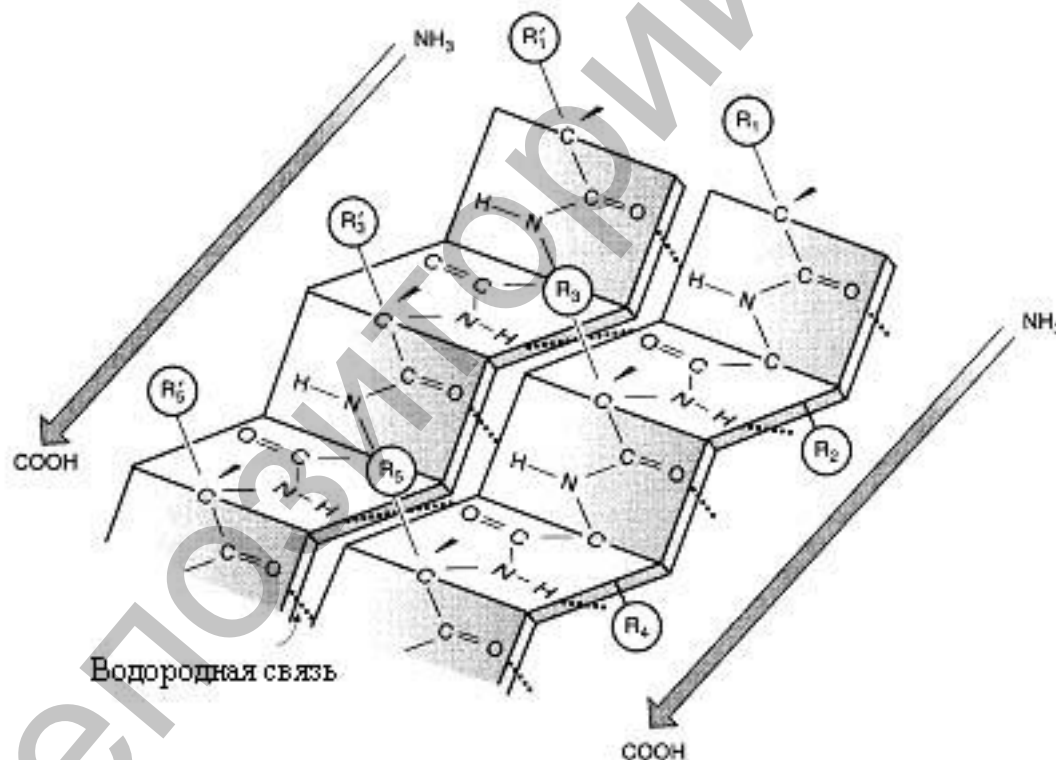


Рис. 2.3. β -Структура

Структура имеет *плоскую форму*. Полипептидные цепи почти полностью вытянуты, а не туго скручены, как в α -спирали. Плоскости пептидных связей расположены в пространстве подобно равномерным складкам листа бумаги. Стабилизируется водородными связями между СО- и NH-группами пептидных связей соседних полипептидных цепей. Если полипептидные цепи, образующие β -структуру идут в одном направлении (т.е. совпадают С- и N-концы) – *параллельная β -структура*;

если в противоположном – *антипараллельная β -структура*. Боковые радикалы одного слоя помещаются между боковыми радикалами другого слоя. Если одна полипептидная цепь изгибается и идет параллельно себе, то это *антипараллельная β -кросс-структура*. Водородные связи в β -кросс-структуре образуются между пептидными группами петель полипептидной цепи.

Содержание α -спиралей в белках, изученных к настоящему времени, крайне вариабельно. В некоторых белках, например, миоглобине и гемоглобине, α -спираль лежит в основе структуры и составляет 75%, в лизоциме – 42%, в пепсине всего 30%. Другие белки, например, пищеварительный фермент химотрипсин, практически лишены α -спиральной структуры и значительная часть полипептидной цепи укладывается в слоистые β -структуры. Белки опорных тканей коллаген (белок сухожилий, кожи), фиброин (белок натурального шелка) имеют β -конфигурацию полипептидных цепей.

Доказано, что образованию α -спирали способствуют глутамин, аланин, лейцин, а β -структуры – метионин, валин, илеуцин; в местах изгиба полипептидной цепи – глицин, пролин, аспаргин. Считают, что шесть сгруппированных остатков, четыре из которых способствуют образованию спирали, можно рассматривать как центр спирализации. От этого центра идет рост спиралей в обоих направлениях до участка – тетрапептида, состоящего из остатков, которые препятствуют образованию этих спиралей. При формировании β -структуры роль затравок выполняют три аминокислотных остатка из пяти, способствующие образованию β -структуры.

В большинстве структурных белков преобладает одна из вторичных структур, что предопределяется их аминокислотным составом. Структурным белком, построенным преимущественно в виде α -спирали, является α -кератин. Волосы (шерсть), перья, иглы, когти и копыта животных состоят главным образом из кератина. В качестве компонента промежуточных филаментов кератин (цитокератин) является важнейшей составной частью цитоскелета. В кератинах большая часть пептидной цепи свернута в правую α -спираль. Две пептидные цепи образуют единую левую *суперспираль*. Суперспирализованные димеры кератина объединяются в тетрамеры, которые агрегируют с образованием *протофибрилл* диаметром 3 нм. Наконец, восемь протофибрилл образуют *микрофибриллы* диаметром 10 нм.

Волосы построены из таких же фибрилл. Так, в отдельном волокне шерсти диаметром 20 мкм переплетены миллионы фибрилл. Отдельные цепи кератина скреплены поперечно многочисленными дисульфидными связями, что придает им дополнительную прочность. При химической завивке происходят следующие процессы: вначале путем восстановления тиолами разрушаются дисульфидные мостики, а затем для придания волосам необходимой формы их высушивают при нагревании. При этом за счет окисления кислородом воздуха образуются новые дисульфидные мостики, которые сохраняют форму прически.

Шелк получают из коконов гусениц тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и родственных видов. Основной белок шелка, *фиброин*, обладает структурой антипараллельного складчатого слоя, причем сами слои располагаются параллельно друг другу, образуя многочисленные пласты. Так как в складчатых структурах боковые цепи аминокислотных остатков ориентированы вертикально вверх и вниз, в промежутках между отдельными слоями могут поместиться лишь компактные

группировки. Фактически фиброин состоит на 80% из глицина, аланина и серина, т.е. трех аминокислот, характеризующихся минимальными размерами боковых цепей. Молекула фиброина содержит типичный повторяющийся фрагмент (гли-ала-гли-ала-гли-сер)_n.

Неупорядоченная конформация. Участки белковой молекулы, которые не относятся к спиральным или складчатым структурам, называют неупорядоченными.

Надвторичная структура. Альфа-спиральные и бета-структурные участки в белках могут взаимодействовать друг с другом и между собой, образуя ансамбли. Встречающиеся в нативных белках надвторичные структуры – энергетически наиболее предпочтительны. К ним относят суперспирализованную α -спираль, в которой две α -спирали скручены относительно друг друга, образуя левую суперспираль (бактериородопсин, гемэритрин); чередующиеся α -спиральные и β -структурные фрагменты полипептидной цепи (например, $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -звено по Россману, найдено в НАД⁺-связывающем участке молекул ферментов дегидрогеназ); антипараллельная трехцепочечная β -структура ($\beta\beta\beta$) называется β -зигзаг и обнаружена в ряде ферментов микроорганизмов, простейших и позвоночных.

2.6. Третичная структура

Третичная структура - способ укладки полипептидной цепи в *трехмерном пространстве*. По форме третичной структуры белки делятся на глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки имеют эллипсоидную форму, а фибриллярные – нитевидную, вытянутую форму (форма палочки, веретена). При образовании глобулярных белков гидрофобная часть полипептидной цепи располагается внутри структуры, а гидрофильная – снаружи. Третичная структура стабилизируется связями между *боковыми радикалами аминокислот*. К ним относятся *ковалентная* (дисульфидная) и *нековалентные* (водородные, ионные и гидрофобные).

Нативная структура белка. Многие белки в третичной структуре имеют спирализованные, складчатые и неупорядоченные сегменты. При этом в функциональном и структурном отношениях важно взаимное расположение аминокислотных радикалов. *Домены* – анатомически выделяемые участки третичной структуры белка, отвечающие за выполнение определенной функции белка. *Гидрофобные карманы* – полости в третичной структуре, выстланные радикалами гидрофобных аминокислот и необходимы для погружения в молекулу белка гидрофобных лигандов. *Гидрофобные кластеры* – участки поверхности белка, где сконцентрированы радикалы гидрофобных аминокислот и служат для взаимодействия с гидрофобными кластерами других молекул. Каждый белок в *нативном* состоянии имеет *уникальную трехмерную* структуру (*конформация* белка), в которой белок выполняет функцию.

Денатурация – разрушение третичной и частично вторичной структуры белка с сохранением первичной структуры, т.е. потеря нативной структуры.

1. В зависимости от степени денатурации потеря биологической активности может быть *частичной* или *полной*.

2. При денатурации *изменяются физические свойства* белка, например, снижается растворимость и белок выпадает в осадок, поскольку теряются основные факторы устойчивости – заряд и гидратная оболочка. Если после удаления денатурирующего агента восстанавливается нативная структура белковой молекулы, то это называется *ренатурация (ренативация)*.

3. При денатурации первичная *структура не изменяется*, т.е. не происходит разрыва пептидных связей.

4. Денатурированные под действием соляной кислоты белки в желудочно-кишечном тракте более легко *перевариваются* под действием пищеварительных ферментов.

Денатурацию вызывают *химические факторы* (сильные кислоты или щелочи, органические растворители, детергенты, восстанавливающие агенты, концентрированные соли, тяжелые металлы) и *физические факторы* (температура, давление, механическое воздействие, ультразвуковое и ионизирующее излучение).

2.7. Четвертичная структура

Представляет собой организацию *нескольких полипептидных цепей*, каждая из которых имеет третичную структуру, в единую функциональную молекулу белка. Четвертичной структурой обладают белки с молекулярной массой более 50000 Да. *Протомер* – отдельная полипептидная цепь в третичной структуре, не выполняющая функцию белка. *Субъединица* – протомер или объединение несколько протомеров, способных выполнять часть функций белка. *Олигомер (мультимер)* – сочетание протомеров или субъединиц в четвертичной структуре белка, несущих полную функциональную активность белка. Четвертичная структура стабилизируется *нековалентными связями* между *протомерами* (водородные, электростатические, гидрофобные взаимодействия). При разрушении связей, стабилизирующих четвертичную структуру, происходит разделение субъединиц и потеря функции белка.

2.8. Взаимосвязь структуры и функции

Рассмотрим на примере 2-х белков: миоглобина, который имеет третичную структуру и способен запасать кислород и гемоглобина, который имеет четвертичную структуру (4 субъединицы, каждая из которых напоминает глобулу миоглобина) и способен как связывать, так и транспортировать кислород.

1. *Миоглобин* является белком мышечной ткани, который депонирует кислород и транспортирует его к митохондриям. Для выполнения этой функции миоглобин должен обладать способностью связывать кислород при низком парциальном давлении кислорода, когда гемоглобин его отдает. Кривая насыщения миоглобина кислородом имеет вид гиперболы (рис. 2.4). Парциальное давление кислорода pO_2 в ткани, окружающей легочные капилляры составляет 100 мм рт. ст. Поэтому миоглобин в легких мог бы весьма эффективно насыщаться кислородом. В венозной крови pO_2 равно 40 мм.рт.ст., а в активно работающей мышце – около 20 мм.рт.ст. Но даже при таком pO_2 степень насыщения миоглобина кислородом будет весьма высокой (около 80%) и поэтому миоглобин не может отдавать кислород тканям. Однако при кислородном голодании (тяжелая физическая нагрузка) pO_2 уменьшается до 5 мм т.ст. и миоглобин может отдавать связанный кислород.

2. *Структура миоглобина*. Миоглобин является глобулярным белком (м.м. 17 000 Да), который состоит из 153 аминокислотных остатка. Около 75% полипептидной цепи спирализовано и образует 8 правых α -спиралей (обозначается буквами от А до Н). Полярные гидрофильные фрагменты расположены снаружи спирали, а неполярные гидрофобные – внутри молекулы (рис. 2.5).

Гем является простетической группой миоглобина и гемоглобина. Без гема миоглобин кислород не связывает. Гем состоит из железа (Fe^{2+}) и пропоропоринового кольца – протопорфирин IX. (Fe^{2+}) связано 4 координационными связями с пиррольными кольцами протопорфирина IX. Гем находится в гидрофобном кармане молекулы миоглобина. Пятая координационная связь образуется между атомом железа и остатком гистидина F8 (проксимальный гистидин). Шестая координационная связь образуется с молекулой кислорода, который встраивается между атомом железа и дистальным гистидином E7. В неоксигенированном миоглобине атом железа на 0,03 нм выступает из плоскости кольца в направлении Гис F8. При связывании молекулы O_2 с шестой координационной связью железа (оксигенированный миоглобин) атом железа втягивается в плоскость гема и выступает из нее только на 0,01 нм.

Таким образом, связывание O_2 с молекулой миоглобина приводит: 1) к перемещению атома железа и 2) перемещающийся атом железа будет изменять положение проксимального Гис F8, а, следовательно, и конформацию α -спирали F и всей глобулы миоглобина.

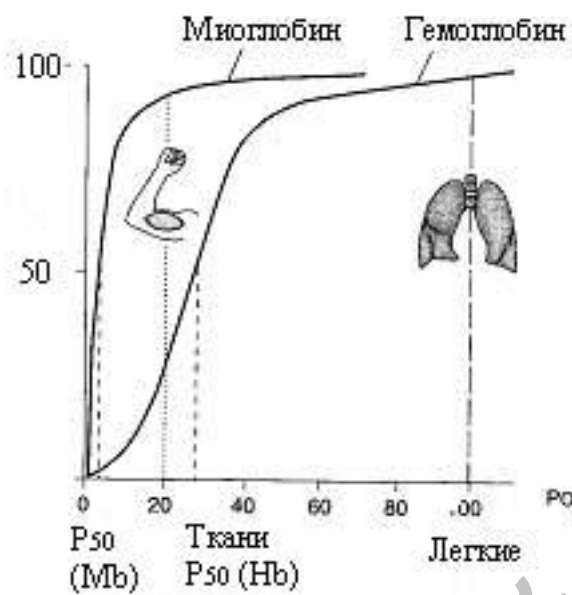


Рис. 2.4. Кривая насыщения миоглобина и гемоглобина кислородом.

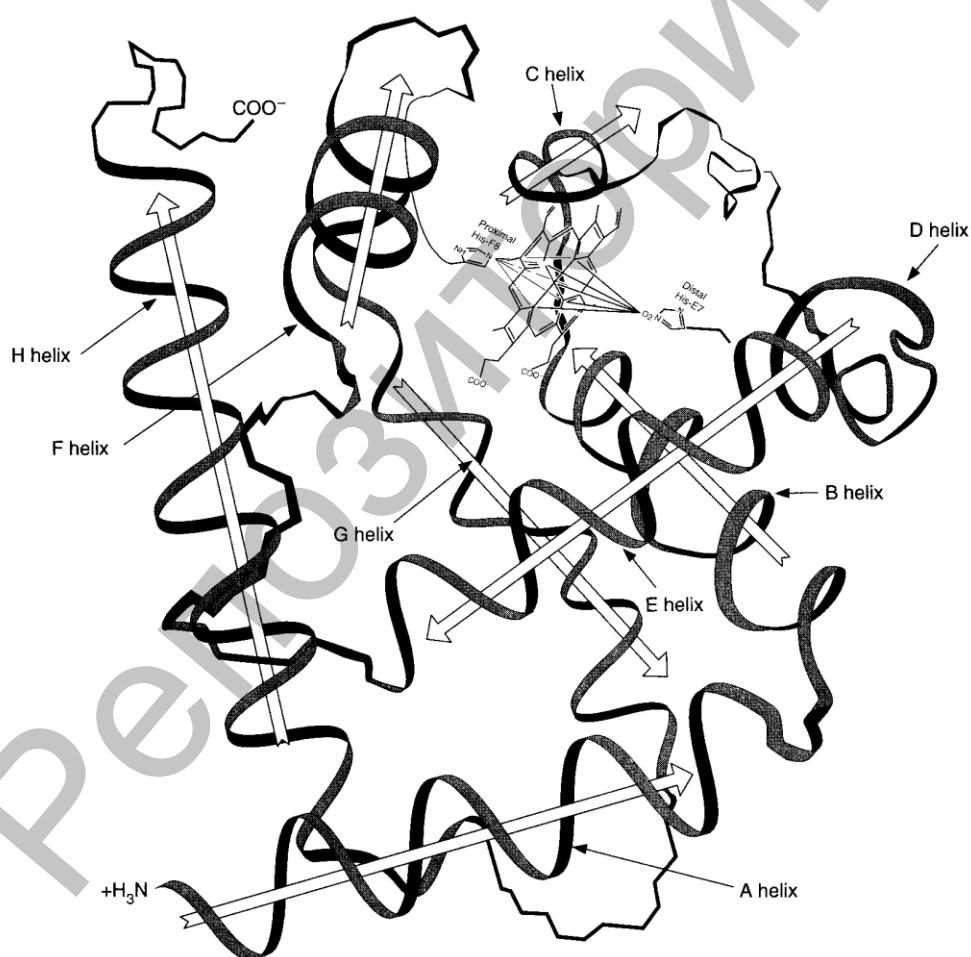


Рис. 2.5. Структура миоглобина.

1. *Гемоглобин* находится в эритроцитах и участвует в транспорте кислорода от легких к тканям и углекислого газа от периферических тканей к легким. Гемоглобин обладает способностью связывать кислород при высоком парциальном давлении кислорода (в легких) и высвобождать его в периферических тканях.

2. Гемоглобин – тетрамер, состоящий из четырех нековалентно связанных субъединиц, которые по структуре напоминают миоглобин (гемоглобин A_1 состоит из $\alpha_2\beta_2$). Подобно миоглобину, каждая субъединица имеет гидрофобный карман, в котором находится гем. Кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет S-образный (сигмоидный) характер. В сравнении с миоглобином, гемоглобин связывает кислород при высоком парциальном давлении кислорода в легких и отдает его в мышцах, где миоглобин связывает кислород.

3. *Кооперативный эффект*. При связывании кислорода с шестой координационной связью железа атом железа втягивается в плоскость кольца. Это приводит к изменению положения проксимального гис F8 и конформации всей полипептидной цепи: поворот пары α/β на 15° . Такие изменения конформации облегчает связывание второй молекулы O_2 . В итоге кривая связывания кислорода гемоглобином имеет S-образный вид. Такой тип зависимости определяется кооперативным (совместным) действием всех субъединиц в интересах всей молекулы гемоглобина. Наличие кооперативного эффекта дает гемоглобину новое свойство транспорта газов: при 100 мм.рт.ст. (в легких) молекула гемоглобина полностью оксигенируется (получает 4 молекулы O_2). Ниже 80 мм рт.ст. молекула гемоглобина отдает O_2 . Например, при $pO_2 = 20$ мм рт.ст. гемоглобин насыщен примерно на 20% кислородом, а миоглобин на 82%. Т.е. очевидно, что оксигемоглобин будет отдавать O_2 , а миоглобин его связывать.

2.9. Специфичность белков

Способность к специфическому узнаванию и специфическому взаимодействию является основой биологических функций всех белков. Специфически узнать молекулу - это значит найти поверхность молекулы с такой мозаикой радикалов, с которой можно образовать максимально возможное количество связей. Специфически взаимодействовать - это значит образовывать между участками поверхностей молекул максимально возможное число связей. Поверхности молекул, которые при образовании связей дополняют друг друга, называются *комплементарными*: положительному заряду должен соответствовать отрицательный - $NH^+ \dots COO^-$; группе с поляризованным протоном должен соответствовать атом с неподеленной парой электронов; одной гидрофобной группе стерически должна соответствовать другая. Отсюда *правило*: две

молекулы, поверхности которых комплементарны, находят друг друга и взаимодействуют.

Уникальность белков в том, что они могут менять свою конформацию, делая поверхность комплементарной лиганду. Различные лиганды связываются с белковыми молекулами по центрам связывания. Очевидно, что эти центры связывания должны быть комплементарны функциональным группам лиганда. Связи между лигандом и центром связывания белка нековалентные (водородные, ионные, гидрофобные). Поэтому такое связывание обратимо. Связывание белка с лигандом зависит от числа мест (центров) связывания и количества лиганда. Если количество молекул лиганда превышает число центров связывания на белке, дальнейшего связывания не происходит (белок насыщен лигандом). *Мономерные белки связываются с лигандом по гиперболической зависимости; мультимерные - по сигмоидной зависимости из-за кооперативного эффекта.* Специфическое взаимодействие за счет комплементарных поверхностей объясняет большинство функций белков (фермент - субстрат; гормон - рецептор; антиген - антитело и т.д.)

2.10. Самосборка белков

Специфическое взаимодействие определяет уникальное свойство белков - их способность к самосборке. Например, после обработки молекулы гемоглобина мочевиной, она распадается на функционально неактивные протомеры. После удаления мочевины эти протомеры самопроизвольно объединяются в нативную структуру гемоглобина. Возьмем более поразительный пример - гигантскую молекулу вируса табачной мозаики с м.м. 40000000 Да. Она состоит из одной молекулы РНК и 2130 белковых субъединиц, м.м. каждой из которых 17500 Да. Если РНК и субъединицы разделить добавлением детергента, а затем убрать детергент, то нативная структура молекулы вируса полностью восстановится. При этом вновь восстановятся все биологические свойства вируса. Самосборка не требует никакой дополнительной информации, происходит самопроизвольно путем взаимодействия комплементарных поверхностей молекул. Подчеркнем, что комплементарность поверхности молекулы белка определяется мозаикой радикалов аминокислот (поверхность третичной структуры). Последовательность же аминокислот детерминирована генетически и записана в первичной структуре. Следовательно, многообразие структурно и функционально различных белков определяется двумя причинами: 1) возможностью образования различных первичных структур из 20 аминокислот; 2) явлением самосборки, основанной на принципе комплементарных поверхностей.

Завершая изложение материала о структуре и функции белков, остановимся на двух важных в практическом отношении аспектах:

количественном определении белков и выделении индивидуальных белков.

2.11. Количественное определение белков

Различают две группы методов: 1) Определение количества белков в растворе на основе *физико-химических свойств*: биуретовый метод (основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди в щелочной среде); рефрактометрический и нефелометрический методы; поглощение ультрафиолетового излучения (при 280 нм поглощают УФО остатки ароматических аминокислот, при 180-210 нм - пептидная связь и ряд конформационных факторов). 2) Количественное определение индивидуальных белков на основе их *биологических свойств* (радиоиммунный, иммуноферментные методы).

Задача: в биологической жидкости имеется смесь белков ($A+B+X$). Необходимо определить количество белка X . Здесь общее определение количества белка не годится. Для количественного определения индивидуального белка X в смеси белков предложен *радиоиммунный метод*. Рассмотрим его суть. *Первый этап*: приготовление реагента для определения - чистым препаратом белка X , полученным заблаговременно, иммунизируют животное. Против этого белка в организме животного образуются антитела. Их выделяют из крови и метят ^{125}I . Этот этап осуществляется на предприятиях, производящих наборы реагентов для радиоиммунного определения белка. *Второй этап*: анализируют смесь белков, добавляя к ним меченое антитело в избытке. Меченое антитело связывает из-за специфического взаимодействия только белок X . Этот комплекс выделяют, подсчитывают радиоактивность и определяют количество метки. По количеству метки определяют количество антитела X , т.е. искомого белка. Метод весьма чувствителен, поскольку основан на специфичности белков, т.е. специфическом комплементарном взаимодействии индивидуальных белков.

В настоящее время нашел широкое распространение *иммуноферментный анализ* индивидуальных белков (ИФА), основанный на сродстве антитела к конкретному антигену (ELISA). *ELISA* включает следующие основные этапы:

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, чаще используют пластиковые 96-луночные плашки.

2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела.

3. В лунку добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой. К этому антителу присоединен фермент, катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт (чаще, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреазы). Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы конъюгата второе антитело-фермент.

4. Добавляют в лунку неокрашенный субстрат.

5. Проводят количественное (качественное) определение окрашенного продукта.

Основной принцип ELISA – специфическое связывание первого антитела с мишенью (белок, клетка). Применение *моноклональных антител* позволило существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с

одним, строго определенным антигенным сайтом. Напомним, что антитела продуцируют В-клетки (В-лимфоциты). Каждая клетка системы иммунитета вырабатывает одно антитело, которое распознает отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками системы иммунитета. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными. Они вариабельны по количеству, в связи с чем не нашли применения в методе ELISA. Известно, что В-клетки не воспроизводятся в культуре. Но после слияния с миеломными клетками удалось получить гибридомы и выделить растущие и делящиеся в культуре клоны клеток, которые продуцируют высокоспецифичные моноклональные антитела. Их и используют в методе ELISA.

Если первое антитело не связывается с мишенью, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело-фермент не с чем связываться, он удаляется при втором промывании, и образец остается неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Моноклональные антитела широко применяются в настоящее время при определении полипептидных гормонов, маркеров опухолей, цитокинов, лекарственных препаратов, различных низкомолекулярных биорегуляторов, возбудителей инфекционных заболеваний.

Для реализации методов радио- и иммуноферментного анализа требуется предварительно получить индивидуальные белки.

2.12. Методы выделения индивидуальных белков

При выделении индивидуальных белков обычно сталкиваются со следующими трудностями: 1) низкое содержание белка в исходном материале (часто < 0,1 % от сухой массы); 2) лабильность белков, что не позволяет применять традиционные методы органической химии (t° , перегонка, кристаллизация и др.); 3) связь белков со структурными элементами клеток или наличие их в белково-липидных, белково-углеводных и других комплексах биологических жидкостей; 4) наличие близких физико-химических свойств у разделенных белков. Выделение белков производят по следующей схеме.

Перевод белков ткани в раствор

1. Гомогенизация - перевод исследуемого материала в гомогенное состояние. При этом используются ступки, ножевые, пестиковые гомогенизаторы, ультразвук, замораживание - оттаивание и прочие методы для разрушения структур тканей методами.

2. Экстракция белков проводится обычно параллельно с гомогенизацией. Используют для экстракции: 8-10% растворы солей (NaCl, KCl и др.) - хорошо растворимы большинство белков тканей; буферные растворы; органические растворители и детергенты - нарушают

гидрофобные взаимодействия; сахара, глицерин и другие специальные экстрагенты.

3. Осветление гомогената (экстракта) путем центрифугирования или фильтрации. В результате *получаем раствор тканевых белков.*

Групповое разделение белков

1. Высаливание - разделение белков на фракции по их растворимости. Принцип метода заключается в дегидратации белков (обычно с помощью сернокислого аммония) при pH близком к ИЭТ. Различные белки выпадают в осадок при разных концентрациях соли. Это грубый метод разделения на группы. Например, глобулины выпадают в осадок при полунасыщении, а альбумины при полном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2. Избирательная денатурация - многие белки денатурируют и выпадают в осадок при нагревании раствора до 50°C или при подкислении среды до pH 5,0. Если выделяемый белок устойчив к нагреванию и изменению pH, то часть ненужных белков можно удалить таким простым способом.

3. Органические растворители при низких температурах используются для щадящего группового разделения белков. По методу Кона фракционируют белки плазмы крови спиртом при - 3-5 °C: альбумины - спирт 40%, pH 4.8, 1-5 °C; β , γ -глобулины - спирт 25%, pH 6.9, 1-5 °C; α -глобулины - спирт 18%, pH 5.2, 1-5 °C; фибриноген - спирт 8%, pH 7.2, 1-3 °C; α_2 -глобулин - спирт 40%, pH 5.8, 1-5 °C. 4) Диализ - освобождение белковых растворов от низкомолекулярных соединений (например, от сернокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Принцип: белки не проходят через полупроницаемую мембрану, а низкомолекулярные вещества проходят, что и позволяет очистить раствор белков от низкомолекулярных примесей. *Получаем группу (смесь) белков, обладающих близкими физико-химическими свойствами.*

Выделение индивидуального белка

Для выделения индивидуального белка из смеси белков с близкими физико-химическими свойствами используют: 1) различия по молекулярной массе (методы ультрацентрифугирования и гель-хроматографии); 2) различия в заряде (методы электрофореза и ионообменной хроматографии); 3) способность белков к специфическим взаимодействиям (аффинная хроматография).

Разделение по молекулярной массе. 1) Ультрацентрифугирование позволяет получить в центрифужных пробирках, вращающихся со скоростью до 85000 об/мин ускорение силы тяжести 300000 - 500000 g, при этом белки с разной молекулярной массой будут двигаться к дну пробирки с разной скоростью. На дно осядут самые тяжелые белки, затем средние и легкие. 2) Гель-фильтрация осуществляется с помощью молекулярных сит, например, сефадексов. Это нитевидные молекулы

полисахарида декстрана, сшитые через определенные промежутки поперечными связями и свернутые в гранулы. В зависимости от размеров пор выпускают ряд марок сефадексов: G-200; G-100; G-75 и др.

Разделение по заряду. 1) Электрофорез. Белки, имеющие разное количество ионогенных радикалов в полипептидной цепи имеют в растворе разные заряды, а поэтому в электрическом поле будут двигаться с разной скоростью. Обычно используют электрофорез в полиакриламидном геле. Перспективен метод изоэлектрического фокусирования. 2) Ионообменная хроматография заключается в ионном обмене между полимером, заполнившим колонку (катионообменник, анионообменник), и заряженным белком, пропускаемым через колонку.

Разделение на основе специфического связывания. Аффинная хроматография, или хроматография по сродству. Метод основан на специфическом взаимодействии молекулы белка с определенным лигандом. Готовят матрицу, с которой сшивают соединение (лиганд), обратимо и специфично связывающийся с искомым белком. Затем через колонку пропускают смесь белков. С лигандом матрицы свяжется только искомый белок за счет специфического взаимодействия, а нейтральные белки будут удалены с растворителем. Затем не представляет труда снять этот белок. Для этого через колонку пропускают раствор с высокой концентрацией свободного лиганда. Часто используют вариант свободного лиганда, имеющего более высокое сродство к белку, чем у фиксированного на матрице лиганда.

Определение гомогенности выделенного белка

Оценивают способность к кристаллизации (у чистого белка кристаллы одного типа); изучают кривые растворимости (у чистого белка один перелом кривой растворимости); проводят аналитическое ультрацентрифугирование (чистый белок дает один узкий пик); электрофорез в ПААГ, изоэлектрофокусирование (чистый белок дает одну полосу); делают иммунохимический анализ (чистый белок дает одну полосу преципитации со смесью антител).

2.13. Протеомика

Термин «Протеом» возник от *протеин*, т.е. белков, полученных при экспрессии генома, и определяет системный профиль белков клеток, тканей и органов на основе биохимических, молекулярно-клеточных и генетических методов исследования. Протеомика изучает белковый спектр биологических систем в различных условиях. Если исследование генома (геномика) было основным направлением биологических научных исследований 20 века, то протеомика – это наука 21 века. Протеомика основывается на 2-х этапном анализе: 1) как можно детальное разделение белков биологического объекта и 2) их количественная оценка. Протеомика возникла на основе *двумерного электрофореза в полиакриламидном геле*, когда удастся увидеть белковый спектр биологического объекта в виде отдельных пятен. Шагом вперед явилась комбинация этого метода с чувствительным методом детекции масс-спектрометрией. Протеомика изучает не только изоформы белков, но и особенности их

фолдинга, т.е. приобретения нативной конформации. В общем, протеомика изучает локализацию белков в клетке, обеспечивает идентификацию отдельных белков, определение их структуры и определяет характер белок-белковых взаимодействий.

Глава 3. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы (от греч. *enzyme* – в дрожжах или от лат. *fermentatio* – брожение). В конце прошлого века появились сведения о каталитических антителах (абзимы) и РНК (рибозимы).

Идея W.Jencks (1969) о способности белков-антител катализировать химические реакции была подтверждена в конце 80-х годов прошлого века. Были введены термины «каталитические антитела» или «абзимы» (от *antibody enzyme*). В настоящее время известны несколько классов химических реакций, катализируемых антителами: ацилтрансферазные, изомеразные, бимолекулярной ассоциации и окислительно-восстановительные.

Каталитические РНК (рибозимы) были описаны в 80-х годах прошлого века (T.R.Chech et al., 1981; C.Guerrier-Takada et al., 1983). Рибозимы достаточно широко представлены в природе и играют важную роль в эволюции живых организмов, поскольку они могут обеспечивать репродукцию и процессинг РНК без участия белков-ферментов. В частности, рибозимы участвуют в удалении неинформативных интронов из пре-м-РНК, на этапе синтеза белков путем созревания тРНК с помощью рибонуклеазы Р РНК, а также в процессе саморепликации вирусного РНК генома (патогенные вирусы для растений и человека). Ранее неоднократно сообщалось, что синтез белка в рибосомах зависит от уровня рРНК. Активность рибозимов может контролироваться антибиотиками, что открывает новую страницу в профилактике и лечении вирусных заболеваний, включая вакцинацию.

Для выделения ферментов используют методы препаративной химии белков в специальных щадящих условиях (низкая температура, отсутствие эффектов необратимой денатурации). Оптимальным способом выделения ряда ферментов является биоспецифичная аффинная хроматография. Из более 3800 ферментов, включенных в список, $\frac{3}{4}$ выделены и очищены, у 500 ферментов изучена первичная структура и охарактеризованы гены и только у десятков из них постулирована третичная структура.

3.1. Характеристика ферментов

Сходства между ферментами и химическими катализаторами:

1. Не расходуются и не образуются в процессе реакции.
2. Катализируют только энергетически возможные реакции.
3. Не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов реакции.
4. Не смещают равновесия реакции, а ускоряют его наступление.

Различия между ферментами и химическими катализаторами:

1. Ферменты являются *белками* и поэтому катализируют реакции в «мягких» условиях (давление 1 атм, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и нейтральное значение рН).

2. Ферменты обладают *физико-химическими свойствами*, характерными для белков: высокой молекулярной массой, амфотерностью, не способны к диализу, подвергаются высаливанию, денатурируют.

3. Для ферментов характерна *более высокая эффективность*. Например, энергия активации разложения перекиси водорода $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$ равна 75,2 кДж/моль. При добавлении неорганического катализатора платины энергия активации снижается до 50,2 кДж/моль. Фермент каталаза снижает энергию активации до 8,3 кДж/моль.

4. Активность фермента *регулируется* и контролируется на генетическом уровне и посредством низкомолекулярных соединений (субстратов и продуктов реакции).

5. Ферменты *обладают специфичностью*. Различают 4 вида специфичности ферментов: 1) *абсолютная специфичность* – фермент катализирует превращение только одного субстрата. Например, аргиназа расщепляет аргинин, уреазы – мочевины; 2) *относительная специфичность* – фермент расщепляет определенный тип связи. Например, липаза гидролизует жиры по месту сложноэфирной связи на глицерин и жирные кислоты; 3) *относительная групповая специфичность* – фермент расщепляет связь, образованную определенными функциональными группами. Эти ферменты обычно участвуют в процессе пищеварения. Например, пепсин расщепляет пептидную связь, образованную аминогруппой ароматических аминокислот, трипсин – пептидную связь, образованную карбоксильной группой основных аминокислот, а химотрипсин – карбоксильной группой ароматических аминокислот; 4) *стереохимическая специфичность* – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера. Например, оксидаза L-аминокислот превращает только L-аминокислоты.

6. В организме действуют, как правило, полиферментные системы, в результате чего происходит многоэтапное превращение вещества с допустимыми для организма перепадами энергии.

Полиферментные системы (комплексы) представляют собой несколько ферментов, катализирующих ряд согласованных реакций, причем конечные продукты одной ферментативной реакции являются субстратами для следующей. Различают три типа мультиферментных комплексов:

а) ферменты растворены в цитоплазме и контакт субстратов с ними осуществляется посредством диффузии;

б) ферменты соединены друг с другом за счет белок-белковых взаимодействий;

в) ферменты соединены друг с другом и иммобилизованы на внутриклеточных или цитоплазматических мембранах.

3.2. Классификация и номенклатура ферментов

1. Ферменты называются добавлением суффикса *-аза* к названию субстрата, на который данный фермент действует. Например, уреаза катализирует гидролиз мочевины; ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы амилазами; гидролизующие жиры (липос) – липазами; фермент, гидролизующие белки (протеины) – протеиназами.

2. Используются названия для групп ферментов, катализирующих сходные реакции. Например, ферменты, которые переносят остаток фосфорной кислоты от АТФ на другую молекулу, называются киназами.

3. Тривиальные названия не показывают механизма действия, но они широко используются. Например, пепсин, трипсин и др.

4. Международный Совет Биохимиков (IUB) предложил систематическое название и классификацию ферментов по типу и механизму катализируемой реакции.

Согласно этой системы все ферменты разделены на 6 классов, каждый из которых имеет определенный номер: 1) *оксидоредуктазы* (окислительно-восстановительные реакции); 2) *трансферазы* (реакции межмолекулярного переноса различных групп); 3) *гидролазы* (разрыв связей в субстратах с присоединением воды); 4) *лиазы* (разрыв связей в субстратах без присоединения воды); 5) *изомеразы* (реакции изомеризации); 6) *лигазы (синтетазы)* (реакции синтеза с использованием энергии АТФ). Название класса указывает на тип химической реакции, катализируемой ферментами. Классы делятся на подклассы, а те, в свою очередь, на подподклассы. Подкласс уточняет действие фермента, т.к. указывает на природу химической группы субстрата, атакуемой ферментом. Подподкласс уточняет природу атакуемой связи субстрата или природу акцептора, который участвует в реакции

Систематическое название фермента складывается из названия субстратов (субстратов) химической реакции, которую катализирует фермент, названия типа химической реакции и суффикса –аза. Например, систематическое название лактатдегидрогеназы следующее:

L-лактат: NAD^+ - Оксидоредуктаза.

I субстрат II субстрат тип реакции

Дополнительная информация, если она необходима для уточнения, заключается в скобки. Например, фермент, катализирующий реакцию $\text{L-малат} + \text{NAD}^+ = \text{пируват} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$, имеет номер 1.1.1.37 и называется L-малат: NAD^+ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

Каждый фермент имеет специальный шифр, состоящий из 4-х кодовых чисел, разделенных точками; первая цифра характеризует класс реакции, вторая – подкласс, третья – подподкласс, четвертая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, лактатдегидрогеназа имеет шифр 1.1.1.27, т.е. фермент относится к 1-му

классу (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН-ОН-группировки в качестве доноров атомов водорода), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит никотинамидадениндинуклеотид) и занимает 27-ю позицию в перечне ферментов упомянутого подкласса.

В связи со значительным усложнением названий ферментов в новой номенклатуре и живучестью тривиальных названий иногда допускается использование последних в публикациях.

3.3. Структурная организация ферментов

По строению ферменты делятся на *простые (однокомпонентные)* и *сложные (двухкомпонентные) белки*. Простые белки-ферменты состоят из аминокислот. Сложные белки-ферменты состоят из белковой части – *апофермента* и небелковой части – *кофактора*. Кофактор, прочно связанный с апоферментом, называется *протетической группой*. Комплекс апофермента и прочно связанного кофактора называется *холоферментом*. Кофактор, который связан с апоферментом нековалентными связями и легко отделяется при диализе, называется *коферментом*. Кофермент присоединяется во время реакции к молекуле фермента подобно субстрату, химически изменяется и затем снова освобождается.

Роль коферментов выполняют 2 группы веществ: витамины и их производные и вещества невитаминной природы. Ко второй группе веществ относятся нуклеотиды (УДФ-глюкоза), фосфаты моносахаридов (2,3-бисфосфоглицерат), металлопорфирины (гем, хлорофилл) и пептиды (глутатион). Кофактором могут быть неорганические ионы, например, Mg^{2+}). Роль металлов: 1) образование фермент-субстратного комплекса; 2) металлы с переменной валентностью участвуют в транспорте электронов; 3) способствует формированию нативной структуры фермента; 4) образование связи между апоферментом и коферментом.

Кофакторы ферментов должны поступать с пищей, а апофермент синтезируется в организме. Апофермент определяет специфичность фермента.

3.4. Функциональная организация ферментов

Превращаемые вещества называются *субстратами*. В трехмерной структуре фермента выделяют несколько участков, несущих определенную функцию. В молекуле фермента выделяют *активный центр*, т.е. участок с которым связывается субстрат и протекает каталитическая реакция.

1. Активный центр фермента формируется при образовании *третичной структуры* белка за счет пространственного сближения радикалов аминокислот (чаще сер, гис, тре, цис, глу, асп, арг). Потеря

конформации фермента в результате денатурации приводит к разрушению активного центра.

2. Активный центр образуется *боковыми радикалами* аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в первичной структуре. Например, в активный центр химотрипсина входят Гис-57, асп-102 и сер-195, всего фермент состоит из 246 аминокислотных остатков.

3. Активный центр представляет собой полость, щель или карман, который занимает малую область фермента.

4. Активный центр не является жесткой структурой. Его конформация изменяется при связывании субстрата.

5. У сложных ферментов в состав активного центра входят кофакторы.

6. В активном центре выделяют *контактный (якорный)* участок, связывающий субстрат и *каталитический* участок, где происходит превращение субстрата.

7. Субстрат связывается с активным центром фермента *нековалентными* связями.

8. Субстраты связываются с активным центром с образованием фермент-субстратного комплекса. Продукт высвобождается и фермент снова используется для реакции.

Кроме активного центра у ряда ферментов имеется *регуляторный*, или *аллостерический* (от греч. allos – иной, чужой), центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. К аллостерическому центру присоединяются вещества – *эфффекторы*, которые делятся на *активаторы* и *ингибиторы*. Присоединение эфффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются *аллостерическими*.

Известны *множественные молекулярные формы ферментов*, которые являются белками-ферментами с четвертичной структурой, способными катализировать одну и ту же реакцию, но несколько отличаются по строению (т.е. первичной структуре) субъединиц. Если это закреплено генетически, то говорят об *изоферментах*. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из 4-х субъединиц 2-х типов Н (от heart – сердце) и М (от muscle – мышца) и возможно 5 вариантов, т.е. изоферментов:

1 Н Н Н Н; 2 Н Н Н М; 3 Н Н М М; 4 Н М М М; 5 М М М М
СЕРДЦЕ —————> ЛЕГКИЕ <————— ПЕЧЕНЬ

В зависимости от физиологического состояния, возраста, особенностей среды обитания в организме устанавливаются определенные соотношения изоферментов, что оптимизирует катализируемые превращения веществ. Следовательно, изменение соотношения изоферментов во всем организме или в отдельных тканях и органах является способом регуляции действия ферментов. Исследование множественных молекулярных форм ферментов и изоферментов используется в медицине для поиска поврежденных тканей, прогнозирования продуктивности животных, подбора

родительских пар при скрещивании для обеспечения максимального воспроизведения заданных свойств у потомства и др.

Полиферментами (мультиэнзимами) называют группы ферментов, способных катализировать несколько химических реакций, что обеспечивает сложные, многоэтапные превращения субстрата. В том случае, когда мультиэнзимы обслуживают многоэтапный процесс с возможностью выхода промежуточных метаболитов, его называют метаболическим путем превращения вещества, или *метаболизмом* (специфический путь превращения глюкозы до пирувата, цикл трикарбоновых кислот и др.). Если же превращаемые под действием мультиэнзимов вещества передаются по конвейеру и выделяются только конечные продукты реакции, то говорят о *полиферментных комплексах*, или *полиферментных системах*. Так, например, пируватдегидрогеназный комплекс включает три фермента и пять кофакторов.

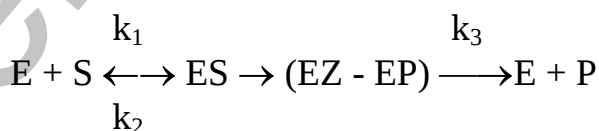
В последнее время активно изучаются *полифункциональные ферменты*, в которых из первичной структуры белка могут формироваться функционально и стерически обособленные домены, несущие два и более видов каталитической активности. К такого типа ферментам относят самый распространенный на земле фермент – фермент темновой фазы фотосинтеза рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазу/оксигеназу. Фермент катализирует реакции карбоксилирования с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата и оксигенации с образованием молекулы 3-фосфоглицерата и молекулы 2-фосфогликолата (токсический для растения продукт). Именно соотношение этих двух активностей фермента лежит в основе эволюции C_3 и C_4 растений на земле.

3.5. Механизм действия ферментов

Изменение свободной реакции при катализируемой и некатализируемой реакции представлено на рисунке 3.1.

Энергия активации – это дополнительное количество энергии, которое необходимо дать молекуле для преодоления энергетического барьера (или для достижения переходного состояния), т.е. это энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние. Ферменты ускоряют реакцию путем *снижения энергии активации* за счет увеличения числа активизированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.

Ферментативный катализ идет в 3 стадии:



I стадия – присоединение молекулы субстрата к молекуле фермента и образование фермент-субстратного комплекса: $E + S \leftrightarrow ES$

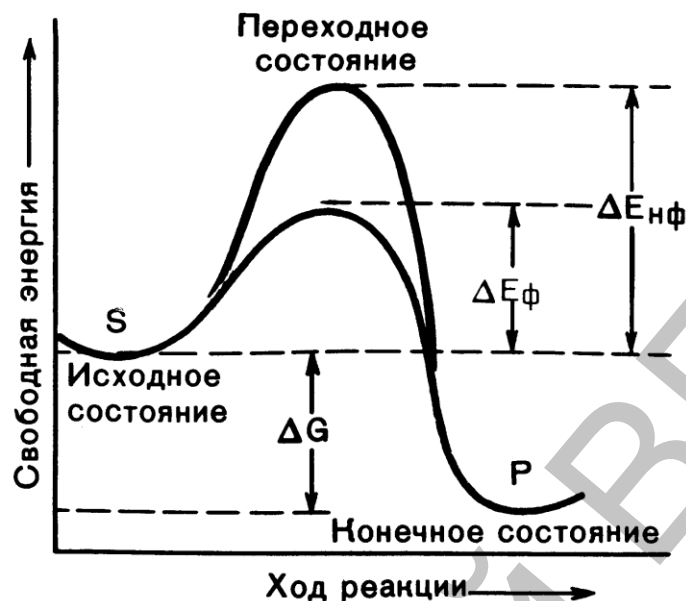


Рис. 3.1. Изменения свободной энергии катализируемой и некатализируемой реакции. S – исходный субстрат; P – продукт; $\Delta E_{нф}$ – энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ – энергия активации ферментативной реакции; ΔG – стандартное изменение свободной энергии.

Изменение энергии активации на этой стадии незначительно. В образовании фермент-субстратного комплекса участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Для этой стадии важно сближение и правильная ориентация фермента и субстрата. Сближение и необходимая ориентация реагентов значительно повышают вероятность образования продуктивного фермент-субстратного комплекса. Кроме того, связывание субстрата в активном центре приводит к удалению гидратной оболочки субстрата. В результате удаления молекул воды в активном центре фермента во время катализа создаются совершенно другие условия, чем в растворе.

Существует 2 теории объясняющие взаимодействие фермента и субстрата.

1. В соответствии с теорией Э.Фишера фермент и субстрат подходят друг другу как *ключ к замку*. Это означает, что структура фермента и субстрата строго комплементарны.

2. Согласно гипотезе Д.Кошланда «*индуцированного*» или «*вынужденного*» соответствия фермент изменяет конформацию активного центра при присоединении субстрата. Кроме того, в процессе присоединения происходит перестройка молекул субстрата.

II стадия – преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько последовательных (переходных) комплексов с образованием на поверхности фермента конечного продукта реакции:



II стадия наиболее медленная. На этой стадии происходит образование переходных состояний. При этом важным фактором является стабилизация переходного состояния вследствие взаимодействия между функциональными группами субстрата и фермента. Переходное состояние в случае ферментативной реакции требует меньшей энергии активации.

Механизмы действия ферментов на этой стадии объясняются *эффектом деформации субстрата, кислотно-основным и ковалентным катализом*. Эффект деформации субстрата (или так называемая теория «дыбы») объясняет действие гидролаз, лиаз и трансфераз. После связывания с активным центром молекула субстрата как бы растягивается на активном центре фермента. Чем больше длина межатомной связи в субстрате, тем меньше энергия ее разрыва.

Многие ферменты во время катализа переносят специфические группировки с субстрата или на субстрат. Особенно часто осуществляется перенос протонов. Этот ферментативный *кислотно-основный катализ* более эффективен, чем обмен протонов с кислотами и основаниями в растворе. При закреплении субстрата в активном центре на его молекулу влияют электрофильные и нуклеофильные группы каталитического участка, что вызывает перераспределение электронной плотности на участках субстрата, атакуемого кислотно-основными группами.

Часто химические группировки ковалентно присоединяются к остаткам фермента. Это явление называют *ковалентным катализом*. Ковалентные фермент-субстратные комплексы очень неустойчивы и легко распадаются.

Вторая стадия лимитирует скорость всего катализа.

III стадия – отделение продукта реакции от фермента: $EP \rightarrow E + P$.

Стадия непродолжительна и определяется скоростью диффузии продуктов реакции в окружающую среду.

3.6. Кинетика ферментативных реакций

Скорость ферментативных реакций зависит от концентрации фермента, субстрата, температуры, pH, наличия активаторов и ингибиторов.

В условиях избытка субстрата скорость реакции *прямо пропорциональна концентрации фермента* (рис. 3.2).

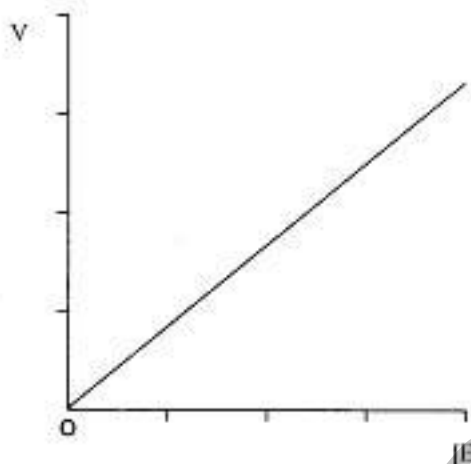


Рис. 3.2. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента.

Зависимость скорости реакции от **концентрации субстрата** представлена на рисунке 3.3.

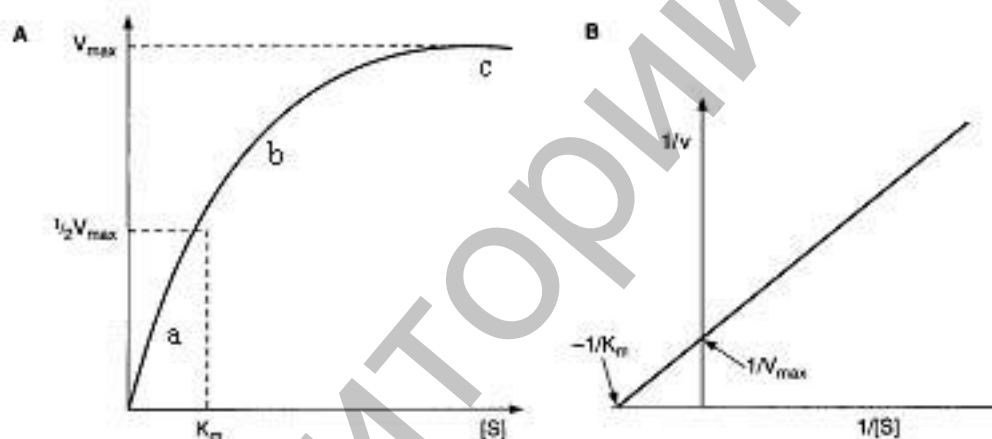
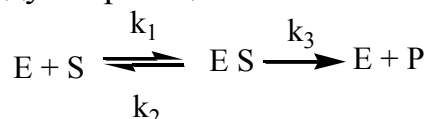


Рис. 3.3. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата.

На графике выделяют 3 участка. При низкой концентрации субстрата (участок *a*) скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата и подчиняется кинетике первого порядка. На участке *b* (реакция смешанного порядка) эта зависимость нарушается. На участке *c* скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата.

Ферментативная реакция характеризуется формированием фермент-субстратного комплекса [ES], который распадается с образованием свободного фермента и продукта реакции.



В этом уравнении k_1 – константа скорости образования фермент-субстратного комплекса, k_2 – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса с образованием свободного фермента и субстрата

и k_3 – константа скорости диссоциации фермент-субстратного комплекса до свободного фермента и продукта реакции.

Михаэлис и Ментен предложили уравнение, которое описывает зависимость скорости реакции от концентрации субстрата.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad \text{или} \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}}$$

v – скорость реакции при данной концентрации субстрата; K_s – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; $V_{\max}$ – максимальная скорость реакции.

$K_s = k_2/k_1$ т.е. отношение константы обратной реакции к константе прямой реакции.

Однако данное уравнение описывает только участок *a* на графике и не учитывает влияния на скорость ферментативного процесса продуктов реакции.

Холдейн и Бриггс заменили в уравнении константу диссоциации на константу Михаэлиса (K_m).

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

Константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Константа Михаэлиса характеризует сродство фермента и субстрата. Высокое сродство фермента к субстрату характеризуется низкой величиной K_m и наоборот.

Использование графика, предложенного Михаэлисом и Ментен неудобно. Для более удобного графического представления Г.Лайнувер и Д.Бэрк преобразовали уравнение Холдейна и Бриггса по методу двойных обратных величин, исходя из того принципа, что если существует равенство между двумя величинами, то и обратные величины также будут равны.

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

Графическое изображение зависимости скорости реакции от **pH** имеет колоколообразную форму. Значение pH, при котором фермент проявляет максимальную активность, называется *оптимумом pH* (рис. 5.4 А). Для большинства ферментов оптимум pH равен 6-8. Исключение составляет пепсин, оптимум которого равен 2,0. При изменении pH в ту или другую сторону от оптимума скорость реакции уменьшается,

вследствие ионизации функциональных групп фермента и субстрата, что нарушает образование фермент-субстратного комплекса.

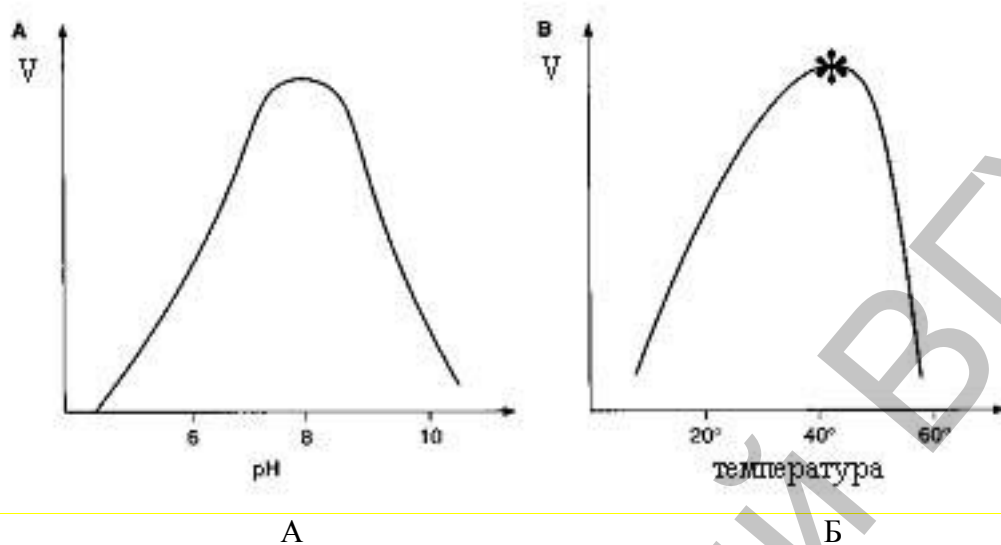


Рис. 3.4. Зависимость скорости реакции от pH (А) и температуры (Б).

Скорость химической реакции повышается в 2 раза при повышении **температуры** на 10°C. Однако вследствие белковой природы фермента при дальнейшем повышении температуры наступает денатурация фермента. Температура, при которой скорость реакции максимальна, называется **температурным оптимумом** (рис. 3.4. Б). Для большинства ферментов оптимум температуры составляет 37-40°C. Исключение составляет миокиназа мышц, которая выдерживает нагревание до 100°C.

Активаторы ферментов – это вещества 1) формирующие активный центр фермента (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}); 2) облегчающие образование фермент-субстратного комплекса (Mg^{2+}); 3) восстанавливающие SH-группы (глутатион, цистеин, меркаптоэтанол); 4) стабилизирующие нативную структуру белка-фермента. Активируют ферментативные реакции обычно катионы (в таблице Менделеева с 19 по 30). Анионы менее активны, хотя ионы хлора и анионы некоторых других галогенов могут активировать пепсин, амилазу, аденилатциклазу. Активаторами могут быть белки: апопротеин А-I (ЛХАТ), апопротеин С-II (ЛПЛ).

Механизм действия активаторов:

- 1) участвуют в формировании активного центра ферментов;
- 2) облегчают связывание субстрата и фермента;
- 3) участвуют в формировании нативной структуры фермента.

Ингибиторы – вещества, вызывающие частичное или полное торможение реакций, катализируемых ферментами.

Ингибиторы классифицируются на **неспецифические** и **специфические**. Действие неспецифических ингибиторов не связано с механизмом действия ферментов. Эти ингибиторы вызывают денатурацию

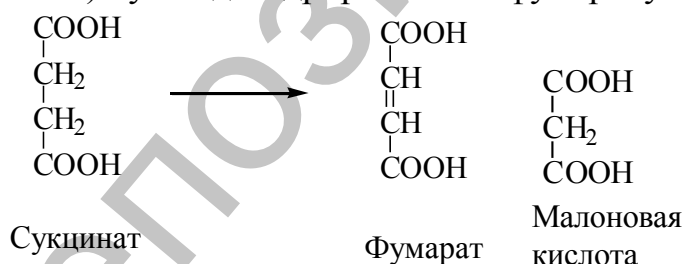
белка-фермента (нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов и др.).

Специфические ингибиторы влияют на механизм действия ферментов. Специфические ингибиторы делятся на 2 группы: *обратимые и необратимые*. Необратимые ингибиторы вызывают стойкое необратимое изменение или модификацию функциональных групп фермента путем прочного или ковалентного связывания. К этой группе относятся: 1) *ингибиторы металлосодержащих ферментов* (HCN, RCN, HF, CO и др.). Эти соединения связываются с металлами с переменной валентностью (Cu или Fe), в результате чего нарушается процесс переноса электронов по дыхательной цепи ферментов. Поэтому эти ингибиторы называются дыхательными ядами. 2) *ингибиторы ферментов, содержащих SH-группы* (монойодацетат, дийодацетат, йодацетамид, соединения мышьяка и ртути). 3) *ингибиторы ферментов, содержащих OH-группу в активном центре* (фосфоорганические соединения, инсектициды). Эти ингибиторы тормозят, прежде всего, активность холинэстеразы – фермента, играющего первостепенную роль в деятельности нервной системы.

Обратимое ингибирование поддается количественному изучению на основе уравнения Михаэлиса-Ментен. Обратимые ингибиторы делятся на *конкурентные и неконкурентные*.

Конкурентные ингибиторы – это вещества по структуре похожие на субстрат. Ингибитор связывается с активным центром фермента и препятствует образованию фермент-субстратного комплекса.

Классическим примером конкурентного ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление янтарной кислоты (сукцината) путем дегидрирования в фумаровую кислоту.



Если в среду добавить малоновую кислоту (ингибитор), то в результате структурного сходства с истинным субстратом сукцинатом он будет реагировать с активным центром с образованием фермент-ингибиторного комплекса, однако реакция происходить не будет.

Действие ингибитора устраняется путем *увеличения концентрации субстрата*. При конкурентном ингибировании изменяется кинетика ферментативных реакций: *увеличивается K_m , V_{max} остается постоянной* (рис. 3.5).

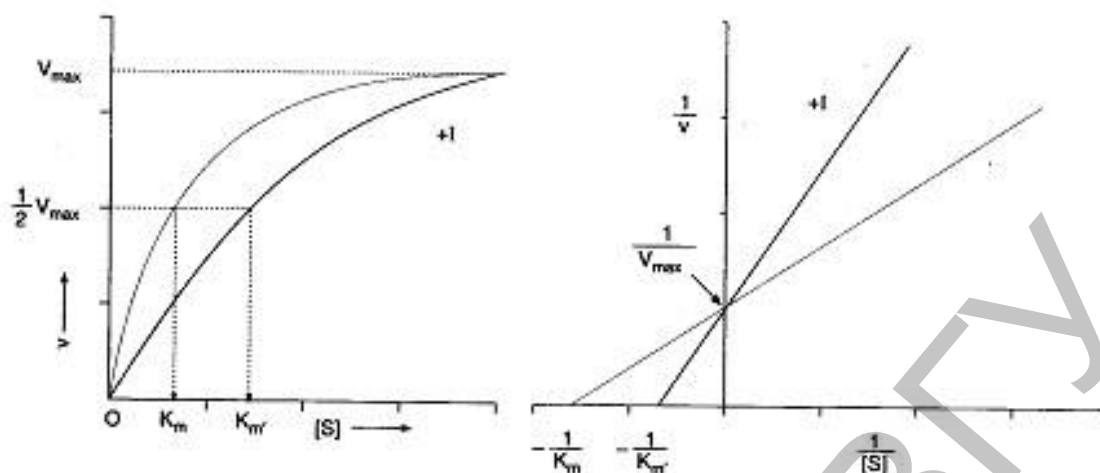


Рис. 3.5. Влияние конкурентных ингибиторов на скорость ферментативной реакции

Метод конкурентного ингибирования нашел применение в медицинской практике, в качестве *антиметаболитов*.

Например, для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяют сульфаниламидные препараты. Эти препараты имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой, которую бактериальная клетка использует для синтеза фолиевой кислоты, необходимой для жизнедеятельности бактерий. Благодаря этому структурному сходству сульфаниламид блокирует действие фермента путем вытеснения парааминобензойной кислоты из комплекса с ферментом, синтезирующим фолиевую кислоту.

Неконкурентные ингибиторы – вещества, не имеющие структурного сходства с субстратами. Неконкурентные ингибиторы связываются не с активным центром, а в другом месте молекулы фермента, например, в аллостерическом центре. Это изменяет конформацию активного центра таким образом, что нарушается взаимодействие с ним субстрата.

При неконкурентном ингибировании: V_{max} уменьшается, а K_m не изменяется (рис. 3.6).

5.7. Регуляция активности ферментов

Активация проферментов. Происходит путем отщепления части полипептидной цепи от молекулы предшественника с образованием активного центра фермента. Этот путь характерен для протеолитических ферментов, которые синтезируются в неактивной форме (проферменты) в желудке и поджелудочной железе и участвуют в переваривании белков. Синтез в виде проферментов исключает самопереваривание органов. Например, в поджелудочной железе вырабатывается химотрипсиноген. В кишечнике под действием трипсина происходит последовательно отщепление 2-х дипептидов и образуются три полипептидные цепи, соединенные дисульфидными мостиками. Это изменяет конформацию

молекулы и формирует ее активный центр, в состав которого входит серин, гистидин и аспарагиновая кислота.

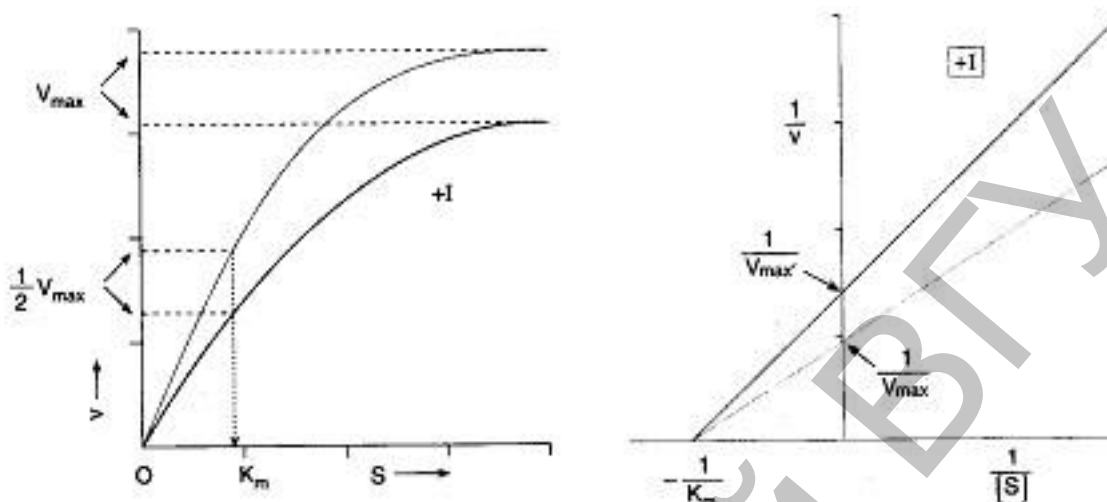


Рис. 3.6. Влияние неконкурентных ингибиторов на скорость реакции.

Химическая модификация. Заключается в присоединении к ферменту или отщеплении от него низкомолекулярной молекулы (чаще фосфорной кислоты), при котором происходит активация или ингибирование фермента. Например, фермент, участвующий в синтезе гликогена – гликогенсинтаза – при присоединении фосфорной кислоты становится неактивным, а фермент распада гликогена – фосфоорилаза – активным.

Аллостерическая регуляция. Происходит путем присоединения к аллостерическому центру фермента эффекторов – активаторов и ингибиторов. Если в роли активатора выступают молекулы субстрата – *гомotropная активация*, если какой-то другой метаболит – *гетеротропная*. Для аллостерических ферментов кривая насыщения субстратом представляет собой сигмоидную кривую, а не гиперболу как для нерегуляторных ферментов.

Кооперативный эффект характерен для белков в четвертичной структуре. Субъединицы белка в четвертичной структуре могут находиться в 2-х конформациях: R и T. Конформация R (relax – расслабление) обладает высоким сродством к субстрату, конформация T (tense – напряженная) – низким сродством. Формы R и T могут переходить друг в друга.

Предложено 2 модели кооперативного эффекта.

Симметричная модель (Ж.Моно, Д.Уайман, Ж.-П.Шанжё): субъединицы должны находится в одном и том же конформационном состоянии. Таким образом разрешены состояния RR и TT и не разрешено состояние RT. В отсутствие субстрата почти все молекулы фермента находятся в T-форме. Добавление субстрата приводит к переходу T-формы в R-формы одновременно всех субъединиц. Аллостерический ингибитор

связывается преимущественно с Т-формой и ее стабилизирует; аллостерический активатор связывается преимущественно с R-формой.

Последовательная модель (Д.Кошланд). Согласно этой модели каждая субъединица может существовать в одном из возможных конформационных состояний (R или T). Связывание субстрата изменяет форму той субъединицы, к которой он присоединяется. Конформация другой субъединицы при этом не меняется. Конформационные изменения, вызванные связыванием субстрата на одной субъединице, могут увеличить или уменьшать сродство к субстрату другой субъединицы той же молекулы фермента.

Регуляция активности по принципу обратной связи (ретроингибирование). Во многих биосинтетических процессах основным типом регуляции скорости многоступенчатого процесса является ингибирование по принципу обратной связи, когда конечный продукт подавляет активность первого фермента.

Активация предшественником (форактивация) – первый метаболит в многоступенчатом процессе активирует фермент, катализирующий последнюю стадию.

3.8. Единицы измерения активности ферментов

Для выражения концентрации фермента используют стандартную международную единицу и катал.

Стандартная международная единица (Е или U) – количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин).

Катал - количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 моль субстрата в секунду (моль/сек). 1 Е фермента соответствует 16,67 нкат.

Для выражения активности фермента используют удельную и молярную активности.

Удельная активность – число единиц ферментативной активности на 1 мг белка.

Молярная активность (число оборотов) – число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в секунду.

3.9. Применение ферментов

Ферменты в течение многих лет применяются в различных областях практической деятельности человека: в кожевенной, пищевой, текстильной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе. Эффективность действия ферментов многократно выше по сравнению с химическими катализаторами, однако их промышленное применение

затруднено из-за неустойчивости при хранении и температурных воздействиях. В связи с этим используют иммобилизованные ферменты.

Глава 4. МЕМБРАНЫ. ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ

Мембранология как самостоятельная наука, изучающая строение, свойства, механизмы функционирования биологических мембран, сформировалась сравнительно недавно (1950-1970 гг.). Однако сам термин «мембрана» используется почти 150 лет для обозначения клеточной границы, служащей, с одной стороны, барьером между содержимым клетки и внешней средой, а с другой – полупроницаемой перегородкой, через которую могут проходить вода и растворенные в ней вещества.

Большинство функций организма (движение, рост, размножение, и метаболизм) зависят, прямо или косвенно от мембран. Биологическим мембранам принадлежит важная роль в структурной организации и функционировании клеток. Функции мембран чрезвычайно многообразны.

1. *Ограничение и обособление клеток и органелл.* Обособление клеток от межклеточной среды обеспечивается плазматической мембраной, защищающей клетки от механического и химического воздействия. Плазматическая мембрана обеспечивает также сохранение разности концентраций метаболитов и неорганических ионов между внутриклеточной и внешней средой.

2. *Контролируемый транспорт* метаболитов и ионов (избирательная проницаемость) определяет внутреннюю среду, что существенно для гомеостаза, т.е. поддержания постоянной концентрации метаболитов и неорганических ионов, и других физиологических параметров. Регулируемый и избирательный транспорт метаболитов и неорганических ионов через поры становится возможным благодаря обособлению клеток и органелл с помощью мембранных систем.

3. *Восприятие* внеклеточных сигналов и их передача внутрь клетки, а также инициация сигналов.

4. *Ферментативный катализ.* В мембранах на границе между липидной и водной фазами локализованы ферменты, где происходят реакции с неполярными субстратами. В мембранах локализованы наиболее важные реакции энергетического обмена (окислительное фосфорилирование и фотосинтез).

5. *Контактное взаимодействие* с межклеточным матриксом и *взаимодействие с другими клетками* при слиянии клеток и образовании тканей.

6. *Заякоривание цитоскелета*, обеспечивающее поддержание формы клеток и органелл и клеточной подвижности.

4.1. Структура мембран

Все биологические мембраны имеют общие признаки строения.

1. Мембраны являются *сложными структурами, построенными из липидов, белков и углеводов.*

2. Соотношение белков и липидов в мембранах варьирует от 1:4 до 4:1 и зависит от типа клеток и органелл.

3. Мембраны являются *асимметричной* структурой с наружной и внутренней поверхностями.

4. Мембрана стабилизируется *нековалентными* связями и является *термодинамически стабильной и метаболически активной.*

5. Специфические белки встроены в мембраны и выполняют *специфические функции* рецепции управляющих сигналов, межклеточного взаимодействия, транспорта веществ и пр.

Основными *липидами* мембран являются *фосфолипиды, гликолипиды и холестерин*.

1. В мембранах присутствуют 2 основных класса *фосфолипидов*:

1) *Глицерофосфоглицериды* являются основным компонентом большинства мембран и состоят из спирта *глицерина*, 2-х остатков жирных кислот и фосфорилированного спирта. Жирные кислоты содержат *четное число атомов углерода* (чаще 16 и 18). Жирные кислоты *неразветвленные* и могут быть *насыщенными* (чаще в 1 положении) и *ненасыщенными* (чаще во 2 положении).

2) *Сфингомиелины* содержат спирт *сфингозин*. Жирная кислота присоединяется амидной связью к аминогруппе сфингозина. Первичная гидроксильная группа сфингозина эстерифицируется фосфорилхолином. Сфингомиелины находятся преимущественно в миелиновых оболочках.

2. *Гликолипиды* являются сахаросодержащими липидами и делятся на *ганглиозиды* и *цереброзиды*. *Цереброзиды* вместо фосфорилированного спирта содержат остаток гексозы (глюкозу или галактозу). *Ганглиозиды* содержат цепь из 3 и более остатков углеводов (например, сиаловые кислоты), которые присоединяются к первичной спиртовой группе сфингозина.

3. *Стероиды*. Основным стероидом в мембранах является *холестерол* (рис. 4.1), который находится преимущественно в плазматической мембране клеток.

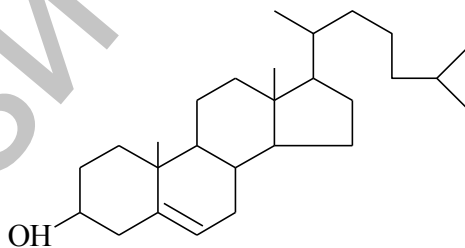


Рис.4.1. Холестерол

Холестерол в основном встречается в *наружном слое* плазматической мембраны. Холестерол встроен *между молекулами фосфолипидов* так, что его гидроксильная группа обращена к водной поверхности, в гидрофобное кольцо находится в толщине липидного слоя.

Мембрана является амфипатической структурой.

1. Все молекулы липидов, входящих в состав мембран, имеют гидрофильную и гидрофобную области и поэтому являются *амфипатическими*.

2. Амфипатические липиды мембран имеют *полярную головку* и *неполярные гидрофобные хвосты* (рис. 4.2).



Рис. 4.2. Структура липидов мембран.

3. Насыщенные жирные кислоты имеют прямые хвосты, ненасыщенные жирные кислоты имеют цис-конформацию и изогнутые хвосты, что делает мембрану менее жесткой и более текучей.

4. Липиды формируют *бислой*, в котором гидрофобная область фосфолипидов защищена от воды, а гидрофильная область обращена к воде (рис. 4.3).

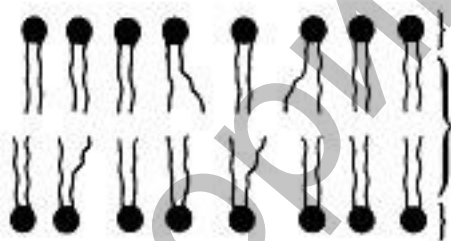


Рис. 4.3. Строение липидного бислоя.

По расположению *белков* в мембране, способу их ассоциации с липидным бислоем их можно разделить на: поверхностные (периферические) мембранные белки, связанные с гидрофильной поверхностью липидного бислоя; интегральные мембранные белки, погруженные в гидрофобную область бислоя.

1. *Периферические* белки связаны с гидрофильной поверхностью бислоя своими полярными радикалами с образованием нековалентных (ионных, водородных) связей. Многие периферические белки взаимодействуют нековалентными связями с гидрофильной областью интегральных белков. Периферические белки могут быть выделены без разрушения мембраны концентрированными солевыми растворами или изменением pH. Многие рецепторы для гормонов являются периферическими белками.

2. *Интегральные* белки погружены в мембрану на определенную глубину или пронизывают мембрану насквозь (прошивающие). Такие белки могут быть экстрагированы только при разрушении мембраны органическими растворителями или детергентами.

Трансмембранные белки могут в виде нескольких α -спиралей или одиночной α -спирали пересекать мембрану. При этом большая

(гидрофильная) часть такого белка экспонирована в воду. Некоторые белки могут проникать только на расстояние одного монослоя мембраны.

Интегральные белки, подобно липидам, обладают амфипатическими свойствами у них есть гидрофобные области, взаимодействующие с гидрофобными радикалами липидных молекул внутри бислоя, и гидрофильные, обращенные с обеих сторон мембраны к воде.

Если основные структурные особенности биологических мембран определяются свойствами их липидного бислоя, то специфические функции мембран – белками.

1. На основании роли белков в мембране их можно разделить на две группы: *структурные* и *динамические белки*. Структурные белки поддерживают структуру всей мембраны. Это, как правило, периферические белки, выступающие в роли «молекулярного бандажа». Динамические белки непосредственно участвуют в процессах, происходящих на мембране. Выделяют три класса таких белков:

1) *транспортные* – участвующие в трансмембранном переносе веществ;

2) *каталитические* – это ферменты, интегрированные в мембрану и катализирующие происходящие там реакции;

3) *рецепторные* – это мембранные рецепторы, специфически связывающие такие соединения, как гормоны, нейромедиаторы, токсины, на наружной стороне мембраны, что служит сигналом для изменения метаболических процессов в мембране или внутри клетки.

2. *Углеводы мембран*. В составе мембран углеводы находятся только в соединении с белками (гликопротеины и протеоглики) и липидами (гликолипиды). В мембране гликозилировано около 10% всех белков и 5-25% липидов. Углеводные цепи белков колеблются по составу от 2-х членных структур до разветвленных 18-членных полисахаридов.

Функции углеводов:

1) определяют межклеточное взаимодействие;

2) участвуют в системе иммунитета (антигенные детерминанты групп крови);

3) входят в состав рецепторов.

Выделяют основные характеристики мембран:

1. *Текучность (жидкостьность) мембраны*. Текучность мембраны характеризуется способностью компонентов мембраны к движению. Текучность мембраны определяется липидным составом, процентом полиненасыщенных жирных кислот и холестерина. Особое влияние на текучность мембраны оказывает четырехчленное кольцо холестерина, погруженное в липидный бислой. У эукариотических клеток при температуре 37°C холестерин ограничивает текучность мембраны, а при более низких температурах он, наоборот, способствует поддержанию их текучести, препятствуя слипанию углеводородных цепей. Текучность

влияет на функцию мембраны. При повышении текучести увеличивается проницаемость для воды и других гидрофильных молекул.

2. *Избирательная проницаемость.* Это свойство обеспечивает регуляцию транспорта в клетку необходимых молекул, а также удаления из клетки продуктов метаболизма, т.е. активный обмен клетки и ее органелл с окружающей средой. Избирательный транспорт необходим также для поддержания трансмембранного градиента ионов, служит основой всех биоэнергетических механизмов, определяет эффективность процессов рецепции, передачи нервного возбуждения и т.п.

3. *Асимметричность мембраны.* По химическому составу наружная поверхность мембран отличается от внутренней.

1) Мембраны асимметричны по липидному составу. Существует асимметрия расположения фосфолипидов в мембране. Фосфатидилхолин и сфингомиелины локализованы в наружном слое мембран, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин – во внутреннем. Холестерол находится преимущественно в наружном бислое.

2) Белки в мембранах расположены асимметрично (расположение периферических белков, различная степень погружения интегральных белков).

3) Наиболее асимметрично распределены в плазматической мембране гликолипиды и гликопротеины. Углеводные части гликолипидов и гликопротеинов выходят на наружную поверхность, иногда образуя сплошное покрытие на поверхности клетки – гликокаликс.

4. *Динамичность мембран.* Отдельные молекулы мембранных липидов и белков способны перемещаться в мембране, т.е. они сохраняют способность к диффузии. Молекулы белков и липидов с высокой скоростью двигаются в плоскости мембраны (*латеральная диффузия*). Они легко меняются местами со своими соседями в пределах одного монослоя примерно в 10 раз в секунду. Молекулы белков, так же как и липидов, способны к латеральной диффузии, однако скорость их диффузии в несколько раз ниже, чем молекул липидов. Перемещение мембранных белков в латеральной плоскости может быть ограничено вследствие притяжения между функционально связанными белками и образования кластеров, что в конечном счете приводит к их мозаичному распределению в липидном слое.

Кроме того, молекулы белков и липидов очень быстро вращаются вокруг своих продольных осей (*вращательная диффузия*).

Перескок липидных молекул из одного монослоя в другой (поперечная диффузия, flip-flop) осуществляется редко, а белки к такому перескоку вообще не способны. Причина исключительно медленного flip-flop заключается в его энергетической невыгодности, поскольку необходимо перенести полярную головку молекулы липида через гидрофобную область бислоя.

4.2. Модели строения мембран

С.Дж.Сингер и Л.Г.Никольсон в 1972 г. предложили «жидкостно-мозаичную модель» строения мембраны. Согласно этой модели мембрана представляет собой липидный бислой, в котором расположены глобулярные белки. Каждая молекула липидов расположена так, что ее неполярная углеводородная часть направлена внутрь бислоя, а полярные головки находятся на поверхности, контактируя с водой. По этой модели, мембрана представляет собой динамическую систему, в которой молекулы белка относительно свободно «плавают в липидном море в виде айсбергов».

Существует решетчато-мозаичная модель. Молекулы белков, которые связаны с цитоскаркасом, малоподвижны. Те белки, которые с цитоскаркасом не связаны, могут относительно свободно перемещаться в плоскости мембраны (рис. 4.4).

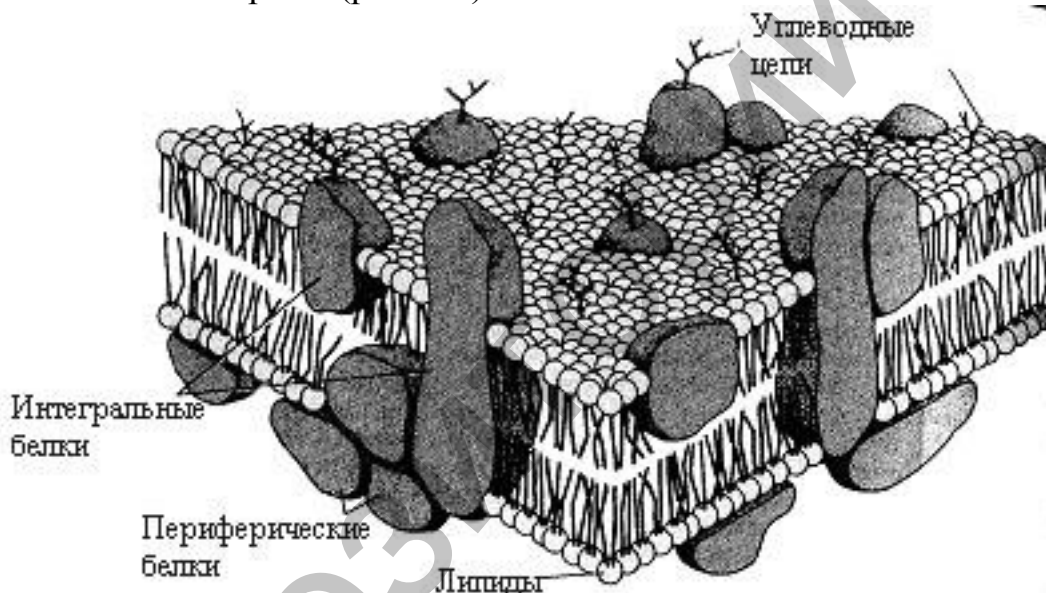


Рис. 4.4. Строение плазматической мембраны эукариотической клетки.

4.3. Механизмы мембранного транспорта

Липидные бислои в значительной степени непроницаемы для подавляющего большинства веществ, и поэтому перенос через липидную фазу требует значительных энергетических затрат.

Различают активный транспорт и пассивный транспорт (диффузию).

Пассивный транспорт – это перенос молекул по концентрационному или электрохимическому градиенту, т.е. он определяется только разностью концентраций переносимого вещества на противоположных сторонах мембраны или направлением электрического поля и осуществляется без

затраты энергии АТФ. Возможны два типа диффузии: простая и облегченная (рис. 4.5).

1. *Простая диффузия*. Происходит без участия мембранного белка. Скорость простой диффузии хорошо описывается обычными законами диффузии для веществ, растворимых в липидном бислое. Скорость движения молекулы определяется концентрационным градиентом и растворимостью молекулы в липидах. Механизм диффузии водорастворимых веществ менее изучен. Перенос вещества через липидный бислой, например, таких соединений, как этанол, возможен через временные поры в мембране, образованные разрывами в липидном слое при движении мембранных липидов. В мембранах также существуют каналы, образованные белками, через которые могут двигаться молекулы. По механизму простой диффузии осуществляется трансмембранный перенос газов (например, O_2 и CO_2), воды, некоторых простых органических ионов и ряда низкомолекулярных жирорастворимых соединений. Следует помнить, что простая диффузия осуществляется неизбирательно и отличается низкой скоростью.

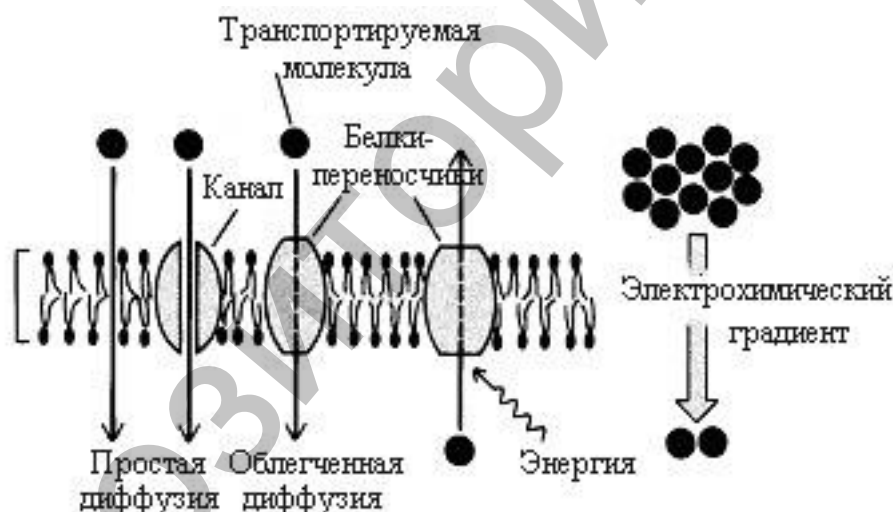


Рис. 4.5. Механизмы пассивного транспорта.

2. *Облегченная диффузия* – движение молекул по градиенту концентрации с использованием специфических мембранных белков-переносчиков. Следовательно, облегченная диффузия – это диффузионный процесс, сопряженный с химической реакцией взаимодействия транспортируемого вещества с белком-переносчиком. Этот процесс специфичен и протекает с более высокой скоростью, чем простая диффузия. Скорость переноса определяется концентрационным градиентом через мембрану и количеством молекул переносчика.

Известны два типа мембранных транспортных белков: белки-переносчики, называемые *транслоказами* или *пермеазами*, и белки *каналообразующие*.

3. *Активный транспорт* – это *транспорт веществ против градиента концентрации*, с использованием переносчика и затратой энергии. Источником энергии может быть АТФ, градиент концентрации или солнечная энергия. Различают *первичный активный транспорт* и *вторичный активный транспорт*.

В первичном активном транспорте используется энергия гидролиза АТФ. Известны три основных типа первичного активного транспорта:

1) Натрий-калиевый насос – Na/K^+ -аденозинтрифосфатаза (Na/K^+ -АТФ-аза) переносит ионы натрия из клетки, а калия – в клетку.

2) Кальциевый насос – Ca^{2+} -АТФ-аза, который транспортирует Ca^{2+} из клетки или цитозоля в саркоплазматический ретикулум.

3) H^+ -АТФ-аза – протонный насос, функционирующий в сопрягающих мембранах, в том числе в митохондриальной мембране.

Для активного транспорта, как и для облегченной диффузии, характерны высокая специфичность, эффект насыщения транспортных белков транспортируемыми молекулами, а также действие ингибиторов.

В качестве примера первичного активного транспорта можно привести транспорт, осуществляемый Na^+, K^+ -АТФ-азой, как одной из наиболее важных и широко распространенных активных транспортных систем в плазматической мембране животных- клеток.

Клетка содержит низкую концентрацию Na^+ (в 10 раз ниже) и высокую концентрацию K^+ (в 30 раз выше), чем в окружающей среде. Na^+, K^+ -АТФ-аза была открыта в 1957 г. Й.Скоу во фракции плазматических мембран нервов краба, впоследствии она была обнаружена во всех исследованных клетках животных, особенно велико ее содержание в органах, осуществляющих солевой обмен (почки) или выполняющих электрическую работу (мозг, нервы).

Na^+, K^+ -АТФ-азой является интегральным мембранным белком (м.м. 250 000). Состоит из 2-х α и 2-х β субъединиц. α -Субъединица пронизывает мембрану насквозь и имеет центры связывания для АТФ и Na^+ на цитоплазматической стороне мембраны и центры для связывания с K^+ на внешней стороне. β -субъединицы содержат углеводные группы, расположенные на наружной стороне плазматической мембраны. Она способствует правильной ориентации ферментов в липидном бислое. Перенос ионов происходит за счет изменения конформации фермента при его фосфорилировании-дефосфорилировании за счет АТФ.

По общепринятому представлению, механизм действия АТФ-азы включает несколько стадий.

1. Присоединение 3Na^+ вызывает активацию АТФ-азы, происходит гидролиз АТФ и фосфорилирование фермента.

2. Фосфорилирование фермента вызывает изменение конформации и открытие канала снаружи. АТФ-аза теряет сродство к ионам натрия и 3Na^+ выводятся через канал на наружную сторону.

3. Два иона K^+ присоединяется к ионсвязывающим центрам фосфорилированного белка.

4. Происходит (возможно, самопроизвольный) гидролиз фосфоэфирной связи и дефосфорилирование фермента, что вызывает его переход в исходную конформацию (открытие канала внутри).

5. Происходит снижение сродства к ионам K^+ и выход их в цитозоль и вновь присоединяется АТФ и 3Na^+ .

Неравнозначный перенос заряженных ионов (частиц) через мембрану вызывает ее поляризацию: появление «+» снаружи и «-» изнутри. Создаваемый градиент используется для вторичного активного транспорта, например, глюкозы в клетки. Переносчик глюкозы обеспечивает транспорт глюкозы в клетку кишечника за счет входа в клетку ионов Na^+ под действием электрохимического градиента (концентрация Na^+ высокая в просвете кишечника и низкая в цитозоле клеток). Глюкоза из клетки переходит во внеклеточную жидкость по механизму облегченной диффузии. Na^+, K^+ -АТФаза поддерживает эту концентрацию Na^+ за счет его откачки в межклеточное пространство в обмен на ионы K^+ с затратой АТФ.

Виды переноса веществ через мембрану

Унипорт – движение одного типа молекул в одном направлении. Наиболее простой вид переноса какого-либо растворенного вещества с одной стороны мембраны на другую, осуществляемый по механизму простой или облегченной диффузии.

Котранспорт – вид транспорта, при котором перенос одного вещества зависит от переноса другого. Осуществляется с помощью транспортных белков, которые имеют центры связывания для переноса обоих веществ.

Симпорт – перенос вещества зависит от одновременного (или последовательного) переноса другого вещества в том же направлении. Например, транспорт протонов и сахаров у бактерий, транспорт Na^+ и глюкозы у животных. При этом натрий транспортируется по градиенту концентрации (вторично-активный транспорт), а молекула глюкозы, присоединенная к тому же переносчику – против градиента концентрации.

Антипорт – перенос одного вещества по градиенту концентрации приводит перемещению другого вещества, присоединенного к этому переносчику с другой сторон мембраны в противоположном направлении против градиента концентрации.

5. *Транспорт макромолекул (везикулярный транспорт)*. Крупные макромолекулы (белки, полисахариды и полинуклеотиды) даже крупные частицы могут как поглощаться, так и секретироваться. При их переносе

происходит последовательное образование и слияние окруженных мембраной пузырьков (везикул), т.е. перенос веществ вместе с частью плазматической мембраны.

Фагоцитоз (от греч. *фагос* – есть, *цитос* – клетка) наблюдается в специальных клетках (макрофагах и гранулоцитах). При фагоцитозе происходит захват крупных молекул (вирусы, бактерии, клетки). **Пиноцитоз** (от греч. *пинос* – пить) характерен для всех клеток. Происходит захват жидкости или растворенных компонентов. Пиноцитоз бывает неизбирательный и селективный рецепторно-опосредованный. При процессе **эндоцитоза** поглощенное вещество окружается небольшим участком мембраны, который вначале впячивается, а затем отщепляется, образуя внутриклеточный пузырек, содержащий захваченный клеткой материал. Большинство частиц, поглощенных при эндоцитозе, попадает затем в лизосомы, где они подвергаются деградации.

Вещества, высвобождаемые путем экзоцитоза делят на 3 группы: 1) вещества, связывающиеся с клеточной поверхностью как периферические белки – антигены; 2) вещества, включающиеся во внеклеточный матрикс – коллаген, гликозаминогликаны; 3) вещества, входящие во внеклеточную среду как сигнальные молекулы (инсулин, катехоламины, паратгормон) или ферменты (экзокринные железы, эктоферменты).

Глава 5. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Метаболизм (*metabole* – греч. изменение, превращение) – это совокупность процессов превращения веществ и энергии в организме, происходящих с участием ферментов. В наиболее употребительном значении термин «метаболизм» равнозначен «обмену веществ». В точном смысле «метаболизм означает промежуточный обмен, т.е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов. Вещества, участвующие в метаболизме, называются *метаболитами*.

5.1. Функции метаболизма и определения

1. Обеспечение организма энергией, полученной при расщеплении *богатых энергией пищевых веществ* или путем *преобразования энергии солнца*.

2. Превращение пищевых веществ в *строительные блоки*, которые используются в клетке для биосинтеза собственных макромолекул.

3. Сборка *макромолекулярных* (биополимеры) и *надмолекулярных структур* живого организма, т.е. пластическое и энергетическое поддержание его структуры.

4. Синтез и разрушение биомолекул, выполняющих специфические функции в организме.

подавляющее большинство реакций в организме катализируются ферментами. Ферментативная цепь химических реакций называется *метаболическим путем*. Метаболические пути всех веществ связаны друг с другом общими метаболитами и образуют единую сетку реакций – *карту метаболизма*. В метаболическом пути продукты одной реакции становятся субстратом для следующей реакции.

Метаболический ответ организма – совокупность биохимических реакций организма, скорости и направленности их протекания при воздействии какого-либо фактора.

По *форме усвояемого углерода* все живые организмы делятся на 2 группы. *Автотрофные клетки* («сами себя питающие») усваивают CO_2 воздуха в процессе фотосинтеза и из него строят все свои органические вещества (фотосинтезирующие бактерии, зеленые растения).

Гетеротрофные клетки («питающиеся за счет других») получают углерод из сложных органических соединений (клетки высших животных и большинства микроорганизмов), т.е. они питаются продуктами жизнедеятельности других клеток. В биосфере автотрофы и гетеротрофы являются участниками кругооборота углерода и кислорода между животным и растительным мирами. По *отношению к кислороду* гетеротрофы делятся на: *аэробы* – требуют наличия кислорода для окисления веществ; *анаэробы* – для окисления питательных веществ кислород не требуется; *факультативные анаэробы* – существуют в кислородной и бескислородной среде; *облигатные анаэробы* – живут только в бескислородной среде. Большинство гетеротрофов – факультативные анаэробы, которые при наличии кислорода используют аэробные метаболические пути.

5.2. Регуляция метаболизма

Существуют следующие механизмы регуляции метаболизма: изменение активности ферментов, количества ферментов, проницаемости клеточных мембран.

1. Изменение *активности ферментов* – самый распространенный способ регуляции метаболизма. Регуляции подвержены «ключевые» ферменты, которые определяют скорость всего полиферментного процесса. Как правило, такие ферменты состоят из субъединиц – олигомерны. Активность фермента зависит от количества, доступности и химического строения субстрата катализируемой реакции, от условий протекания ферментативной реакции в клетке (рН, температуры и др.), от наличия эффекторов (активаторов, ингибиторов), от строения фермента (наличие химической модификации, доступности кофакторов) и др. Изменение активности ферментов играет принципиальную роль в регуляции метаболизма конечными продуктами (ретроингибирование) и реже первыми продуктами (форактивация).

2. Изменение *количества фермента* в клетке осуществляется путем индукции или репрессии генов, а также его протеолитической деградации в клетке. Ферменты, которые присутствуют в клетке в относительно постоянном количестве, называются *конститутивными*. Ферменты, количество которых резко изменяется в зависимости от метаболической ситуации, называются *адаптивными* или *индуцибельными*. Индуцибельные ферменты и их изоферменты чувствительны к протеолизу. Индукция или репрессия генов регулируется гормонами или другими субстратами.

3. Изменение *проницаемости мембран*, или точнее – изменение целого комплекса функций мембран (изменение скоростей потоков метаболитов, газов в клетку и из клетки; компартментализация метаболических процессов, изменение электрохимического потенциала, передача нервных импульсов, функционирование рецепторов др.). Эти три основных механизма лежат в основе действия гормонов.

В организме человека координация метаболизма осуществляется *нервной и эндокринной* системами. Нервная система обеспечивает быструю реакцию на изменение окружающей среды. Нервная клетка секретирует медиаторы, которые связываются с соседними клетками и обеспечивают специфический ответ этих клеток. В эндокринной системе секретируются гормоны, которые поступают в кровь. Большинство гормонов изменяют метаболизм за счет влияния на активность или количество ферментов.

Метаболизм складывается из 2-х фаз – **катаболизм и анаболизм**.

Катаболизм – это *ферментативное расщепление* крупных пищевых или депонированных молекул до более простых с *выделением энергии* и запасанием ее в виде макроэргических соединений. Катаболизм включает 3 стадии.

1 стадия - полимеры превращаются в мономеры (крахмал и гликоген – в глюкозу, белки – в аминокислоты, триацилглицерины – в жирные кислоты и глицерин, нуклеиновые кислоты – в нуклеотиды и т.д.). 1 стадия пищевых молекул протекает в желудочно-кишечном тракте и называется перевариванием.

2 стадия (специфические пути катаболизма) – мономеры превращаются в общие промежуточные продукты – пируват и ацетил-КоА;

3 стадия (общий путь катаболизма) – окисление ацетил КоА до CO_2 и H_2O . 3 стадия катаболизма включает: 1) цикл трикарбоновых кислот, 2) цепи переноса электронов и 3) окислительное фосфорилирование.

Анаболизм – *ферментативный синтез* крупных полимерных молекул из простых предшественников с *затратой АТФ*.

Стадии анаболизма:

1 стадия – третья стадия катаболизма, т.е. ЦТК;

2 стадия – образование мономеров по реакциям, обратным реакциям катаболизма;

3 стадия – синтез полимеров из мономеров.

Амфиболические пути расположены в точках переключения метаболизма и связывают анаболизм и катаболизм. Амфиболическим путем метаболизма является цикл трикарбоновых кислот.

Анаболизм и катаболизм не являются простым обращением реакций. Катаболические и анаболические пути должны отличаться хотя бы одной из ферментативных реакций, чтобы регулироваться независимо. Например, специфический путь распада глюкозы до лактата (гликолиз) включает 11 реакций; обратный процесс – синтез глюкозы из лактата включает 8 обратимых реакций и 3 дополнительные реакции с новыми наборами ферментов. Именно на этих стадиях за счет регуляции активности ферментов регулируются суммарные скорости распада и синтеза глюкозы. Кроме того, реакции катаболизма и анаболизма часто *разделены мембранами* и протекают в разных отсеках (компартаментах) клеток. Например, распад жирных кислот протекает в митохондриях, а синтез – в цитозоле. Локализация специфических метаболических процессов в различных отсеках клеток облегчает независимую регуляцию этих процессов.

Метаболический статус (status – состояние на какой-либо момент времени) – взаимоотношение анаболических и катаболических процессов в организме на определенный момент времени.

5.3. Качественная и количественная оценка метаболизма

Обмен веществ складывается из множества преимущественно катализируемых ферментами реакций. Так в простейшей эукариотической клетке дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), происходит около 1500 биохимических реакций, включающих примерно 850 метаболитов и кофакторов. Анализ обмена веществ включает два этапа: качественная идентификация активно протекающих реакций метаболических путей и количественная оценка потока через метаболические пути.

Качественная оценка метаболических путей включает: 1) выявление тех ферментативных реакций, которые функционируют в данном метаболическом пути в анализируемых клетках живого организма; 2) если определена последовательность нуклеотидов в геноме организма, то возможен компьютерный анализ генов, кодирующих ферменты метаболических путей; 3) в процессе анализа ферментативных превращений веществ в клетке оценивается потребность в кофакторах; 4) с помощью изотопных технологий оценивают распределение атомов метаболитов (например, с помощью хроматографического и масс-спектрометрического анализа судьбы ¹³C-меченых органических метаболитов оценивают превращения углеродных скелетов на протяжении линейных и разветвленных метаболических путей).

После выявления компонентов метаболических путей *количественно оценивают метаболические потоки*. Чаще всего используют концепцию метаболического баланса по концентрациям метаболитов в устойчивом состоянии (steady state). Этот подход оказался наиболее полезным для описания метаболизма у микробов. Важную роль в количественной оценке метаболических путей играет баланс кофакторов

(никотинамидных, адениловых и др. нуклеотидов) и баланс включения меченых атомов в метаболиты этого пути.

Если метаболические процессы происходят в разных отделах (компартаментах) клеток оценивают *ферментативные пути транспорта* метаболитов в эти отделы и дают им количественную характеристику. Исследование ведут в рамках камерных компьютерных моделей, согласно которым в отдельных камерах-компартаментах происходят метаболические превращения связанные потоками метаболитов, интенсивность которых можно оценить коэффициентами.

Контроль метаболических потоков включает несколько уровней: регуляция транскрипции генов, скорости деградации мРНК, трансляции, посттрансляционной модификации белков, белок-белковых взаимодействий, аллостерической регуляции ферментов и взаимодействий в системе метаболит-фермент. Суммируя вышесказанное, можно выделить *общий контроль на уровне регуляции синтеза белков и локальный контроль на уровне системы метаболит-фермент*. По B.Christensen и J. Nielsen (1999) контроль метаболизма описывается уравнением $v=f(e)g(c)$, согласно которому оборот ферментативных реакций является функцией концентрации ферментов e и концентрации всех метаболитов (показанных через вектор c).

5.4. Биохимия питания

Человек и животные являются гетеротрофами, т.е. получают питательные вещества и энергию извне в виде органических соединений.

Выделяют *основные компоненты* пищи – белки, липиды, углеводы, и *минорные компоненты* – витамины и микроэлементы. Соотношение основных компонентов в пище должно составлять 1:1:4, т.е. 100 г белков, 100 г липидов и 400 г углеводов. Энергетическая ценность 1 г белков – 4,1 ккал (17,2 кДж), 1 г жиров – 9,3 ккал (39 кДж), 1 г углеводов – 4,1 ккал (17,2 кДж), 1 г спирта – 7,1 ккал (29,7 кДж). Эти компоненты определяют *энергетическую ценность* пищи и их соотношение в зависимости от выполняемой работы может временно изменяться.

Биологическая ценность пищи определяется ее компонентами, не способными синтезироваться в организме. Для большинства птиц и млекопитающих известны около 38 незаменимых компонентов пищи, включая 10 аминокислот, 1-3 полиненасыщенные жирные кислоты, 13 витаминов и по крайней мере 14 минералов. Из 100 г белков 50% должны составлять белки *животного происхождения*, т.к. в них содержатся незаменимые аминокислоты. Из 100 г жиров – 25% растительные масла, т.к. в них находятся *полиненасыщенные жирные кислоты* (линолевая, линоленовая), которые не синтезируются в организме.

В зависимости от расположения ферментов пищеварение у животных и человека может быть 3-х видов: *полостное* (гидролиз ферментами, находящимися в свободном виде), *мембранное*, или пристеночное (гидролиз ферментами, находящимися в составе мембран) и *внутриклеточное* (гидролиз ферментами, находящимися в органоидах клетки).

5.5. Экология питания беспозвоночных

Учитывая особенности обитания, многие беспозвоночные нуждаются в особых источниках питания. Например, для формирования защитных покрытий моллюсков (кутикула, раковины) требуются большие количества карбоната кальция. Его получают из окружающей воды, но в процессе линьки (смены защитных покрытий) используется запасенный в организме карбонат кальция. Образование кутикулы насекомых связано с перекрестным связыванием полипептидных цепей за счет взаимодействий радикалов фенилаланина или тирозина. Поэтому в пище насекомых требуется относительно большее содержание этих аминокислот по сравнению с животными. У некоторых видов возможно замещение аминокислот другими органическими молекулами (спаринг). Так, кузнечики *Anacridium melanorhodon*, питаясь листьями деревьев и кустарника, получают много танниновой кислоты. Танниновая кислота является полимером, состоящим из единиц - ароматических колец, образованных радикалами тирозина или фенилаланина (галлотанин). Галлотанин гидролизуется в средней кишке насекомого до галловой кислоты, которая затем используется для склерозирования кутикулы насекомого вместо фенилаланина. *Drosophila patcha* питается тканями кактуса *Lophoceros schottii*, который содержит только стеролы лофенол и шотенол. Личинки этой мушки утилизируют только эти стероиды и не могут использовать холестерол или другие фитостеролы.

При неадекватном питанием способом выживания беспозвоночных является их симбиотические отношения с микроорганизмами, грибами. Эктосимбиоз характерен для высших термитов (*Macrotermitinae*), жуков-короедов и лесных ос (*Siricidae*), которые не имеют ферментов расщепления целлюлозы и лигнина. Самки этих насекомых переносят споры специфических грибов при переселении в новый регион леса. Эти грибы не только расщепляют целлюлозу растений, но и накапливают азот, поэтому их плодовое тело служит питанием для насекомых. Возможен и эндосимбиоз, когда в просвете кишечника насекомых или внутри их специализированных клеток, называемых бактериоцитами, живут микроорганизмы. У примитивных термитов (*Kalotermitidae*) и некоторых лесных тараканов (*Cryptocercus*) в проксимальных отделах кишечника живут микроорганизмы, способные переваривать целлюлозу и создавать метаболиты, которые могут утилизировать эти насекомые. Симбиоз фотосинтезирующих водорослей с морскими беспозвоночными (губки, моллюски, кораллы и др.) позволяет использовать фиксированный в процессе фотосинтеза углерод для построения тела беспозвоночных. Близкий тип симбиоза водных беспозвоночных возможен с хемоаутоотрофными бактериями, продуцирующими энергию при окислении неорганических сульфатов или метана. Эта энергия, трансформированная в АТФ, используется для синтеза углеводов из углекислого газа и аминокислот из аммонийных солей и нитратов, что и служит питанием для беспозвоночных.

5.6. Экология питания позвоночных

Пищевые белки служат для поддержания количества белков, липидов и углеводов в организме в то время, как пищевые липиды и углеводы не могут быть использованы для синтеза белков, поскольку из них не могут синтезироваться 10 незаменимых аминокислот. Кошки утратили способность к синтезу *таурина*, вследствие чего их диета должна обогащаться этой аминокислотой. Белковое питание должно быть усилено в период роста организма и постепенно ослабевает с возрастом животных. Потребность в белках пищи усиливается в периоды кладки яиц у птиц или лактации у млекопитающих. В экстремальных условиях существования белки могут использоваться для энергетических целей, что ведет к истощению животных.

Углеводы являются основными источниками энергетического обмена живых организмов. Их углеродные скелеты служат для синтеза других органических молекул. Белки и жиры могут частично превращаться в углеводы. Поэтому углеводы являются обычным, а не незаменимым компонентом пищи. Для высших млекопитающих целлюлоза может рассматриваться как незаменимый компонент пищи, так как она не синтезируется в организме, но необходима для перистальтики кишечника и жизнедеятельности микроорганизмов, обитающих в проксимальных отделах пищеварительного тракта.

Липиды являются компонентом мембранных структур клеток. Животные способны синтезировать жирные кислоты из простых предшественников. Углеводы и липиды используются соответственно как краткосрочные и долгосрочные источники энергии. Углеводы растений – крахмал и целлюлоза – служат для питания позвоночных разными путями. Если для катаболизма крахмала имеются клеточные ферменты (амилазы), то для расщепления целлюлозы позвоночные утратили целлюлазу и расщепление этого полисахарида осуществляют симбионты, а именно микроорганизмы пищеварительного тракта. Незаменимые жирные кислоты служат для построения структурных компонентов мембран и синтеза простагландинов.

Витамин С требуется для полноценного питания рыб и ряда млекопитающих (летучие мыши, морские свинки и некоторые приматы). Некоторые позвоночные способны синтезировать витамин С в почках (амфибии, рептилии, неперелетные птицы) или в печени (большинство млекопитающих). Примерно половина перелетных птиц также могут синтезировать витамин С в печени. Микроорганизмы пищеварительного тракта млекопитающих способны синтезировать витамины К и В₁₂.

Активность пищеварительных ферментов у позвоночных, включая панкреатические протеазы, амилазу и липазу также как и кишечные аминопептидазу, сахаразу и мальтазу, изменяется в соответствии с количеством определенных субстратов в пище, т.е. количество и активность протеаз увеличивается при белковой диете, а активность гликозидаз – при углеводной диете. У диких птиц активность пищеварительных ферментов подчиняется этому правилу только при белковом питании; при усиленном углеводном питании активность дисахаридаз не изменяется. У некоторых видов птиц скорость всасывания глюкозы также не зависит от количества углеводов в пище.

5.7. Экологические проблемы запасаания и распределения пищевых молекул

Запасаемые молекулы должны быть нерастворимыми, компактными и нетоксичными. Многие витамины и минеральные вещества, включая железо, токсичны, поэтому запасаются в малых количествах, обычно в связи со специализированными белками в печени; в скелете запасаются кальций и фосфор. Большинство животных способны не только получать глюкозу с продуктами питания, но и синтезировать ее в глюконеогенезе из аминокислот, освобождающихся при распаде белков. *Глюконеогенез* (см. обмен углеводов) из аминокислот достаточно медленный и расточительный процесс, поскольку при этом увеличивается выведение аминных групп из метаболизма. В печени небольшие количества белка и свободных аминокислот (глутамин) создают резервный фонд предшественников для синтеза как белков и нуклеиновых кислот, так и глюкозы. Животные, которые используют белки для энергетических нужд, быстро истощаются.

К энергоемким молекулам животных, которые могут запасаться в больших количествах, относятся гликоген, триацилглицеролы, эфиры глицерола, свободные жирные кислоты (12-24 С). Резервирование углеводов сопровождается *задержкой*

воды. Углеводы и глицерол метаболизируются в аэробных и анаэробных условиях, а длинноцепочечные жирные кислоты окисляются только в присутствии кислорода. В связи с этим резервирование и использование липидов возможно только у живых организмов с эффективным потреблением и транспортом кислорода.

У большинства животных наличие ненасыщенных жирных кислот в триацилглицеролах и фосфолипидах определяет жидкость липидсодержащих структур при нормальной температуре тела. Запасание липидов у пойкилотермных животных сопряжено с большим содержанием ненасыщенных жирных кислот по сравнению с гомеотермными. Виды, обитающие в холодных регионах, содержат больше полиненасыщенных жирных кислот. Это позволяет сохранить жидкостное состояние мембран при близких к замерзанию биологических жидкостей температурах. Морские водоросли содержат большее количество ненасыщенных жирных кислот, чем сухопутные растения. Поэтому животные, питающиеся фитопланктоном, получают ненасыщенные жирные кислоты водорослей для построения мембранных структур. Эти животные способны удлинять жирные кислоты до 22-24 С и подвергать их десатурации (введению двойных связей).

Животные могут синтезировать насыщенные (пальмитиновая, стеариновая, миристиновая) и мононенасыщенные жирные кислоты (пальмитолеиновая и олеиновая). Они не могут синтезировать жирные кислоты с 2 и 3 двойными связями (линолевая, линоленовая). В клетках животных нет десатураз, катализирующих процесс введения двойных связей в жирные кислоты. Только у рuminантных животных возможно всасывание полиненасыщенных жирных кислот, которые образуются с помощью микробных десатураз в многокамерном желудке.

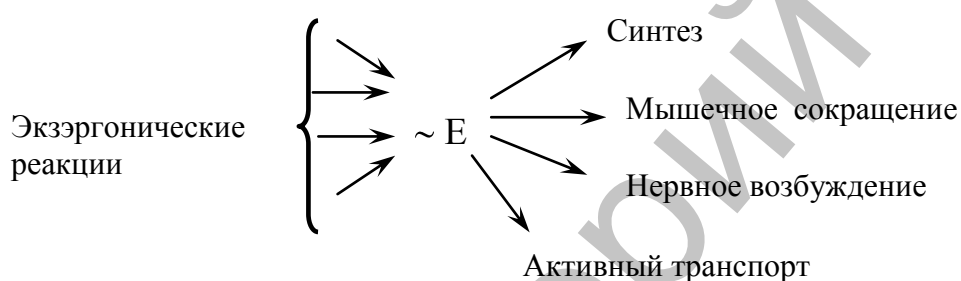
Липиды накапливаются в тканях животных, которые питаются ω -3 полиненасыщенными жирными кислотами из морских водорослей. В тканях таких животных накапливаются липиды, часто называемые «рыбий жир», хотя они есть не только у рыб, но и у птиц и морских животных. Обитающие в северных водах сельди, шпроты, макрель запасают больше липидов, чем их тропические родственники. Эти липиды содержат больше ненасыщенных жирных кислот, поступающих из съеданного фитопланктона. Сардины, анчоусы и другие южные рыбы, которые питаются беспозвоночными планктона, содержащими много восков, также запасают ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты. Для сравнения отметим, что сухопутные животные получают от растений в основном ω -6 полиненасыщенные жирные кислоты. Поэтому пресноводные рыбы, земноводные и насекомые, которые питаются детритом сухопутного происхождения, содержат больше ω -6 полиненасыщенных жирных кислот, чем морские животные.

Многие позвоночные, грызуны, амфибии, способные впадать в зимнюю спячку, обеспечивают свою жизнеспособность за счет: 1) создания резервов липидов, обогащенных полиненасыщенными жирными кислотами и 2) способности к регулируемому расходованию (окислению) липидов для энерготрат. Таким образом, запасание и расходование энергии у разных видов сопряжены с адаптацией к экологическим условиям их обитания.

Глава 6. БИОЭНЕРГЕТИКА

Биоэнергетика, или *биохимическая термодинамика*, занимается изучением энергетических превращений, сопровождающих биохимические реакции. Изменение свободной энергии (ΔG) – это та часть изменения внутренней энергии системы, которая может превращаться в работу. Иначе говоря, это полезная энергия и выражается уравнением $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$,

где ΔH – изменение энтальпии (теплоты), T – абсолютная температура, ΔS – изменение энтропии. Энтропия служит мерой неупорядоченности, хаотичности системы и возрастает при самопроизвольных процессах. Если ΔG отрицательно, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют *экзергоническими*. Если ΔG положительно, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такая реакция называется *эндэргонической*. При ΔG равном нулю система находится в равновесии. Жизненно важные процессы в организме – реакции синтеза, мышечное сокращение, проведение нервного импульса, транспорт через мембраны – получают энергию путем химического сопряжения с окислительными реакциями, в результате которых происходит высвобождение энергии. Т.е. эндэргонические реакции в организме сопряжены с экзергоническими.



Для сопряжения эндэргонических реакций с экзергоническими реакциями необходимы аккумуляторы энергии в организме, в которых запасается примерно 50% энергии.

6.1. Аккумуляторы энергии в организме

В ходе экзергонических реакций (например, окислительных) выделяется энергия. Примерно 40-50% ее запасается в специальных аккумуляторах. Выделяют 3 основных аккумулятора энергии:

1. *Внутренняя мембрана митохондрий* – это промежуточный аккумулятор энергии при получении АТФ. За счет энергии окисления веществ происходит «выталкивание» протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. В результате создается электрохимический потенциал на внутренней мембране митохондрий. При разрядке мембраны энергия электрохимического потенциала трансформируется в энергию АТФ: $E_{\text{ОКИСЛ.}} \rightarrow E_{\text{ЭХП}} \rightarrow E_{\text{АТФ}}$. Для реализации этого механизма внутренняя мембрана митохондрий содержит ферментативную цепь переноса электронов на кислород и АТФ-синтазу (протонзависимую синтазу АТФ).

2. *АТФ и другие макроэргические соединения*. Материальным носителем свободной энергии в органических веществах являются химические связи между атомами. Обычным энергетическим уровнем

возникновения или распада химической связи является $\sim 12,5$ кДж/моль. Однако имеется ряд молекул, при гидролизе связей которых выделяется более 21 кДж/моль энергии (табл. 6.1). К ним относятся соединения с макроэргической фосфоангидридной связью (АТФ), а также ацилфосфаты (ацетил-фосфат, 1,3-БФГК), енол-фосфаты (фосфоенолпируват) и фосфогуанидины (фосфокреатин, фосфоаргинин).

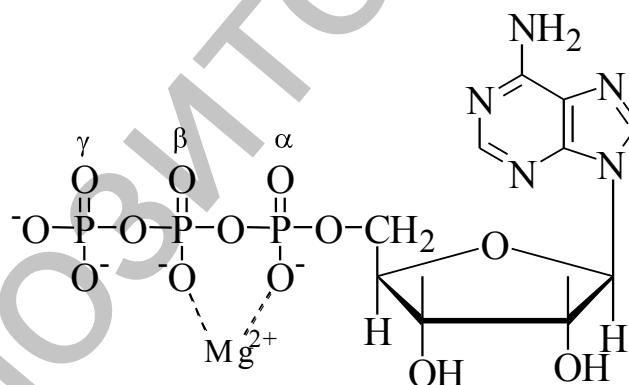
Таблица 6.1

Стандартная свободная энергия гидролиза некоторых фосфорилированных соединений

Соединение	$\Delta G^{0'}$ (кДж/моль)
Фосфоенолпируват	-61,9
1,3-Бисфосфоглицерат	-49,4
Ацетил-фосфат	-43,1
Фосфокреатин	-43,1
Пирофосфат (PP _n)	-33,5
АТФ ($\rightarrow$АМФ+PP_n)	-32,2
АТФ ($\rightarrow$АДФ+P_n)	-30,5
Глюкозо-1-фосфат	-20,9
Фруктозо-6-фосфат	-13,8
Глюкозо-6-фосфат	-13,8
Глицерол-3-фосфат	-9,2

Примечание: 1 ккал = 4,184 кДж

Основным макроэргическим соединением в организме человека является АТФ.



В АТФ цепочка из трех фосфатных остатков связана с 5'-ОН группой аденозина. Фосфатные группы обозначаются как α , β и γ . Два остатка фосфорной кислоты соединены между собой фосфоангидридными связями, а α -остаток фосфорной кислоты – фосфоэфирной связью. При гидролизе АТФ в стандартных условиях выделяется -30,5 кДж/моль энергии.

При физиологических значениях pH АТФ несет четыре отрицательных заряда. Одной из причин относительной нестабильности фосфоангидридных связей является сильное отталкивание отрицательно заряженных атомов кислорода, которое ослабевает при гидролитическом

отщеплении концевой фосфатной группы. Поэтому такие реакции являются высоко экзэргоническими.

В клетках АТФ находится в комплексе с ионами Mg^{2+} или Mn^{2+} , координационно связанными с α - и β -фосфатом, что увеличивает изменение свободной энергии при гидролизе АТФ до 52,5 кДж/моль.

Центральное место в приведенной шкале (табл. 9.1.) занимает цикл $АТФ \leftrightarrow АДФ + Рн$. Это позволяет АТФ быть как универсальным аккумулятором, так и универсальным источником энергии для живых организмов. В клетках теплокровных АТФ как универсальный аккумулятор энергии возникает двумя путями:

1) аккумулирует энергию более энергоемких соединений, стоящих выше АТФ в термодинамической шкале без участия O_2 – субстратное фосфорилирование: $S \sim P + АДФ \rightarrow S + АТФ$;

2) аккумулирует энергию электрохимического потенциала при разрядке внутренней мембраны митохондрии – окислительное фосфорилирование.

АТФ является универсальным источником энергии для совершения основных видов работы клетки (движение, трансмембранный перенос веществ, биосинтезы): а) $АТФ + H_2O \rightarrow АДФ + Рн$; б) $АТФ + H_2O \rightarrow АМФ + РРн$. Во время интенсивных упражнений скорость использования АТФ может достигать 0,5 кг/мин. Если ферментативная реакция термодинамически невыгодна, то она может осуществиться при сопряжении с реакцией гидролиза АТФ. Гидролиз молекулы АТФ изменяет равновесное отношение субстратов и продуктов в сопряженной реакции в 10^8 раз.

К макроэргическим соединениям относят также нуклеозидтрифосфаты, которые обеспечивают энергией ряд биосинтезов: УТФ – углеводов; ЦТФ – липидов; ГТФ – белков. В биоэнергетике мышц важное место занимает креатинфосфат.

3. $НАДФН + H^+$ ($НАДФН_2$) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный. Это специальный аккумулятор с высокой энергией, который используется в клетке (цитозоль) для биосинтезов. $R-CH_3 + НАДФН_2 + O_2 \rightarrow R-CH_2OH + H_2O + НАДФ^+$ (здесь показано создание ОН-группы в молекуле).

Освобождение энергии в живой клетке осуществляется постепенно, благодаря этому на различных этапах ее выделения она может аккумулироваться в удобной для клетки химической форме в виде АТФ. Различают три фазы, которые совпадают со стадиями катаболизма.

Первая фаза – подготовительная. На этой стадии происходит распад полимеров до мономеров в желудочно-кишечном тракте или внутри клеток. Освобождается до 1% энергии субстратов, которая рассеивается в виде тепла.

Вторая фаза – распад полимеров до общих промежуточных продуктов. Для нее характерно частичное (до 20%) освобождение энергии, заключенной в исходных субстратах. Часть этой энергии аккумулируется в фосфатных связях АТФ, а часть рассеивается в виде тепла.

Третья фаза – распад метаболитов до CO_2 и H_2O с участием кислорода в *митохондриях*. Примерно 80% всей энергии химических связей веществ освобождается в данной фазе, которая сосредотачивается в фосфатных связях АТФ. Строение митохондрий:

1. Внешняя мембрана МХ ограничивает внутреннее пространство; проницаема для O_2 и ряда низкомолекулярных веществ. Содержит ферменты метаболизма липидов и моноаминов.

2. Межмембранное пространство (ММП) содержит аденилаткиназу ($\text{АТФ} + \text{АМФ} \leftrightarrow 2 \text{АДФ}$) и ферменты фосфорилирования АДФ, не связанные с дыхательными цепями.

3. Внутренняя мембрана митохондрий (ВМП): 20-25% от всех белков составляют *ферменты цепей переноса протонов и электронов и окислительного фосфорилирования*. Проницаема лишь для малых молекул (O_2 , мочевины) и содержит специфические трансмембранные переносчики.

4. Матрикс содержит ферменты цикла трикарбоновых кислот, β -окисления жирных кислот (*основные поставщики субстратов окисления*). Здесь находят ферменты автономного митохондриального синтеза ДНК, РНК, белков и др.

Существует мнение, что реально в клетках существует *митохондриальный ретикулум*, посредством которого формируется одна гигантская разветвленная митохондрия. При электронномикроскопическом анализе клеток выявляется общепринятая картина отдельных митохондрий, получаемая в результате поперечных срезов разветвленной структуры митохондрии. При гомогенизировании тканей выделяются отдельные митохондрии как результат замыкания разрушенных мембранных структур митохондрии. Единая для клетки мембранная структура митохондрии может служить для транспорта энергии в любые отделы клетки. Такие митохондрии обнаружены в клетках жгутиковых, дрожжей, ряда тканей (мышцы).

У *бактерий митохондрий нет*, аэробное окисление и образование АТФ протекают в цитоплазматической мембране в особых мембранных образованиях – мезосомах. Мезосомы представлены двумя основными формами – ламеллярной и везикулярной.

В основе биологического окисления лежат *окислительно-восстановительные процессы, определяемые переносом электронов*. Вещество *окисляется, если теряет электроны* или одновременно электроны и протоны (водородные атомы, дегидрирование) или присоединяет кислород (оксигенирование). Противоположные превращения – восстановление.

Способность молекул отдавать электроны другой молекуле определяется *окислительно-восстановительным потенциалом* (редокс-потенциалом, E^0 , или ОВП). Редокс-потенциал определяют путем измерения электродвижущей силы в вольтах. В качестве стандарта принят редокс-потенциал реакции при pH 7,0: $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$, равный - 0,42 В. Чем меньше

потенциал окислительно-восстановительной системы, тем легче она отдает электроны и в большей степени является восстановителем. Чем выше потенциал системы, тем сильнее выражены ее окислительные свойства, т.е. способность принимать электроны. Это правило лежит в основе последовательности расположения промежуточных переносчиков электронов от водородов субстратов до кислорода от НАДН (-0,32 В) до кислорода (+0,82 В).

При изучении окислительных процессов в клетках целесообразно придерживаться следующей схемы использования кислорода (табл. 6.2). Здесь рассматриваются три основных пути: 1) окисление субстрата путем дегидрирования с переносом двух атомов водорода на атом кислорода с образованием H_2O (энергия окисления аккумулируется в форме АТФ, на этот процесс расходуется более 90% кислорода) или молекулу кислорода с образованием H_2O_2 ; 2) присоединение атома кислорода с образованием гидроксильной группы (повышение растворимости субстрата) или молекулы кислорода (метаболизм и обезвреживание устойчивых ароматических молекул); 3) образование кислородных свободных радикалов, служащих как для защиты внутренней среды организма от чужеродных макромолекул, так и для повреждения мембран в механизмах окислительного стресса. *Тканевое дыхание* – часть биологического окисления, при котором происходит дегидрирование и декарбоксилирование субстратов с последующим переносом протонов и электронов на кислород и выделением энергии в виде АТФ.

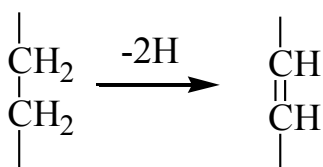
Таблица 6.2

Основные пути использования кислорода в клетках

ОКИСЛЕНИЕ СУБСТРАТА (R)				
Дегидрирование		Оксигенирование		Свободно-радикальное окисление
-2H	-2H	+ $\frac{1}{2} O_2$	+ O_2	$O_2^{\cdot -}$ $HO^{\cdot}$ $NO^{\cdot}$ $ONOO^{\cdot}$ озон
на $\frac{1}{2} O_2$	на O_2			
H_2O	H_2O_2	R-OH	RO ₂	
Тканевое дыхание	Простые окислительные системы	Моноксигенный путь	Диоксигенный путь	
АТФ	Обезвреживание	Обезвреживание	Разрыв ароматических колец	
	Тепло	Тепло		

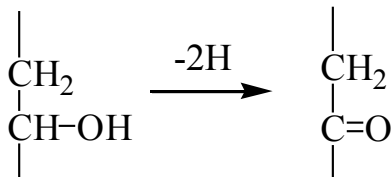
Субстраты окисления – это молекулы, которые при окислении дегидрируются (теряют 2 H). В основе классификации лежит представление о том, что стандартная свободная энергия окисления НАДН составляет $\Delta G^{0'} = -218$ кДж/моль. В связи с этой величиной различают 3 вида субстратов:

1. *Субстраты I рода* (углеводородные) – сукцинат, ацил-КоА.

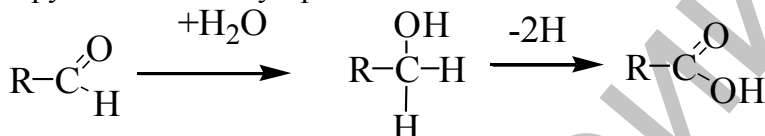


При их дегидрировании образуются непредельные соединения. Средняя энергия отщепления пары e^- около 150 кДж/моль; НАД не может участвовать в дегидрировании субстратов I рода.

2. *Субстраты II рода* (спиртовые) – изоцитрат, малат. При их дегидрировании возникают кетоны. Средняя энергия отщепления пары e^- около 200 кДж/моль, поэтому НАД может участвовать в дегидрировании субстратов II рода.



3. *Субстраты III рода* (альдегиды и кетоны) – глицеральдегид-3-фосфат, а также пируват и 2-оксоглутарат.



Энергия отщепления пары e^- около 250 кДж/моль. Дегидрогеназы субстратов III рода часто содержат несколько коферментов. При этом часть энергии запасается до цепи переноса электронов.

В зависимости от типа субстрата окисления (т.е. от энергии отщепления пары e^-) выделяют полную и укороченную дыхательные цепи (цепи переноса электронов, ЦПЭ). ЦПЭ – это универсальный конвейер по переносу электронов от субстратов окисления к кислороду, построенный в соответствии с градиентом окислительно-восстановительного потенциала. Главные компоненты дыхательной цепи расположены в порядке возрастания их окислительно-восстановительного потенциала. В полную ЦПЭ вступают субстраты II и III рода, в укороченную – субстраты I рода. ЦПЭ встроена во внутреннюю мембрану митохондрий. Атомы водорода или электроны перемещаются по цепи от более электроотрицательных компонентов к более электроположительному кислороду.

6.2. Дыхательные цепи митохондрий

Рассмотрим *полную дыхательную цепь* (ЦПЭ).

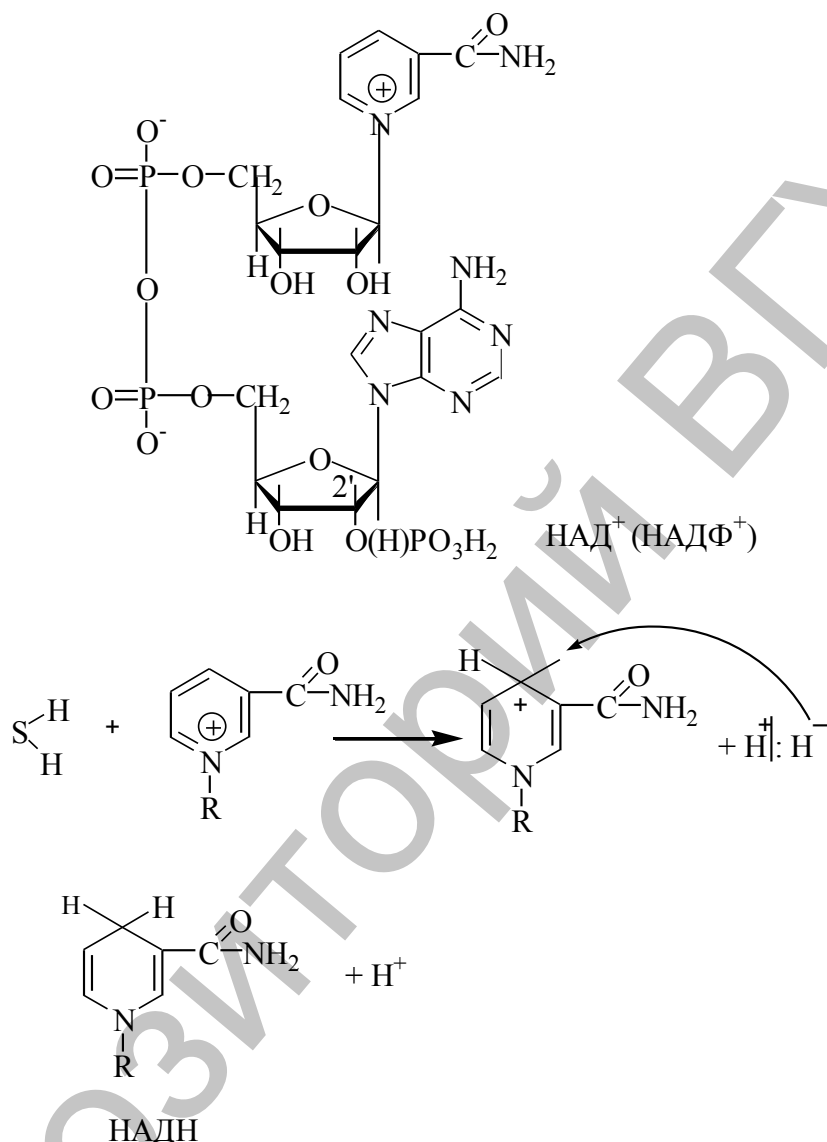
1. Субстраты II и III типов передают протоны и электроны на *НАД-зависимые (пиридинзависимые дегидрогеназы)*, которые локализованы в *матриксе митохондрий*. Их специфичность определяет апофермент.

1) Пиридинзависимые дегидрогеназы – сложные ферменты, у которых в качестве кофермента выступает НАД^+ .

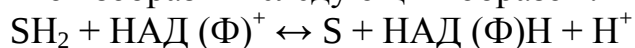
2) Активной частью НАД^+ является никотинамидное кольцо, которое принимает протон и 2 электрона (гидрид-ион, H^-) от субстрата и превращается в восстановленную форму.

3) В состав НАД^+ входит *витамин PP (ниацин, B_5)*.

4) НАД⁺ является коферментом, который *свободно диссоциирует* от апофермента.

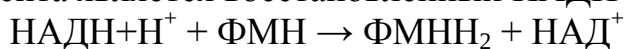


Уравнение реакции, катализируемой пиридинзависимыми дегидрогеназами, можно изобразить следующим образом:

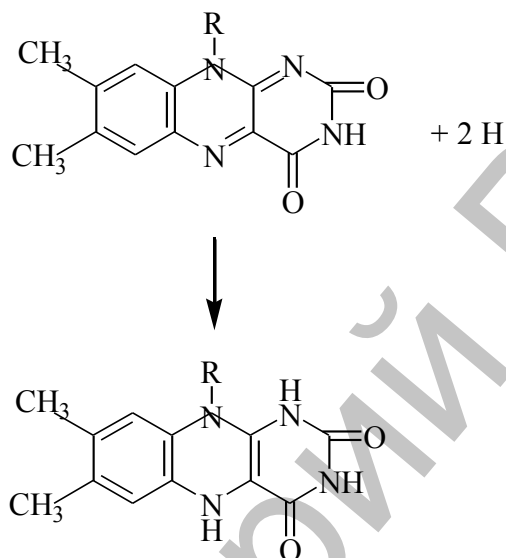
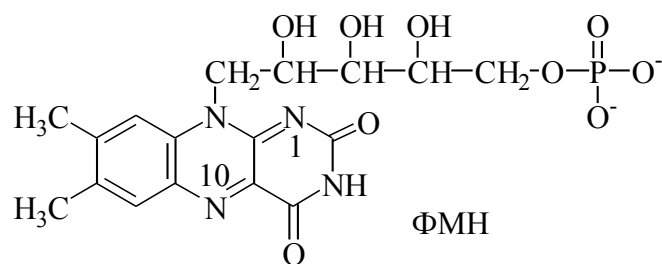


Появление протона в среде позволяет судить о дегидрировании субстрата окисления.

2. Следующим акцептором атомов водорода является *НАДН-дегидрогеназа*, которая содержит 2 простетические группы: производное витамина В₂ – *ФМН* и *железосерные кластеры (FeS)*. Субстратом для фермента является восстановленный НАДН+Н⁺ (иногда пишут НАДН₂).



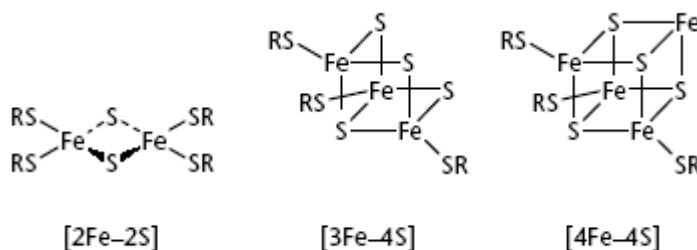
Фермент связан с внутренней мембраной митохондрии и пересекает ее поперечном направлении.



Присоединение 2-х атомов водорода происходит к 1 и 10 атомам азота 6,7-диметилизоаллоксазина.

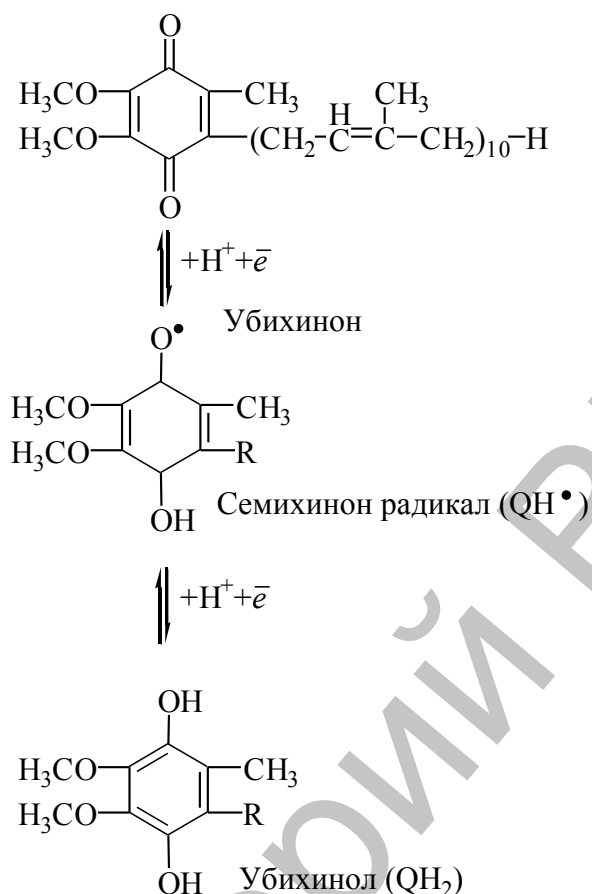
От ФМНН₂ 2ē переносятся на FeS кластеры, содержащие негеминное железо.

FeS кластеры находятся внутри железо-серных белков и играют важную роль в восстановительных реакциях биологических систем. Известно несколько типов FeS кластеров. FeS кластеры содержат один или несколько атомов железа, связанных с SH-группами остатков цистеина или неорганическим кислотолabileм сульфидным ионом. Наиболее простой тип FeS кластера содержит один атом железа, координационно связанный с сульфгидрильными группами остатков цистеина белка. Второй тип, обозначаемый [2Fe-2S], содержит 2 атома железа и 2 неорганических сульфида и 4 остатка цистеина. Третий тип, [4Fe-4S], содержит 4 атома железа, 4 неорганических сульфида и 4 остатка цистеина. НАДН-редуктаза содержит [2Fe-2S] и [4Fe-4S] кластеры.



Перенос электронов в FeS кластерах осуществляется за счет изменения валентности железа $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$.

3. От FeS-кластеров электроны переносятся на кофермент Q.

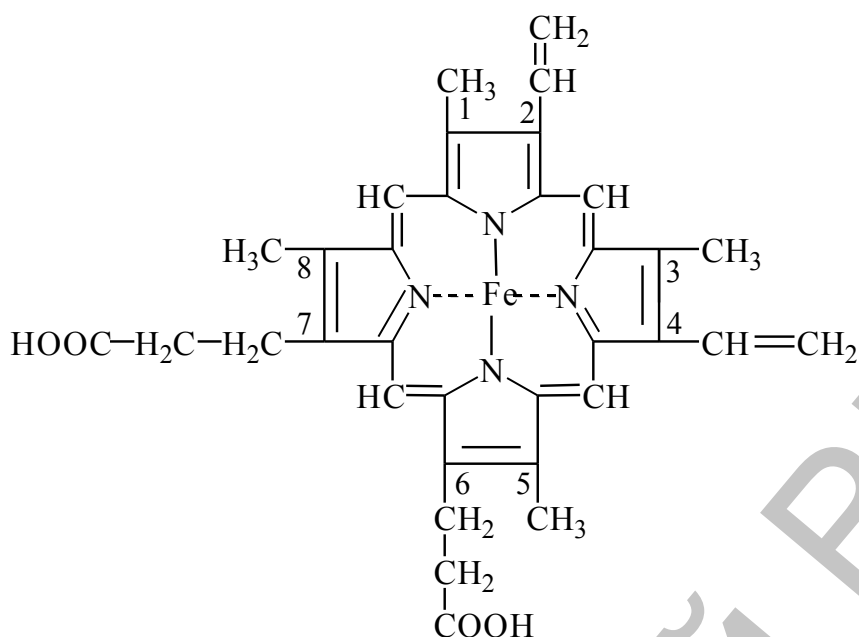


Его называют также убихинон из-за его повсеместного распространения в биологических системах. Кофермент Q – хиноновое производное с длинным изопреноидным хвостом. Число изопреновых единиц в коферменте Q зависит от вида живых организмов. У млекопитающих его наиболее распространенная форма содержит 10 изопреновых единиц и обозначается как Q₁₀. Изопреновый хвост обуславливает высокую неполярность кофермента Q, которая способствует его быстрой диффузии в липидном бислое внутренней мембраны митохондрий.

Убихинон может присоединять один или два электрона и превращаться в семихинон радикал или в убихинол, соответственно. Поскольку убихинон переносит электроны и протоны, он выполняет важную роль в сопряжении потока электронов и протонов.

4. После кофермента Q происходит *одноэлектронный* перенос, в котором участвует система цитохромов. Различают 5 цитохромов: *b*, *c*, *c*₁, *a* и *a*₃. Указанные цитохромы отличаются по структуре и свойствам. Все цитохромы являются белками, у которых простетической группой является гем.

Простетической группой цитохромов *b*, *c*₁ и *c* является железосодержащий протопорфирин IX (гем), который является простетической группой в миоглобине и гемоглобине.



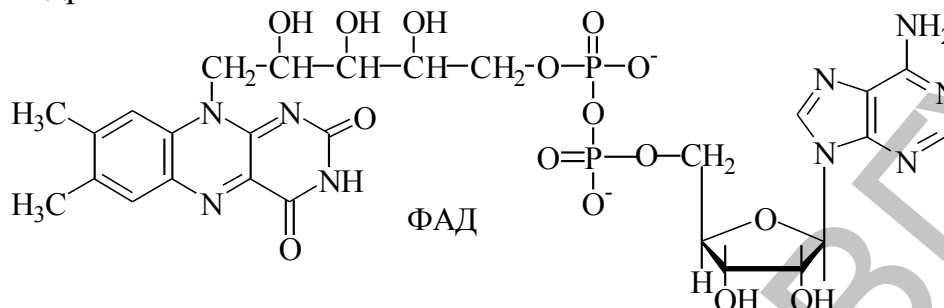
Гем цитохромов *c* и *c*₁, в отличие от цитохрома *b*, ковалентно связан с белком за счет образования тиоэфирных связей между сульфгидрильными группами остатков цистеина и винильных радикалов гема. Цитохромы *a* и *a*₃ имеют иную простетическую группу, которая отличается от цитохромов *c* и *c*₁: 1) вместо формильной группы 8-м положении находится метильная группа; 2) в 4-м положении вместо винильной группы находится углеводородная цепь (C₁₅); 3) гем присоединен к белку нековалентной связью.

Цитохромы *a* и *b* являются интегральными белками внутренней мембраны митохондрий, цитохром *c* является растворимым протеином который связан силами электростатического взаимодействия с наружной стороной внутренней мембраны митохондрий. Перенос электронов цитохромами осуществляется за счет *изменения валентности атома Fe* ($Fe^{3+} \leftrightarrow Fe^{2+}$). Цитохромы *a* и *a*₃ являются конечными звеньями дыхательной цепи и существуют в виде комплекса из 6 субъединиц, который называется *цитохромоксидазой*. Электроны принимаются субъединицами цитохрома *a* и передаются цитохрому *a*₃, который передает их на кислород. Цитохром *a*₃, кроме простетической группы, имеет в своем составе *медь*, которая принимает электрон и восстанавливается ($Cu^{2+} \leftrightarrow Cu^{1+}$), затем передает электрон на кислород, который заряжается отрицательно, приобретает способность взаимодействовать с протонами и образовывать H₂O.

К 6-й координационной связи железа цитохрома *a* может присоединиться HCN, H₂S, CO. При этом валентность железа (Fe^{3+}) становится постоянной и поток электронов прекращается. Это механизм действия дыхательных ядов.

Характеристика *неполной (укороченной) дыхательной цепи*.

Начинается от субстратов I типа: сукцината, ацил-КоА и α -глицерофосфата. Их дегидрирование происходит с помощью флавиновых ферментов, имеющих простетические группы ФАД и FeS центры. Ферменты являются интегральными белками внутренней мембраны митохондрий.



ФАД присоединяет два атома водорода от субстрата. Затем FeS-центры забирают $2e^-$, которые через КоQ поступают в цепь переноса электронов. Выталкивания протонов в межмембранное пространство не происходит, поскольку изменение свободной энергии незначительно.

Отличия полной цепи переноса электронов от укороченной: 1) субстраты полной ЦПЭ – II и III типов, укороченной – I типа; 2) в укороченной ЦПЭ отсутствуют пиридинзависимые дегидрогеназы.

6.3. Окислительное фосфорилирование

Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, сопряженный с переносом протонов и электронов по дыхательной цепи от субстратов к кислороду, называется *окислительным фосфорилированием*.

Для количественного выражения окислительного фосфорилирования введен *коэффициент окислительного фосфорилирования*, который представляет собой отношение числа молекул неорганического фосфата, перешедших в состав АТФ в процессе дыхания, на каждый поглощенный атом кислорода. Отношение Р/О для полной дыхательной цепи равно 3, для укороченной – 2.

Энергия окисления, достаточная для образования молекулы АТФ выделяется в ЦПЭ в следующих стадиях: 1) НАД - ФМН (НАДН-дегидрогеназа); 2) цит *b* - цит *c* (убихинол- цитохром *c* редуктаза); 3) цит *a* - $1/2 O_2$ (цитохром *c*-оксидаза). На этих стадиях изменения ОВП превышают 0,22 В, что достаточно для образования макроэргической связи АТФ (>30,2 кДж/моль). Уменьшение свободной энергии, сопровождающее перенос протонов и электронов на кислород в результате одного дегидрирования, составляет примерно 220 кДж/моль. При этом на синтез АТФ в полной дыхательной цепи может быть израсходовано $30,2 \cdot 3 = 90,6$ кДж/моль. Отсюда КПД ЦПЭ около 40%. Остальная энергия рассеивается в виде тепла (поддержание температуры тела).

Известны три основных гипотезы окислительного фосфорилирования.

1. *Механохимическая, или конформационная* (Грин, Бойер, 60-е гг. XX в.). В процессе переноса протонов и электронов изменяется Конформация белков-ферментов. Они переходят в новое богатое энергией состояние, а затем при возвращении в исходную конформацию отдают энергию для синтеза АТФ. Гипотеза частично подтверждена: $E_{\text{окисл.}} \rightarrow E_{\text{конформ. сдвигов}} \rightarrow E_{\text{АТФ}}$.

2. *Гипотеза химического сопряжения* (Липман, Слейтер, Ленинджер, 30-40-е гг. XX в.). В сопряжении дыхания и фосфорилирования участвуют сопрягающие вещества, например вещество X. Вещество «X» акцептирует протоны и электроны от первого фермента в пункте сопряжения, взаимодействует с H_3PO_4 . В момент отдачи протонов и электронов второму ферменту пункта сопряжения связь становится макроэргической. Далее макроэрг передается на АДФ с образованием АТФ. До настоящего времени не выделены сопрягающие вещества.

3. *Хемиосмотическая гипотеза П.Митчелла* (1961). По современным представлениям дыхание и фосфорилирование связаны между собой *электрохимическим потенциалом* (ЭХП) на внутренней мембране митохондрий. Для объяснения необходимы следующие понятия: а) внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для H^+ и OH^- ; б) во внутреннюю мембрану митохондрий вмонтирована АТФ-синтаза, катализирующая обратимую реакцию: $АТФ + H_2O \leftrightarrow АДФ + P_n$. АТФ-синтаза состоит из следующих субъединиц: F_0 – гидрофобный сегмент из 13 полипептидных цепей, связанный с внутренней мембраной митохондрий; F_0 – это протонный канал, по которому в норме только могут перемещаться протоны через мембрану; F_1 – сопрягающий фактор, катализирующий синтез АТФ при перемещении протонов. В укороченной цепи переноса электронов отсутствует только первый этап, остальной перенос электронов такой же, как и в полной цепи; в) синтез АТФ осуществляется при перемещении протонов через АТФ-синтазу в направлении от ММП (межмембранное пространство) к матриксу.

Суть окислительного фосфорилирования: за счет энергии переноса электронов в ЦПЭ ($E_{\text{ОКИСЛЕНИЯ}}$) происходит движение протонов через мембрану в ММП и создается электрохимический потенциал ($E_{\text{ЭХП}}$). При возвращении протонов назад через АТФ-синтазу энергия ЭХП трансформируется в энергию АТФ – $E_{\text{АТФ}}$. Итак: $E_{\text{ОКИСЛ.}} \rightarrow E_{\text{ЭХП}} \rightarrow E_{\text{АТФ}}$.

НАДН-КоQ редуктаза, цитохром редуктаза и цитохромоксидаза выталкивают протоны в межмембранное пространство. Протоны берутся из H_2O матрикса или за счет конформационных изменений в ферментах. Со стороны матрикса на мембране будет преобладать отрицательный заряд (избыток OH^-), а со стороны ММП положительный (за счет H^+). *Возникает ЭХП, который состоит из двух компонентов: осмотического (разности концентраций ионов H^+) и электрического (разности электрических потенциалов):* $\Delta\mu H^+ = \Delta\varphi + \Delta pH$. Эта величина измерена, она равна $\sim 0,25$ В (хемиосмотическая гипотеза П.Митчелла). При обратном токе протонов через канал АТФ-синтазы (разрядка мембраны) возникает 3 молекулы АТФ в полной ЦПЭ и 2 молекулы АТФ в укороченной. Таким образом

внутренняя мембрана митохондрий выполняет роль сопрягающей мембраны. Теперь можно суммировать все строение ЦПЭ в виде 5 ферментативных комплексов, привязав их положение к шкале ОВП (таблица 6.3).

Таблица 6.3

Компоненты митохондриальной цепи переноса протонов и электронов

ОВП, В	Компоненты ЦПЭ
-0,4	Субстраты 2 и 3 рода
-0,3	Комплекс I (полная ЦПЭ) НАДН-дегидрогеназа (КФ 1.6.5.3.). 700-800 кДа, 25-30 субъединиц, 1 ФМН, 2 Fe ₂ S ₂ , 4-5 Fe ₄ S ₄
~0	Субстраты I рода
	Комплекс II (укороченная ЦПЭ) Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.5.1.). 125 кДа, 4-6 субъединиц, 1 ФАД, 1 Fe ₂ S ₂ , 1 Fe ₄ S ₄ , 1 Fe ₃ S ₄ , 2 убихинона, 1 гем цитохрома <i>b</i>
	Комплекс III (обе ЦПЭ) Убихинол-цитохром <i>c</i> -редуктаза (КФ 1.10.2.2.). Около 400 кДа, 11 субъединиц, 2 Fe ₂ S ₂ , 2 гема цитохрома <i>b</i> , 1 гем цитохрома <i>c</i> ₁
	Комплекс IV (обе ЦПЭ) Цитохром <i>c</i> -оксидаза (КФ 1.9.3.1.). Около 200 кДа, 8-13 субъединиц, 2 Cu, 1 Zn, 1 гем цитохрома <i>a</i> и 1 гем цитохрома <i>a</i> ₃
+0,3	Комплекс V (обе ЦПЭ при сопряжении дыхания и фосфорилирования) H ⁺ -транспортирующая АРФ-синтаза (КФ 3.6.1.34.). Больше 400 кДа, 8-14 субъединиц
	Кислород
+0,8	

Полная ЦПЭ - 1,3,4 и 5 комплексы, укороченная ЦПЭ – 2,3,4 и 5 комплексы.

В англоязычной литературе указывается, что на каждую пару электронов, переносимых от НАДН в межмембранное пространство выталкивается 10 протонов, а при окислении сукцината – 6 протонов. В результате проведенных исследований установлено, что для синтеза 1 молекулы АТФ необходимо 4 протона, 3 из которых используется для образования АТФ, а 1 протон используется для транспорта Рн, АТФ и АДФ через митохондриальную мембрану. Следовательно, если 10 протонов выталкивается в межмембранное пространство, а 4 используется для синтеза АТФ, то коэффициент окислительного фосфорилирования равен 2,5 (10/4) в полной дыхательной цепи и 1,5 (6/4) в укороченной дыхательной цепи. Однако, окончательный вывод можно будет сделать только при полной расшифровке механизма функционирования АТФ-азы.

У некоторых морских бактерий возникновение электрохимического потенциала на мембране связано с возникновением $\Delta\mu Na$, что определяет синтез АТФ, создание солевых градиентов и движение жгутиков.

Дыхательный контроль – это регуляция скорости переноса электронов по дыхательной цепи *отношением АТФ/АДФ*. Чем меньше это отношение (преобладает АДФ), тем интенсивнее идет дыхание (это обеспечивает реакцию АДФ + Рн → АТФ). Это видно по увеличению

потребления кислорода митохондриями после добавки АДФ (эксперименты Чанса) или по усиленному дыханию бегущего человека.

Вещества, прекращающие поток электронов по дыхательной цепи ферментов, называют *ингибиторами дыхания*. *Ротенон* и *амитал* специфически ингибируют перенос электронов в НАДН-дегидрогеназном комплексе и таким образом предотвращают генерирование протонного градиента в 1-м комплексе. В то же время указанные ингибиторы не нарушают окисление сукцината. *Антимицин А* тормозит ток электронов между цитохромами *b* и *c*₁, предотвращая синтез АТФ, сопряженный с генерированием протонного градиента в 3-м комплексе. Этот блок можно обойти добавлением *аскорбата*, который непосредственно восстанавливает цитохром *c*. Наконец, ток электронов может быть блокирован между цитохромоксидазным комплексом и кислородом под действием *CN⁻*, *N₃⁻* и *CO*. В присутствии этих ингибиторов из-за блокирования тока электронов не происходит фосфорилирования, сопряженного с генерированием протонного градиента в 4-м комплексе.

Разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования возникает при повышении проницаемости мембраны митохондрий для протонов в любом месте, а не только в канале АТФ-синтазы. При этом не создается электрохимический потенциал и энергия окисления рассеивается в виде тепла. Так действуют ионофоры (*2,4-динитрофенол*, *валиномицин* и др.). Они переносят обратно протоны через мембрану, выравнивая градиенты рН и мембранного потенциала. Лекарственные препараты (*аминобарбитал*), продукты жизнедеятельности микроорганизмов, избыток тиреоидных гормонов (вызывают накопление ненасыщенных жирных кислот, являющихся ионофорами) и др. приводят к разобщению дыхания и фосфорилирования, обеспечивая гипертермию.

На разобщении дыхания и фосфорилирования базируется терморегуляторная функция тканевого дыхания. Тканевое дыхание, протекающее в митохондриях и не сопровождающееся образованием макроэргов, называют *свободным или нефосфорилирующим окислением*.

Природным разобщающим агентом является *термогенин*, протонный канал в митохондриях бурых жировых клеток. Бурый жир обнаружен у новорожденных и животных, впадающих в зимнюю спячку и служит для теплообразования. При охлаждении организма норадреналин активирует гормонзависимую липазу. Благодаря активному липолизу в организме образуется большое количество свободных жирных кислот, которые распадаются в результате β-окисления и в дыхательной цепи. Так как жирные кислоты одновременно открывают протонный канал термогенина, их распад не зависит от наличия АДФ, т.е. протекает с максимальной скоростью и генерирует энергию в форме тепла.

Образованная в результате окислительного фосфорилирования в митохондриях АТФ обменивается на немитохондриальную АДФ с помощью специальных белков *транслоказ* (транслоказы составляют до 6% от всех белков внутренней мембраны митохондрий).

Гипоэнергетические состояния Возникают 1) при нарушении поступления субстратов для дегидрирования (на всех этапах от пищи до матрикса митохондрий); 2) при нарушении поступления O_2 в митохондрии (на всех этапах от дыхания, связь с кислородом с гемоглобином, транспорт и пр.); 3) при нарушении мембран митохондрий, композиции липидного бислоя и ферментативных ансамблей внутренней мембраны митохондрий. Предложено вычислять *энергетическое состояние клетки*, вычисляя «заполнение» системы АТФ-АДФ-АМФ макроэргами. Если все три компонента представлены АТФ, то система энергетически полностью заполнена и ее энергетический заряд равен 1,0. Если же система представлена только АМФ, то ее энергетический заряд равен 0.

$$\text{Энергетический заряд} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[АДФ] + 2[АТФ]}{[АМФ] + [АДФ] + [АТФ]}$$

Энергетический заряд клетки является важной величиной, определяющей соотношение катаболических и анаболических процессов в ней. В тканях животных важную регуляторную роль выполняет величина отношения АТФ/АДФ.

В сутки человек потребляет в среднем 27 моль кислорода. Основное его количество (примерно 25 моль) используется в митохондриях в ЦПЭ. Следовательно, ежедневно синтезируется 125 моль АТФ, или 62 кг (при расчете использован коэффициент $P/O = 2,5$, т.е. среднее значение коэффициента фосфорилирования). Масса всей АТФ, содержащейся в организме, составляет примерно 20-30 г. Следовательно, каждая молекула АТФ за сутки 2500 раз проходит процесс гидролиза и синтеза.

Молекулярные моторы – это ферменты, трансформирующие химическую энергию гидролиза АТФ в механическую работу (Schliwa M., 2006). В эукариотических клетках выделяют три различных класса моторов: 1) миозин; 2) кинезин и 3) динеин. Для них характерны: 1) протяженная полярная структура, вдоль которой в одном направлении перемещаются актиновые филаменты (миозин) или микротрубочки (кинезины и динеины); 2) молекулярная организация взаимодействующих субъединиц должна обеспечивать однонаправленное движение; 3) связывающие центры для АТФ и подвижных элементов локализуются в глобулярных каталитических доменах, называемых головками; 3) энергию для движения получается при гидролизе АТФ и реализуется через конформационные изменения белков (поворот головки); 5) взаимодействие субъединиц молекулярных моторов обеспечивает перемещение структур в вязкой цитоплазме. В настоящее время известны 18 классов миозинов (мышцы и др. ткани), 10 семейств кинезинов (цитозоль клеток) и 2 группы динеинов (плазма крови). Три типа моторов различаются по молекулярной массе: кинезины – 45 кДа, миозины – 100 кДа и динеины – 500 кДа. По структуре близки кинезины и миозины. Молекулярные моторы используются различными живыми организмами для клеточной активности – контракция, транспорт органелл, подвижность клеток, клеточное деление, передача информации, процессы развития и др.

6.4. Окислительные системы, не связанные с запасанием энергии **Пероксидазный путь**

Другой тип дегидрирования субстратов, заключающийся в переносе двух атомов водорода на молекулу кислорода, называется пероксидазным: $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$. Энергия окисления выделяется в виде тепла. Это *простые окислительные системы, представленные ФМН- и ФАД-содержащими ферментами, а также металлопротеинами*. Они более

широко распространены в растительных клетках, чем в клетках животных и человека. В клетке около 80% этих ферментов сосредоточено в пероксисомах, кроме того они встречаются в мембранах, граничащих с цитозолем. Так происходит окисление альдегидов, аминов, L- и D-аминокислот, пуринов и др. Некоторые из названных веществ являются токсическими. В лейкоцитах, гистиоцитах и других клетках, способных к фагоцитозу, пероксидазный путь окисления субстратов очень активен. Образующаяся H_2O_2 используется для обезвреживания болезнетворных бактерий и распада инфекционного материала, поглощенного клетками. Однако *избыточное накопление перекиси водорода токсично*, особенно для нефагоцитирующих клеток. Накопление пероксидов и генерация свободных радикалов может приводить к повреждению мембран (рак, атеросклероз).

Для предотвращения повреждающего действия пероксидов служат две ферментативные системы. Первая – фермент *пероксидаза*, простетической группой которой является протогем. Ферменты этого типа широко представлены у растений, а также встречаются в молоке, лейкоцитах, тромбоцитах и тканях, продуцирующих эйкозаноиды: $H_2O_2 + RNH_2 \rightarrow 2H_2O + R$, где RNH_2 – аскорбиновая кислота, хиноны, цитохром C, глутатион. В эритроцитах и некоторых других тканях присутствует глутатионпероксидаза, содержащая Se в качестве простетической группы. Этот фермент защищает мембраны и гемоглобин от окисления пероксидами. Второй фермент – *каталаза*, являющийся гемопротеином (4 гема): $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Эта реакция напоминает пероксидазную, только вместо RNH_2 используется H_2O_2 . Каталазу находят в крови, костном мозге, слизистых оболочках, печени, почках, т.е. в клетках, где происходит интенсивное окисление с образованием H_2O_2 .

Фенолоксидазы встречаются чаще всего в цитоплазме растительных клеток. Они катализируют окисление монофенолов в дифенолы и затем в хиноны. Действием фенолоксидаз объясняется самопроизвольное потемнение на воздухе срезов растительных тканей (картофель, фрукты, грибы), а также – жидкости куколок шелкопряда.

Оксигеназный путь

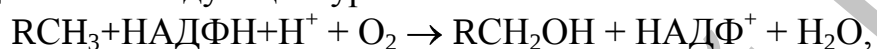
Оксигеназы – это ферменты, катализирующие включение атома или молекулы кислорода в субстрат окисления. Служат для синтеза и деградации различных метаболитов. Оксигеназы представлены двумя типами ферментов.

Монооксигеназы (оксигеназы со смешанной функцией, гидроксилазы, микросомальное окисление) катализируют присоединение одного атома кислорода к молекуле субстрата. При этом возникает *гидроксильная группа*, повышается растворимость вещества и проявляются новые фармакологические свойства. Для работы монооксигеназной системы необходимы следующие основные компоненты: неполярный субстрат $R-CH_3$; кислород $O=O$; дополнительный субстрат $НАДФН+H^+$ – донор атомов водорода; цитохром P-450.

Связанный с СО цитохром Р-450 имеет максимум поглощения при 450 нм (отсюда название – цит Р-450). Выполняет две функции: 1) связывание субстрата гидроксилирования; 2) на цит Р-450 происходит активация молекулярного кислорода.

Монооксигеназный путь окисления локализован в мембранах эндоплазматического ретикулума (после разрушения клеток эти мембраны замыкаются в микросферы – микросомы). Микросомальное окисление представляет короткую цепь, включающую НАДФ, ФАД, Fe_2S_2 - белки (адриленоксин), цитохромы Р-450, b_5 . В общем виде микросомальное окисление неполярных ксенобиотиков (лекарств) осуществляется с помощью *гидроксилазного цикла*.

Процесс микросомального гидроксилирования в общем виде можно представить следующим уравнением:



где RCH_3 — окисляемый субстрат.

Следует отметить, что окисление органических соединений в микросомальных монооксигеназных реакциях, в отличие от реакций митохондриального окисления, как правило, не решает никаких энергетических задач, а *выполняет защитную (детоксикационную) и пластическую функции*. Окисленные продукты могут быть использованы в качестве пластического материала или сразу же удаляются из организма.

Весь каталитический процесс микросомального окисления может быть разбит на 6 основных стадий.

1. Вещество, подвергающееся биотрансформации (RCH_3) на этой стадии взаимодействует с окисленной формой цитохрома Р-450 (Fe^{3+}) с образованием фермент-субстратного комплекса $\text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{3+})$.

2. $\text{НАДФН} + \text{H}^+$ передает 2 атома водорода на ФАД. ФАД восстанавливается в ФАДН_2 .

3. С помощью FeS белков происходит разделение потоков протонов и электронов. 1-й электрон связывается с комплексом $\text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{3+})$ и переводит его в $\text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{2+})$.

4. Восстановленный фермент-субстратный комплекс взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием тройного оксигенированного фермент-субстратного комплекса $\text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{2+}) - \text{O}_2$.

5. Происходит восстановление кислорода за счет второго электрона и превращение его в свободный радикал. $\text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{2+}) - \text{O}_2 \rightarrow \text{RCH}_3 - \text{P-450}(\text{Fe}^{2+}) - \text{O}_2^{\cdot -}$.

6. Стадия характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса и его распадом с высвобождением воды и гидроксилированного субстрата (RCH_2OH). При этом цитохром Р-450 переходит в исходную форму, готовую к взаимодействию со следующей молекулой субстрата.

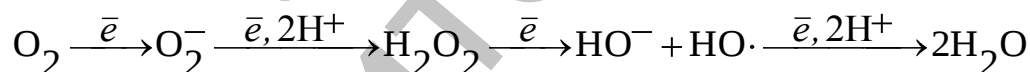
В митохондриях содержится монооксигеназная система, локализованная на внутренней стороне внутренней мембраны митохондрий, которая выполняет биосинтетическую функцию, т.е. введение ОН-групп при биосинтезе стероидных гормонов (кора надпочечников, семенники, яичники, плацента); холестерина, при образовании кальцитриола (витамин Д₃) из 25-гидроксихолекальциферола в почках и при синтезе желчных кислот в печени.

Диоксигеназный путь

Включение двух атомов кислорода в молекулу субстрата $R + O_2 \rightarrow RO_2$ катализируется ферментами диоксигеназами. Этот путь служит для превращения молекул, содержащих ароматические кольца, например, гомогентизиновую кислоту. Одной из биологически важных диоксигеназных реакций является разделение молекулы β-каротина на 2 молекулы ретиналя (одна из форм витамина А).

6.5. Свободно-радикальное окисление

Под свободными радикалами понимают молекулу или ее часть, имеющую *неспаренный электрон на молекулярной или на внешней атомной орбите*. Появление неспаренного электрона – появление у молекулы свободной валентности. Свободные радикалы реакционноактивны и вступают в химические реакции для приобретения недостающего электрона. Полное восстановление O_2 до H_2O требует присоединения 4 электронов: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$.



При неполном восстановлении (т.е. присоединении 1, 2 или $3e^-$) образуются свободно-радикальные формы кислорода: $O_2^{\cdot -}$ – супероксидный анион; $HO\cdot$ – гидроксильный радикал ($RO\cdot$ – алкоксильный радикал), $\cdot O_2H$ – супероксидный радикал.

К реактивным формам кислорода относят оксид азота ($NO\cdot$), пероксинитрит ($ONOO^-$) и озон. По L.Flohe и H.Budde (2006) в клеточной биологии под свободными радикалами понимают малые высоко реактивные O-, N-, S- и C-центровые радикалы, которые участвуют в *оксидативном* или *нитросативном стрессе*. Нитросативный стресс характеризуется суперпродукцией $NO\cdot$, которая часто усугубляет эффекты избыточной продукции супероксидного аниона.

Супероксидный радикал может возникать в процессе биохимических реакций (окисление с помощью флавопротеинов, в цепях монооксигеназных реакций и др.).

Свободные радикалы инициируют цепные реакции. Если в реакцию вступают ненасыщенные жирные кислоты, то говорят о пероксидном окислении липидов (ПОЛ). Этот процесс важен для развития патологических состояний, связанных с повреждением мембран. Схема цепных реакций:

1. Инициация при действии $R^\cdot$, металлов, излучений: $X + RH \rightarrow R^\cdot + XH$.
2. Удлинение, разветвление: $R^\cdot + O_2 \rightarrow ROO^\cdot$ (пероксидный радикал).
 $ROO^\cdot + RH \rightarrow R^\cdot + ROOH$ (гидроперекись) и т.д.

3. Терминация (обрыв цепи): $ROO^\cdot + R_1^\cdot \rightarrow ROOR_1$; $R^\cdot + R_1^\cdot \rightarrow RR_1$.

Применительно к фрагменту ненасыщенной жирной кислоты можно показать ранние, средние и поздние продукты перекисного окисления. Во всех полиненасыщенных жирных кислотах присутствует дивинилметановая структура, которая легко вступает в реакцию отрыва протона, сопровождающуюся образованием свободного радикала. Ранние продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты; средние продукты ПОЛ – гидроперекиси; конечные продукты ПОЛ – малоновый диальдегид. Эти процессы лежат в основе повреждения мембран клеток. Перспективно определение в выдыхаемом воздухе этана, который выделяется при окислении ω_3 -жирных кислот, например, α -линоленовой 18:3, $\Delta^{9,12,15}$, а также пентана – при окислении ω_6 -жирных кислот, например, линолевой 18:2, $\Delta^{9,12}$ или арахидоновой 20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$.

Свободнорадикальные процессы лежат в основе биохимических механизмов неспецифической резистентности организма, определяемой специальными клетками тканей и крови.

Типичным свободнорадикальным процессом является защитная функция *фагоцитов*. Свободнорадикальный процесс при окислительном стрессе начинается от НАДФН оксидазы – трансмембранного цитохром *b* содержащего флавопротеина (gp91)^{phox}: $НАДФН + O_2 \rightarrow 2 \cdot O_2^- + НАДФ^+ + H^+$. Супероксидный анион является не очень агрессивным радикалом. Как слабое основание он ассоциируется в супероксидный радикал с рК 5. При низких значениях рН в вакуолях фагоцитов происходит спонтанная дисмутация: $\cdot O_2H + \cdot O_2^- + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ и $\cdot O_2H + \cdot O_2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$. При нейтральном значении рН для превращения супероксидного аниона требуется супероксиддисмутаза. Это завершение свободнорадикального процесса. Однако, образованная перекись водорода или гидроперекиси (ROOH) могут вновь образовать агрессивные гидроксильный или алкоксильный радикалы: $H_2O_2 \rightarrow 2 \cdot OH$ и $ROOH \rightarrow \cdot OH + RO^\cdot$.

Возникает вопрос, сколько в клетке содержится $O_2^\cdot$? Подсчитано, что в оптимальных условиях при 37 °С клетки кишечной палочки (*E.coli*) поглощают примерно 6×10^6 молекул кислорода в секунду. Около 0,1% кислорода превращается в супероксидный анион. Клетка может аккумулировать 240 мкмоль/мин супероксидного аниона. 95% $O_2^\cdot$ обезвреживается с помощью супероксиддисмутазы и 5% остается для взаимодействия с молекулами-мишенями (I.Fridovich, 2001).

В *полиморфноядерных лейкоцитах* при окислительном стрессе миелопероксидаза приводит к образованию гипохлорита: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OCl^- + H_2O$. Затем возможны превращения: $Cl^- + OCl^- + H^+ \rightarrow Cl_2 + OH^-$ и $Cl_2 \rightarrow \cdot Cl + \cdot Cl$. Эти молекулы оказывают бактерицидное действие. Кроме этого гипохлорит и перекись водорода могут генерировать синглетный кислород при ультрафиолетовом облучении, который способен окислять ненасыщенные жирные кислоты.

В *макрофагах* возможна синхронная продукция двух радикалов $\cdot O_2^-$ и $NO^\cdot$, которые могут образовать пероксинитрит: $\cdot O_2^- + NO^\cdot \rightarrow ONOO^-$. Пероксинитрит, не

являясь радикалом, участвует в бактерицидном эффекте. При закислении среды он может вновь создать агрессивные свободные радикалы: $\text{ONOO}^- \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{NO}_2$.

Антиоксидантная защита - это сдерживание процессов свободно-радикального окисления осуществляется с помощью неферментативных и ферментативных механизмов. 1) *Неферментативная защита* включает: комплексоны, связывающие металлы (этилендиаминотетрауксусная кислота); в водной фазе – витамин С, ураты, ароматические амины, SH-соединения; в липидной фазе – жирорастворимые витамины А (β-каротин), Е, гормоны стероидной природы, тироксин. 2) *Ферментативная защита* включает фермент супероксиддисмутазу (в цитозоле, ядрах и лизосомах простетическая группа – Cu^{2+} , Zn^{2+} , в митохондриях и у бактерий – Mn^{2+}) $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Перекись водорода обезвреживается в каталазной или пероксидазной (чаще глутатионпероксидазной) реакциях. Активатор реакции – Se. В продукты питания добавляют антиоксидантные добавки: β-каротин, α-токоферол, ВНА – бутиловый гидроксианизол, ВНТ – бутиловый гидрокситолуен. Для профилактики радиационных поражений используют комплексы витаминов А, Е, С и β-каротин, Е, С.

В заключение необходимо заметить, что многие отечественные биохимики предпочитают пользоваться латинскими сокращенными аббревиатурами соединений, участвующих в энергетическом обмене (NAD, FMN, FAD, ATP и др.).

Глава 7. ОБЩИЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА

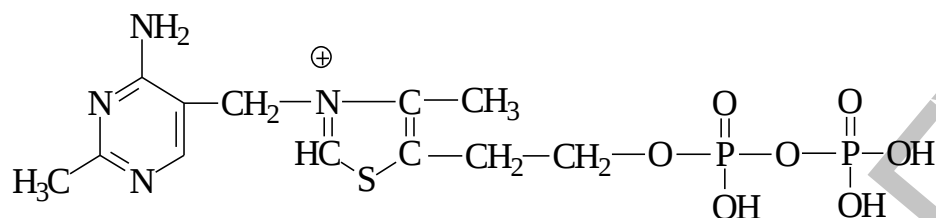
Общий путь катаболизма включает: 1) окисление пирувата в ацетил-КоА; 2) окисление ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот; 3) выделение и аккумулялирование энергии при дегидрировании метаболитов общего пути катаболизма в митохондриальных цепях переноса электронов.

Пировиноградная кислота образуется в результате специфического пути катаболизма глюкозы и связывает гликолиз с циклом трикарбоновых кислот. Пируват поступает в митохондрии и превращается в ацетил-КоА в результате процесса, который называется *окислительное декарбоксилирование пирувата*. Это необратимая реакция, которая катализируется *пируватдегидрогеназным комплексом (пируватдегидрогеназной системой)*. В состав пируватдегидрогеназного комплекса входит 3 фермента и 5 коферментов. I-й фермент – пируватдегидрогеназа содержит кофермент тиаминпирофосфат (производное витамина В₁); II-й фермент – дигидролипоилтрансацилаза содержит коферменты липоевую кислоту и кофермент А; III-й фермент - дигидролипоилдегидрогеназа содержит коферменты ФАД и НАД⁺.

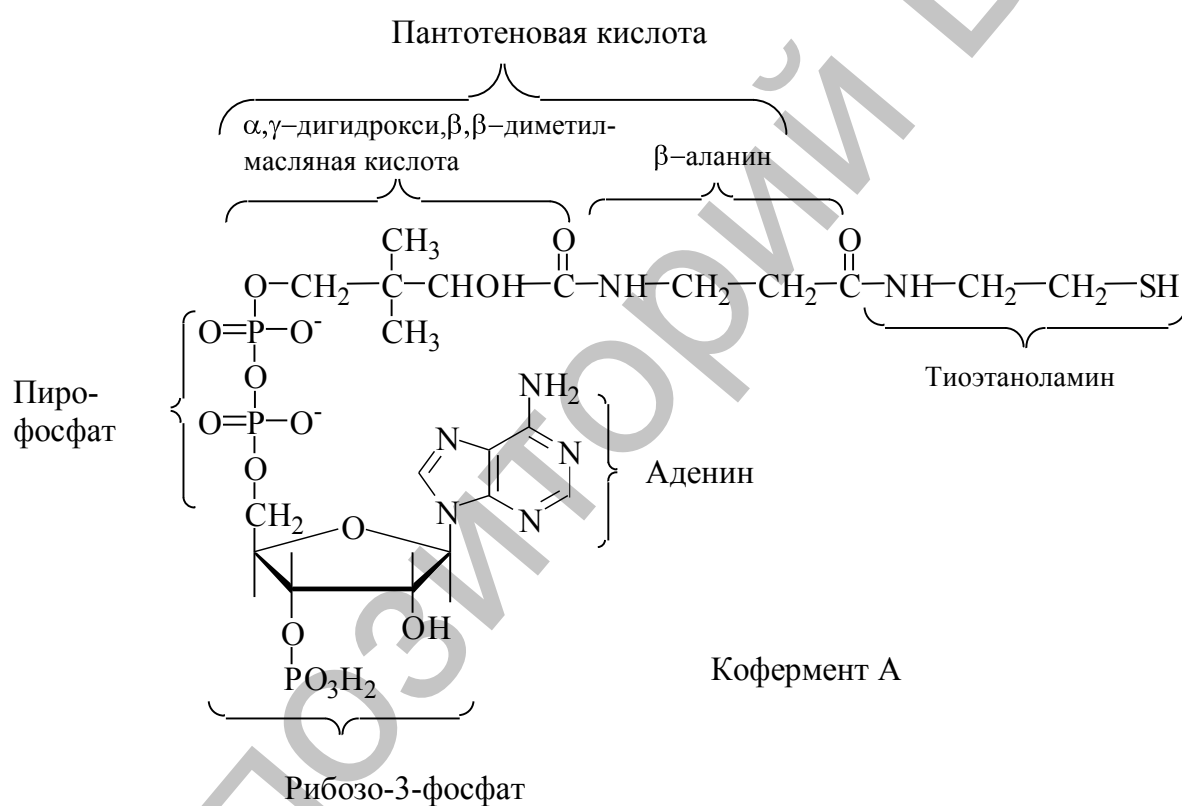
7.1 Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата

I этап. Пируват взаимодействует с кофактором пируватдегидрогеназы тиаминпирофосфатом. Основную роль играет второй углеродный атом тиазольного кольца ТПФ, который легко теряет

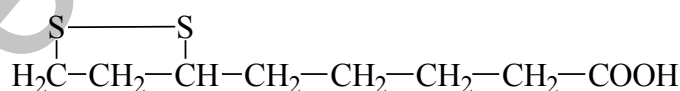
протон, превращаясь в карбанион. Карбанион атакует частично положительно заряженный α -углеродный атом пирувата с возникновением связи C–C. Сильно электрофильный атом азота в карбоксиэтил-ТПФ способствует его декарбоксилированию с образованием оксиэтил-ТПФ.



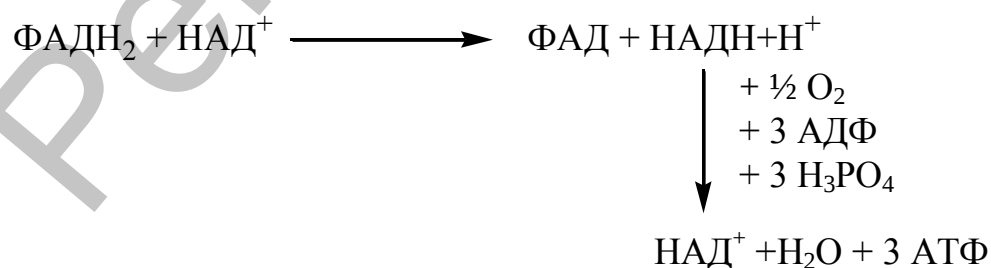
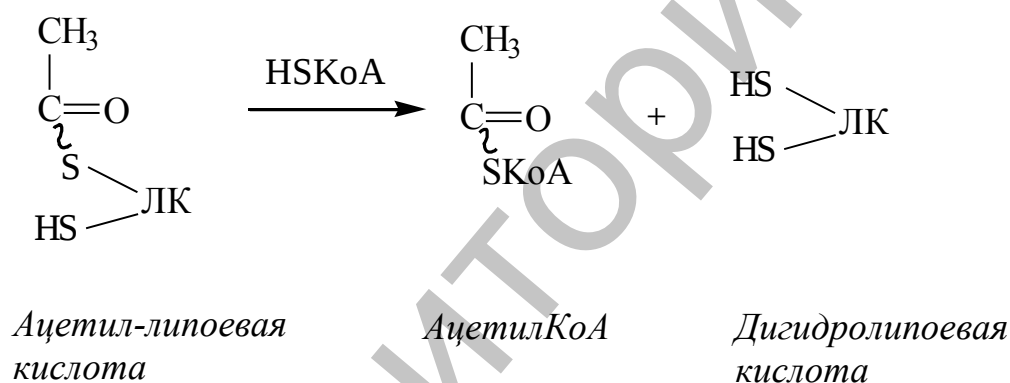
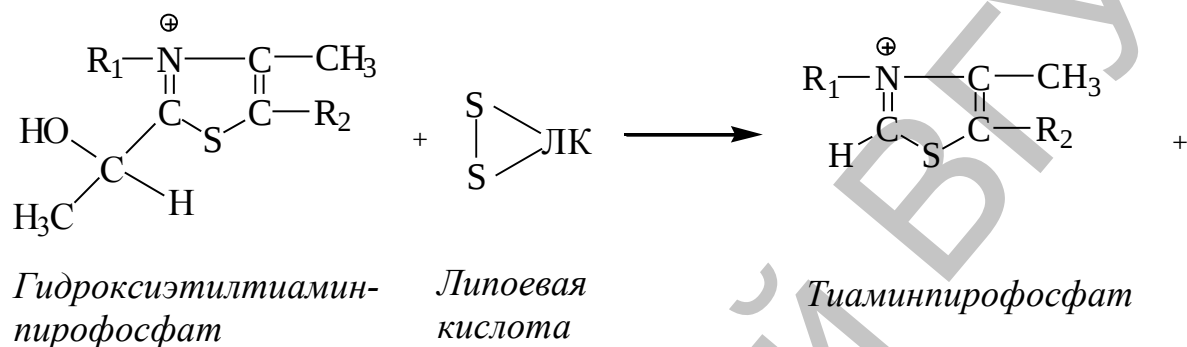
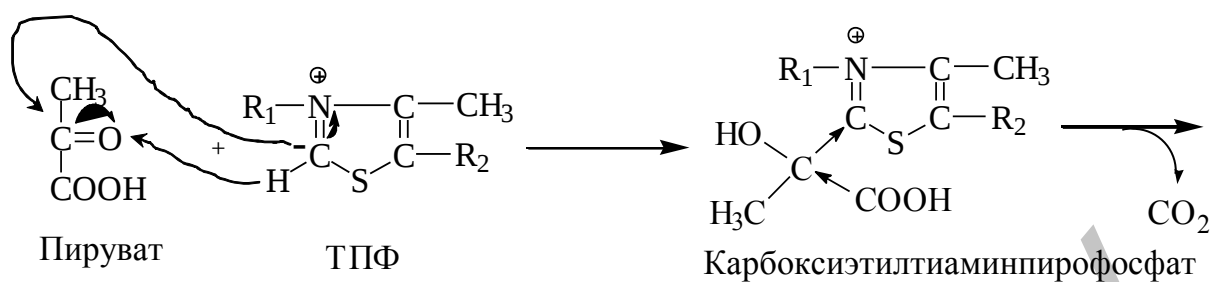
Тиаминпирофосфат (ТПФ)



Кофермент А



Липоевая кислота (ЛК)



II этап. В следующей реакции, катализируемой дигидролипоилтрансацилазой, оксиэтил-ТПФ взаимодействует с

липоевой кислотой. Происходит перенос оксиэтильной группы на один из атомов серы ЛК. При этом оксиэтильная группа окисляется в ацетильную. В процессе окисления оксиэтильной группы и восстановления SH-группы ЛК возникает макроэргическая связь. Затем ацетильный остаток переносится на второй кофермент дигидролипоилтрансацилазы – HSKoA, а ЛК полностью восстанавливается. Образованный ацетил-КоА отделяется от полиферментного комплекса.

III этап. Восстановленная форма ЛК окисляется дигидролипоилдегидрогеназой.

Превращение пирувата в ацетил-КоА – процесс *необратимый*. Обычно ацетил-КоА далее превращается 2-мя путями: 1) окисляется до CO₂ через ЦТК с одновременным образованием энергии; 2) включается в липиды. Пируватдегидрогеназный комплекс регулируется тремя способами: 1) ингибируется продуктами реакции, т.е. ацетил-КоА и НАДН, активируется HS-КоА и НАД⁺; 2) ингибируется АТФ и активируется АМФ; 3) фосфорилированием-дефосфорилированием. ПДК неактивен в фосфорилированном состоянии и активен в дефосфорилированном.

7.2. Цикл трикарбоновых кислот

Вторым компонентом общего пути катаболизма является ЦТК. Этот цикл был открыт в 1937 г. Кребсом и Джонсоном. В результате ЦТК происходит декарбоксилирование и дегидрирование уксусной кислоты, что приводит к образованию 2-х молекул CO₂ и 4-х пар атомов водорода, поступающих в дыхательную цепь.

Свободную уксусную кислоту невозможно окислить путем дегидрирования. Поэтому она предварительно связывается с щавелевоуксусной кислотой, в результате чего образуется цитрат.

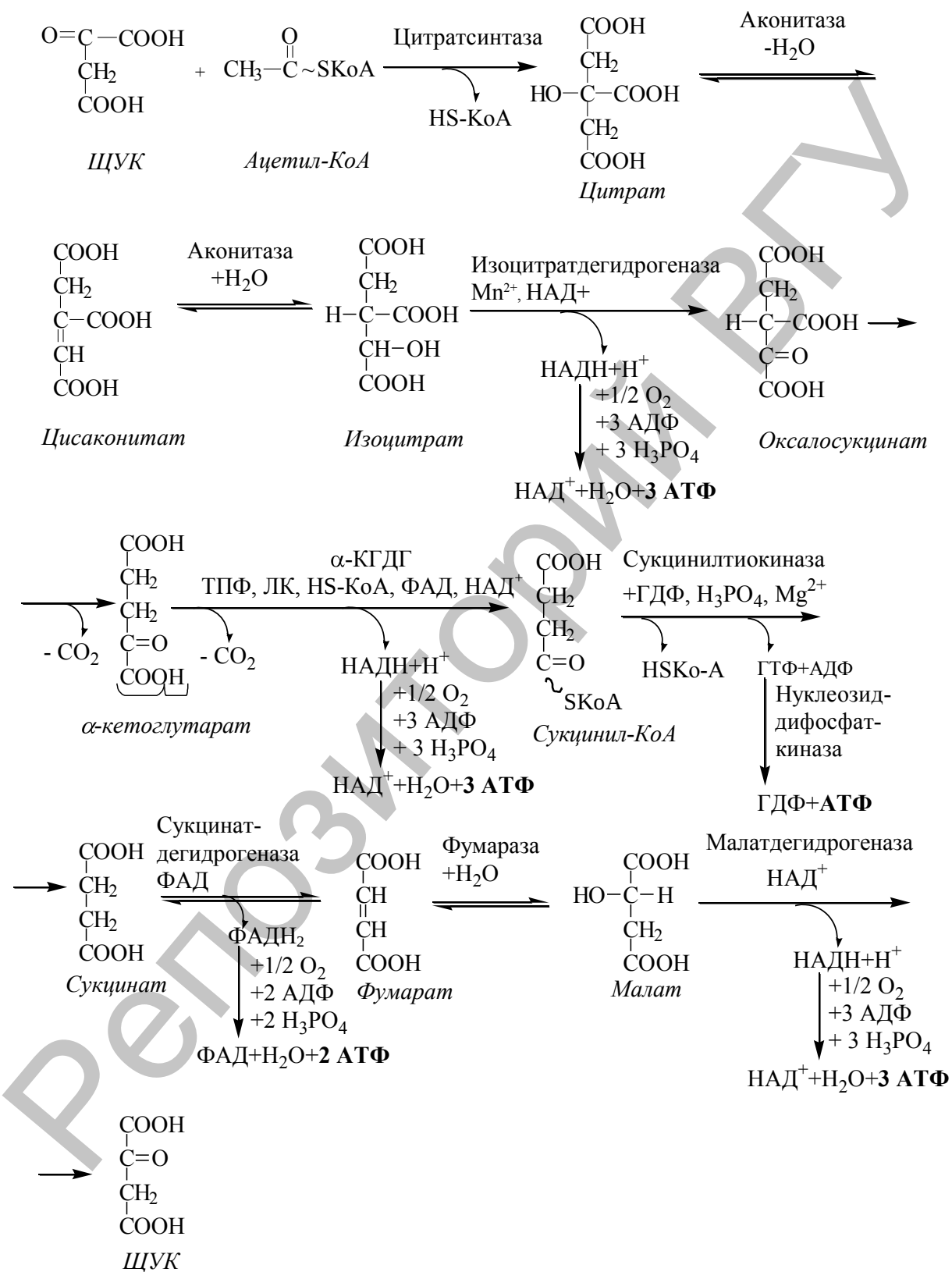
1. Ацетил-КоА конденсируется с ЩУК в реакции, катализируемой *цитратсинтазой*. Этот фермент регуляторный: ингибируется АТФ и НАДН.

2. *Аконитаза* катализирует превращение цитрата в изоцитрат через стадию цис-аконитовой кислоты. Аконитаза по механизму действия одновременно гидратаза и изомераза.

3. *Изоцитратдегидрогеназа* катализирует дегидрирование изолимонной кислоты в щавелевоянтарную кислоту. Коферментом является НАД⁺. Фермент активируется АДФ (аллостерический активатор) и ингибируется при накоплении выше определенного уровня АТФ и НАДН.

4. *α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс (система)* катализирует окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата в сукцинил-КоА. Мультиферментный комплекс α-кетоглутаратдегидрогеназы похож на пируватдегидрогеназный комплекс и

процесс протекает аналогично окислительному декарбоксилированию пирувата.



5. *Сукцинилтиокиназа* катализирует расщепление сукцинил-КоА на янтарную кислоту и кофермент А. Энергия расщепления сукцинил-КоА накапливается в виде гуанозинтрифосфата (ГТФ). В сопряженной реакции перефосфорилирования АДФ фосфорилируется в АТФ, а освобождающиеся молекулы ГТФ могут вновь фосфорилироваться (*субстратное фосфорилирование*).

6. *Сукцинатдегидрогеназа* катализирует превращение сукцината в фумаровую кислоту. Фермент вмонтирован во внутреннюю мембрану митохондрий и в качестве простетической группы содержит ФАД. Сукцинатдегидрогеназа – регуляторный фермент: активируется фосфатом, сукцинатом и конкурентно ингибируется ЩУК.

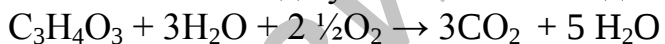
7. *Фумаратгидратаза (фумараза)* катализирует превращение фумаровой кислоты в яблочную (малат). Фермент стереоспецифичен, образует только L-малат.

8. *Малатдегидрогеназа* катализирует окисление яблочной кислоты в ЩУК. Кофермент малатдегидрогеназы НАД⁺.

Регуляция ЦТК: 1. На стадии цитратсинтазы - АТФ аллостерический ингибитор (повышает K_m по ацетил-КоА). 2. На стадии изоцитратдегидрогеназы - АДФ аллостерический активатор, НАДН и АТФ ингибиторы. 3. α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс: ингибируют сукцинил-КоА и НАДН (т.е. продукты реакции) и высокий энергетический заряд клетки (много АТФ).

7.3. Биологическая роль общего пути катаболизма

1. За один оборот ЦТК молекула пировиноградной кислоты полностью окисляется до углекислоты и воды.



Всего образуется 3 молекулы CO_2 в следующих реакциях: при окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты, при декарбоксилировании изолимонной кислоты и при декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты. В общий путь катаболизма вступает 3 молекулы воды: в реакции окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, α -кетоглутаровой кислоты и гидрирования фумаровой кислоты. Всего при окислении пировиноградной кислоты отнимается пять пар атомов водорода, из них одна пара – от сукцината и поступает на ФАД, четыре пары – на НАД⁺ с образованием НАДН+Н⁺ при окислительном декарбоксилировании пировиноградной, α -кетоглутаровой кислот, дегидрировании изоцитрата и малата.

2. В общем пути катаболизма выделяют 2 группы реакций. 1) Окислительное декарбоксилирование пирувата, сопровождаемое образованием НАДН+Н⁺. 2) Окисление ацетил-КоА в цикле Кребса. После дегидрировании метаболитов цикла трикарбоновых кислот образуется 3НАДН + Н⁺ и ФАДН₂, которые передают свои протоны и электроны на

дыхательные цепи, где в сопряженных реакциях окислительного фосфорилирования и образуются молекулы АТФ. Общий итог:

1. Окислительное декарбоксилирование пирувата - 3 АТФ.
 2. В ЦТК и сопряженных дыхательных цепях - 11 АТФ.
 3. В реакции субстратного фосфорилирования ЦТК - 1 АТФ.
- Итого: 15 АТФ.

В общем пути катаболизма образуется 3 молекулы CO_2 (1 на стадии декарбоксилирования пирувата и 2 в ЦТК). И атом кислорода и атом углерода в углекислоте происходят от субстратов окисления.

Амфиболическая функция цикла трикарбоновых кислот включает катаболические и анаболические реакции.

Катаболические реакции – это окисление ацетил-КоА, возникшего из пирувата (окисление глюкозы) или жирных кислот (β -окисление жирных кислот), и превращения некоторых аминокислот путем переаминирования в пируват (ала), ЦУК (асп) или α -кетоглутарат (глу).

Анаболические реакции: 1) Ацетил-КоА является исходным соединением для синтеза жирных кислот и, следовательно жиров, изопреноидов (включая стероиды), кетонных тел. Ацетил-КоА служит донором ацетильной группы в синтезе различных эфиров (ацетилхолин, ацетилглюкозамин и др.). 2) Соединения, участвующие в ЦТК, образуют фонд промежуточных веществ, дающих начало ряду биосинтетических процессов. Например: *α -кетоглутарат* является важнейшим акцептором аминогрупп в реакциях трансаминирования: превращается в глутаминовую кислоту, которая затем превращается в глутамин, пролин, орнитин, цитруллин, аргинин и другие метаболиты. *ЦУК* является ключевым соединением для глюконеогенеза (синтеза углеводов). Путем трансаминирования из *ЦУК* образуются аспарагиновая кислота, аспарагин. Аспарагиновая кислота необходима для получения пиримидиновых нуклеотидов и некоторых аминокислот. *Сукцинил-КоА* может образовывать с глицином δ -аминолевулиновую кислоту, которая конденсируется в порфибилиноген $\rightarrow$ гем, цитохромы. *Фумарат* является одним из продуктов разложения ароматических аминокислот, он также образуется из аспарагиновой кислоты в цикле мочевины.

Итак, *общий путь катаболизма* обеспечивает: 1) продукцию энергии в дыхательных цепях, поставляя в нее протоны и электроны; 2) ряд биосинтетических процессов, начинающихся от ацетил-КоА и метаболитов ЦТК.

Роль витаминов в регуляции общего пути катаболизма. Семь витаминов выполняют функции кофакторов ферментов общего пути катаболизма.

1) Пируват- и α -кетоглутарат-дегидрогеназные комплексы: B_1 - необходим для синтеза ТПФ; липоевая кислота (витаминоподобное вещество); B_3 - необходим для синтеза HS-КоА; B_2 - необходим для синтеза ФАД; B_5 (PP) - необходим для синтеза НАД.

2) Биотин катализирует реакцию карбоксилирования пирувата с образованием ЩУК (щавелевоуксусной кислоты).

3) В₆ необходим для синтеза пиридоксальфосфата, являющегося кофактором аспартат- и аланинаминотрансфераз, катализирующих превращение аспарата в ЩУК и аланина в пируват, соответственно. Перечисленные выше витамины должны составлять основу сбалансированных поливитаминных препаратов.

Цикл трикарбоновых кислот обнаружен у животных, растений и микроорганизмов. Он может протекать не только в аэробных, но и в анаэробных условиях, например у фотосинтезирующих бактерий при наличии подходящего акцептора атомов водорода.

В клетках высших растений, плесневых грибов, ряда бактерий обнаружен **глиоксилатный цикл** (Г.Кребс, 1957), который служит механизмом пополнения промежуточных продуктов ЦТК. В животных клетках пока не найдены ключевые ферменты этого цикла. Глиоксилатный цикл – это видоизмененный ЦТК, в котором изоцитратдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс заменены *изоцитрат-лиазой*, которая расщепляет изолимонную кислоту до янтарной и глиоксиловой кислот. Другой ключевой фермент цикла – *малат-синтаза*, которая катализирует реакцию конденсации ацетил-КоА с глиоксиловой кислотой с образованием L-малата и HS-КоА. Итак, в глиоксилатном цикле идут следующие превращения: ЩУК + ацетилКоА → лимонная кислота → цис-аконитовая кислота → изолимонная кислота (выделяется сукцинат) → глиоксиловая кислота + ацетилКоА → яблочная кислота (выделяются 2H) → ЩУК. Таким образом, при каждом обороте цикла в него включаются две молекулы ацетилКоА и выделяется одна молекула янтарной кислоты. На последнем этапе цикла в малатдегидрогеназной реакции выделяются 2 атома водорода, которые в цепях переноса электронов дадут 3 молекулы АТФ.

Глиоксилатный цикл найден у микроорганизмов и дрожжей, использующих в качестве энергетического и пластического материала двухуглеродные соединения, например глицин или гликолевая кислота. Если уксусная кислота и этанол включаются в ЦТК в виде ацетилКоА, то глицин и гликолевая кислота окисляются до глиоксиловой кислоты. В тканях растений с помощью глиоксилатного цикла протекает превращение жиров в углеводы. Особенно активно этот процесс реализуется в прорастающих семенах масличных растений. Резервные триацилглицеролы расщепляются до жирных кислот, окисление последних ведет к образованию ацетилКоА, который в реакциях глиоксилатного цикла дает янтарную кислоту. Последняя превращается в углеводы через реакции ЦТК и глюконеогенеза. Глиоксилатный цикл локализуется в микротельцах растений, называемых *глиоксисомами*. Глиоксилатный цикл найден у беспозвоночных нематод и трематод (*Fasciola hepatica*). Появляются отдельные сообщения о выявлении ключевых ферментов глиоксилатного цикла в тканях позвоночных на стадии эмбриогенеза и в печени голодавших крыс.

Глава 8. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

8.1. Функции и строение углеводов

Все углеводы условно делят на две группы.

1. Углеводы с преимущественно *энергетической* функцией. При окислении 1 г углеводов выделяется примерно 16,9 кДж энергии.

- Моносахариды (*глюкоза, фруктоза, галактоза*). При полном окислении одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ (по современным данным 30-32 молекулы АТФ).

- Олигосахариды (в пище чаще используются *сахароза* – свекловичный сахар, при гидролизе образуются глюкоза и фруктоза и *лактоза* – молочный сахар, при гидролизе образуются глюкоза и галактоза).

- Гомополисахариды. *Крахмал* в растениях, *гликоген* в животных клетках), состоят из остатков α -D-глюкозы, соединенных $\alpha(1\rightarrow4)$ и в местах ветвления $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями. У человека в печени и мышцах содержится до 450 г гликогена. В гепатоцитах гликоген запасается в виде розеток (α -агрегаты), состоящих из β -частиц. Малые β -частицы находятся в цитоплазме мышечных клеток и содержат до 60000 остатков глюкозы. Гомополисахариды – это способ сохранения миллионов молекул глюкозы без увеличения осмотического давления.

Лихенин – включает остатки α -D-глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ гликозидными связями (73%) или $\alpha(1\rightarrow3)$ гликозидными связями (27%). Это полисахарид лишайников (до 50% на сухое вещество). Организм человека не усваивает, у северных оленей имеются специальные бактерии пищеварительного тракта, способные расщеплять лихенин.

2. Углеводы с преимущественно *структурной* функцией.

- Гомополисахариды. *Целлюлоза* наиболее распространенный структурный полисахарид растительного мира; на ее долю приходится более половины всего органического углерода биосферы. Целлюлоза представляет собой линейный полисахарид, состоящий из β -D-глюкопиранозных звеньев, соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидными связями. Эти линейные молекулы располагаются параллельно друг другу, между ними возникают водородные связи, образуются микрофибриллы. Микрофибриллы целлюлозы вместе с сопровождающими веществами (*гемицеллюлозы, лигнин, пектины*) образуют клеточную стенку растений.

Хитин – линейный полимер из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидными связями. Входит в состав кутикулы или наружного скелета членистоногих и некоторых других беспозвоночных животных, а также клеточных оболочек грибов. Хитин всегда связан с белками и неорганическими солями, липидами, пигментами. Является источником для энтеросорбента – хитозана.

Известны другие гомополисахариды растений: *инулин* – при гидролизе дает только фруктозу, *гемицеллюлозы* (*маннан* при гидролизе дает маннозу, *галактан* – галактозу, *арабан* – арабинозу).

- Гетерополисахариды. *Гликозамингликаны* (мукополисахариды) содержат чередующиеся парные звенья, состоящие из остатков аминсахаров и гексуроновых кислот, реже моносахаридов; обладают большой молекулярной массой и всегда связаны с белками; образуют основное вещество внеклеточного матрикса соединительной ткани. *Гиалуроновая кислота* построена из повторяющегося дисахарида β -D-глюкуроновая кислота и β -N-ацетил-D-глюкозамин, соединенных $\beta(1\rightarrow3)$

гликозидной связью. Дисахаридные единицы соединены $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидной связью. Входит в состав протеогликанов, содержится в пупочном канатике, стекловидном теле, внутрисуставной жидкости; у многих бактерий содержится в защитной капсуле, определяя вирулентность бактерии. *Хондроитинсульфаты* являются основным компонентом хрящей, сухожилий, роговицы глаза; содержатся также в коже и костях. *Хондроитинсульфаты А* и *С* состоят из повторяющихся звеньев дисахарида β -D-глюкуронозил-(1 $\rightarrow$ 3)- β -N-ацетил-D-галактозамина, соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидной связью. Хондроитинсульфат А содержит сульфогруппу в С-4 положении N-ацетил-D-галактозамина, а хондроитинсульфат С сульфатирован при С-6. В эту группу входят также *дерматансульфат*, *кератансульфаты*, *гепарин* и *гепарансульфат*.

Агар-агар – смесь агарозы и агаропектина. Агароза состоит из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы, соединенных поочередно $\beta(1\rightarrow4)$ - и $\alpha(1\rightarrow3)$ гликозидными связями. Агаропектин содержит цепочки, образуемые остатками D-галактопиранозы, часть которых сульфатирована. Агар-агар растворяется в воде при нагревании, при остывании образуются гели (в микробиологии используется для создания питательных сред, а в кондитерской промышленности для приготовления желе, пастилы, мармелада. Агар-агар добывают из морской багряной водоросли *анфельции*.

- *Гликопротеины* и *гликолипиды* принимают участие в построении клеточных мембран и выполнении некоторых клеточных функций, таких как рост, адгезия и др. В состав клеточных стенок бактерий входит пептидогликан – *муреин*. Он образует каркас стенок бактерий. Муреин стенки *Staphylococcus aureus* включает муропептид – дисахарид, в котором N-ацетил-D-глюкозамин соединен $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидной связью с N-ацетилмуравовой кислотой.

Лектины (от латинского *legere*, что значит выбор) – белки, способные связывать специфически моно- и олигосахариды; не являются ферментами или антителами; участвуют в реакциях преципитации или агглютинации клеток (например, эритроцитов), в развитии митогенетической стимуляции лимфоцитов и проявлениях цитотоксичности. Это весьма гетерогенная группа олигомерных протеинов, отличающихся по структуре и молекулярной организации. Эти белки встречаются от вирусов до высших млекопитающих. Лектины делят на 5 групп в зависимости от аффинности связываемого моносахарида: 1) связывают *маннозу* лектины бобов (conA), сыворотки крови крыс (MBP) и тип 1 фимбрий *E. coli*; 2) связывают *N-ацетилглюкозамин* лектины из зерен пшеницы (WGA) и из печени птиц; 3) связывают *галактозу/N-ацетилгалактозамин* лектины из семян кораллового дерева (ECorL), соевых бобов, печени крыс (HBP, RHL), позвоночных (галектины), садовых улиток, амёб; 4) связывают *фукозу* лектины из аспарагуса и печени крыс; 5) связывают *сиаловую кислоту* лектины из бузины, крабов, лобстера, вирусов гриппа и полиомы. Лектины способны связывать олигосахариды (фитогемагглютинин) и др. Выделенные и очищенные лектины являются реагентами, которые используются в исследовании межклеточных взаимоотношений, изучении иммунного статуса организма.

8.2. Глюкоза как важнейший метаболит углеводного обмена

Глюкоза является основным метаболитом углеводного обмена.

Основными *источниками* глюкозы является: 1) пища; 2) распад гликогена; 3) синтез глюкозы из неуглеводных предшественников (глюконеогенез).

Основные пути *расходования* глюкозы: 1) распад глюкозы с целью получения энергии (аэробный и анаэробный гликолиз); 2) синтез гликогена; 3) пентозофосфатный путь распада для получения других моносахаридов и восстановленного НАДФН₂; 4) синтез других соединений (жиры, аминокислоты, гетерополисахариды и др.).

Поступление глюкозы из крови в клетки у млекопитающих осуществляется с помощью специальных переносчиков глюкозы – GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5 (glucose transporter). Переносчики глюкозы представляют собой семейство структурно близких мембранных белков с различными функциями. Распределение этих белков-переносчиков в тканях отражает их роль и особенности метаболизма глюкозы.

GLUT1 находятся в эритроцитах и почти во всех клетках. К_м для глюкозы 1-2 ммоль/л, что обеспечивает захват глюкозы при небольших изменениях концентрации в крови.

GLUT2 имеет меньшее сродство к глюкозе (К_м=15-20 ммоль/л), находится в печени, тонком кишечнике, почках, β-клетках поджелудочной железы, обеспечивает быстрый захват глюкозы печенью и стимулирует секрецию инсулина β-клетками поджелудочной железы.

GLUT3 обнаружен в нейронах и имеет относительно низкую К_м для глюкозы (1-2 ммоль/л), что позволяет обеспечивать глюкозой мозг в условиях гипогликемии.

GLUT4 (К_м = 2-10 ммоль/л) является переносчиком глюкозы, который стимулируется инсулином и обеспечивает захват глюкозы мышечной и жировой тканями. Повышение скорости поступления глюкозы происходит в результате транслокации молекулы переносчика из внутриклеточных везикул к плазматической мембране.

GLUT5 синтезируется клетками кишечного эпителия. Этот переносчик обеспечивает симпорт глюкозы с ионами Na⁺.

8.3. Гликолиз

Гликолиз (от греческого glucose – сахар, lysis – разрушение) – последовательность реакций превращения глюкозы в пируват или лактат с образованием энергии в виде АТФ.

Основные признаки гликолиза.

1. Протекает во всех клетках организма. Ферменты локализованы в *цитозоле* клеток.

2. *Лактат* является конечным продуктом гликолиза в *анаэробных условиях* (в отсутствии кислорода). В *аэробных условиях* (присутствие кислорода) образуется *пируват*, который затем окисляется до CO₂ и H₂O.

3. В клетках, *лишенных митохондрий* (эритроциты, роговая оболочка глаза, хрусталик глаза) гликолиз является главным источником образования АТФ. В клетках, имеющих митохондрии, является *этапом аэробного окисления* углеводов.

4. Наиболее активно протекает в мозге, поскольку окисление глюкозы является основным источником энергии для нервной ткани. У взрослого человека около половины глюкозы используется мозгом.

5. В *анаэробных* условиях гликолиз – *единственный процесс* в организме животных, растений и многих микроорганизмов, приводящий к образованию АТФ; в организме человека и животных гликолиз позволяет поддерживать интенсивную работу скелетной мышцы в условиях недостатка кислорода.

6. Промежуточные продукты гликолиза используются для биосинтеза заменимых аминокислот и глицерола.

Аэробный распад глюкозы является основным путем катаболизма глюкозы у человека и включает следующие процессы: 1) распад глюкозы до пирувата (гликолиз или специфический путь распада глюкозы); 2) перенос пирувата в митохондрии и окислительное декарбоксилирование с образованием ацетил-КоА; 3) окисление ацетил-КоА в ЦТК и сопряженных цепях переноса электронов до CO_2 и H_2O .

- *Специфический путь катаболизма глюкозы* включает 10 реакций и протекает в цитозоле одинаково в аэробных и анаэробных условиях.

1. Глюкоза фосфорилируется ферментами *гексокиназой* (печень, мышцы, $K_m=0,1 \text{ мМ}$) и *глюкокиназой* (печень, $K_m=10 \text{ мМ}$) с использованием АТФ и Mg^{2+} . Из-за высокого сродства (низкая K_m) гексокиназа фосфорилирует глюкозу даже при низкой концентрации, в то время как глюкокиназа действует только при высокой концентрации глюкозы (после приема пищи). Глюкозо-6-фосфат не проходит через клеточные мембраны и является ключевой молекулой различных метаболических путей обмена углеводов – гликолиза, гликогенолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути.

2. Глюкозо-6-фосфат изомеризуется под действием фермента *фосфогексоизомеразы* и Mg^{2+} во фруктозо-6-фосфат. Реакция является обратимой.

3. Фруктозо-6-фосфат фосфорилируется во фруктозо-1,6-бисфосфат под действием фермента *фосфофруктокиназы* за счет второй молекулы АТФ и ионов Mg^{2+} . Данная реакция является *лимитирующей* и определяет скорость всего процесса.

4. Фруктозо-1,6-бисфосфат *расщепляется* на 2 триозы: диоксиацетонфосфат (ДОАФ) и 3-фосфоглицероловый альдегид (3-ФГА) под действием фермента *альдолазы*. Реакция обратима.

5. Фермент *триозофосфатизомераза* катализирует обратимое взаимопревращение 3-ФГА и ДОАФ. Реакция является обратимой, но в последующие реакции гликолиза может непосредственно включаться только 3-ФГА. Вследствие этого равновесие сдвигается в направлении превращения ДОАФ в 3-ФГА.

6. *Дегидрогеназа 3-фосфоглицеролового альдегида* превращает 3-ФГА в 1,3-бисфосфоглицероловую кислоту. В активном центре фермента в качестве кофермента находятся прочно связанный НАД и SH-группа цистеина. Вначале образуется фермент-субстратный комплекс по типу тиополуацетала за счет SH-группы фермента. Затем происходит дегидрирование субстрата, восстановление НАД⁺ и образование макроэргической связи. На следующем этапе атомы водорода передаются на цитозольный НАД⁺, восстанавливая его в НАДН+Н⁺. Образовавшаяся макроэргическая связь непрочна и расщепляется под влиянием неорганического фосфата. Реакция блокируется йодом или бромацетатом.

7. Фермент *фосфоглицераткиназа* действует на 1,3-бисфосфоглицерат. При этом происходит передача богатой энергией фосфатного остатка (фосфатной группы в положении 1) на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицероловой кислоты.

Таким образом, благодаря действию двух ферментов энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы до карбоксильной группы, запасается в форме энергии АТФ. Синтез АТФ происходит путем *субстратного фосфорилирования*.

8. 3-фосфоглицерат превращается в 2-фосфоглицерат под действием фермента *фосфоглюкомутаза*. Реакция сопровождается внутримолекулярным переносом фосфатной группы из положения 3 в положение 2. Реакция обратима и требует ионов Mg²⁺.

9. Под действием фермента *енолазы* 2-фосфоглицероловая кислота в результате отщепления молекулы воды переходит в фосфоенолпировиноградную кислоту (фосфоенолпируват), а фосфатная связь во 2 положении становится высокоэргической. Енолаза активируется катионами Mg²⁺ или Mn²⁺ и ингибируется фторидом.

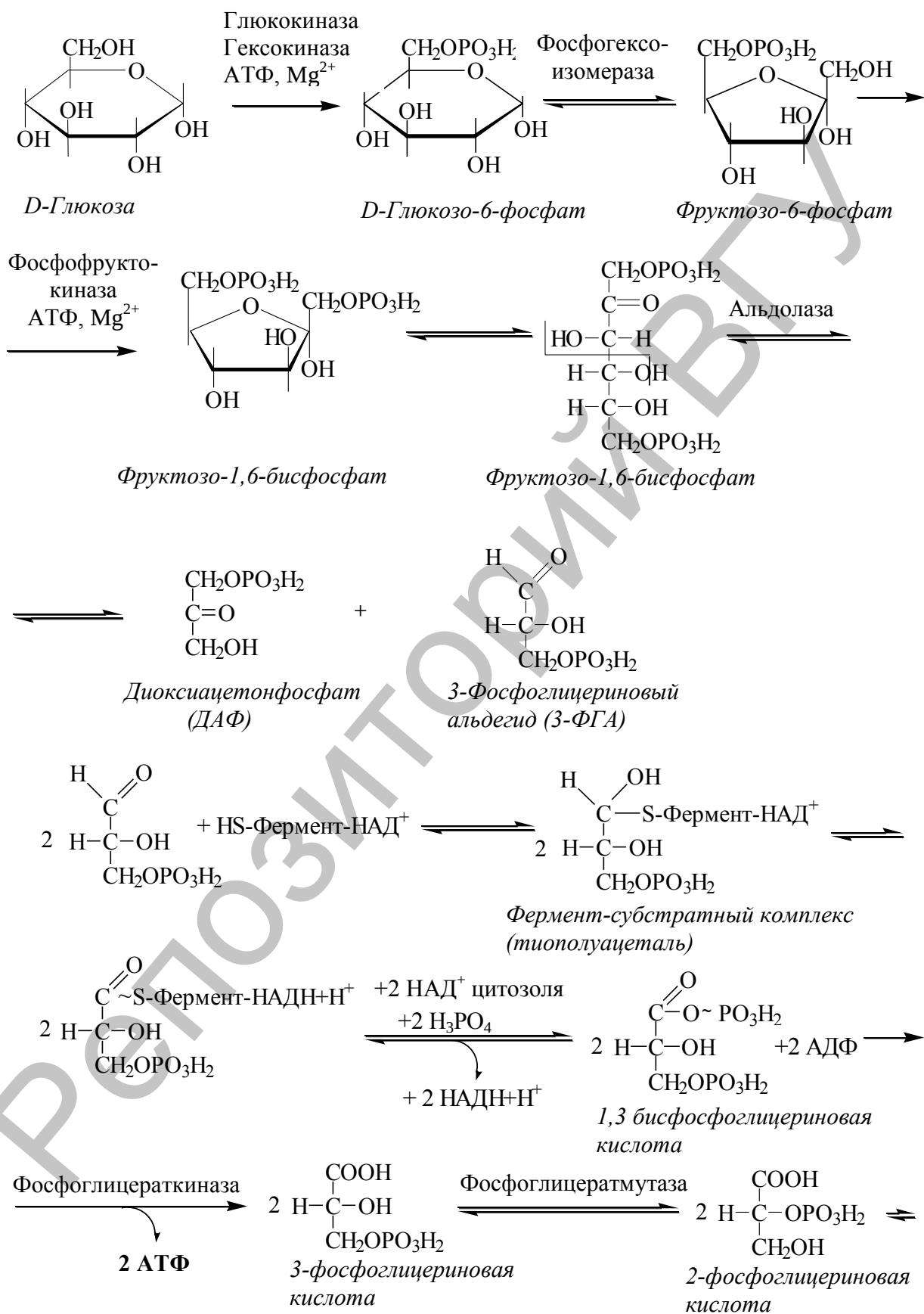
10. Фермент *пируваткиназа* катализирует разрыв высокоэргической связи и перенос фосфатного остатка от фосфоенолпирувата на АДФ (субстратное фосфорилирование). Для действия пируваткиназы необходимы ионы Mg²⁺, а также одновалентные катионы щелочных металлов. Внутри клетки реакция является практически необратимой.

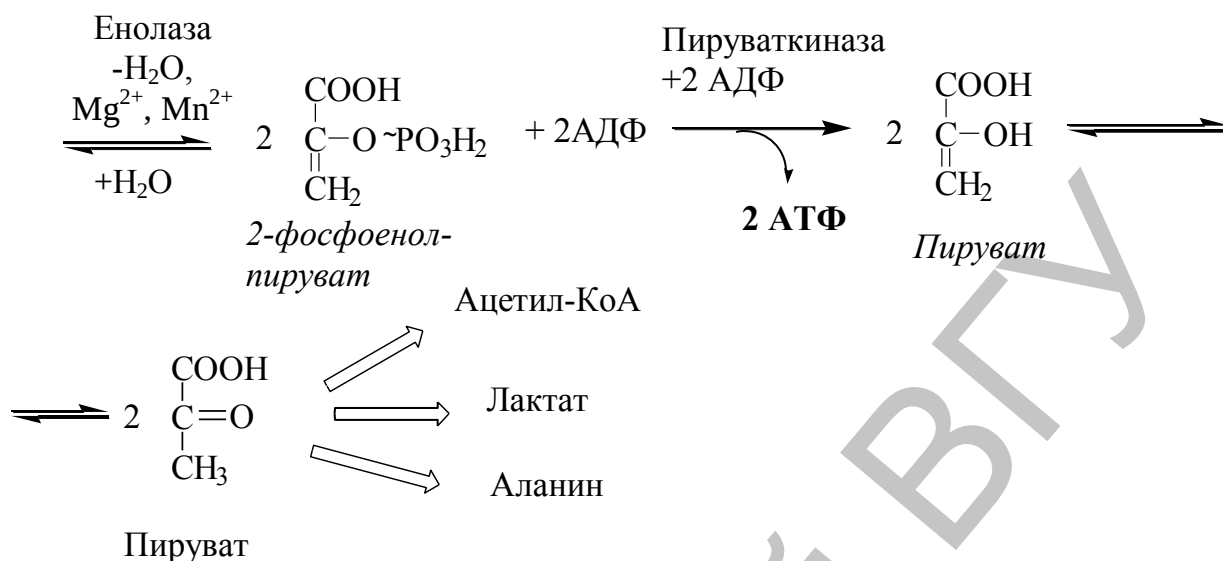
Большинство реакций гликолиза является обратимыми. Три реакции, катализируемые ферментами *гексокиназа* (глюкокиназа), *фосфофруктокиназа* и *пируваткиназа* являются *необратимыми*. На этих этапах осуществляется регуляция гликолиза.

Регуляция гликолиза

1. Фермент *гексокиназа* аллостерически ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Этот фермент предотвращает накопление глюкозо-6-фосфата. Глюкокиназа является индуцибельным ферментом.

2. *Фосфофруктокиназа* является аллостерическим ферментом. АТФ, цитрат и Н⁺ (низкое рН) являются аллостерическими ингибиторами; АМФ, фруктозо-2,6-бисфосфат и Pi – аллостерическими активаторами.





При значительных величинах отношения АТФ/АМФ активность фосфофруктокиназы угнетается и гликолиз замедляется. При снижении этого коэффициента интенсивность гликолиза повышается.

3. *Пируваткиназа* ингибируется АТФ и активируется фруктозо-1,6-бисфосфатом. Пируваткиназа активна в дефосфорилированной форме и неактивна в фосфорилированной форме (регуляция путем химической модификации).

Таким образом, в результате гликолиза образуется 2 молекулы пирувата, 2 АТФ (образуется 4 АТФ, но 2 АТФ затрачивается на гексокиназной и фосфофруктокиназной стадиях) и 2 молекулы $\text{НАДН} + \text{H}^+$.

Значение гликолиза велико в тканях и органах, где ограничен доступ кислорода или возможно внезапное и резкое возрастание скорости потребления АТФ. Например, в работающей сердечной мышце скорость потребления АТФ может возрасти в несколько раз, а в работающей скелетной мышце – в несколько десятков раз. Когда аэробных возможностей для обеспечения повышенной потребности в АТФ становится недостаточно, дополнительное количество АТФ будет черпаться из гликолиза.

У растений в некоторых тканях гликолиз протекает даже при достаточном доступе кислорода. Особенно характерно это явление («анаэробное дыхание» или «аэробное брожение») для зародышевой ткани семян и внутренних тканей плодов растений вследствие недостатка в них кислорода. Гликолиз является основным путем катаболизма глюкозы молочнокислыми бактериями и дрожжами.

Образовавшийся пируват поступает в митохондрии, где подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА, который сгорает в ЦТК до CO_2 и H_2O .

На стадии окисления 3-фосфоглицеролового альдегида в 1,3-бисфосфоглицероловую кислоту образуется восстановленный цитозольный НАД. Перенос восстановительных эквивалентов от $\text{НАДН} + \text{H}^+$ в митохондрии происходит с помощью малатного челночного механизма. Молекула восстановленного НАД не может проникать в

митохондрии. Поэтому от цитозольного $\text{НАДН} + \text{Н}^+$ восстановительные эквиваленты сначала при участии малатдегидрогеназы переносятся на цитозольный оксалоацетат (ЩУК). В результате образуется малат, который с помощью переносчиков проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс. Здесь малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный НАД^+ восстанавливается в $\text{НАДН} + \text{Н}^+$, который передает электроны в дыхательную цепь ферментов. В результате окислительного фосфорилирования образуется 3 молекулы АТФ.

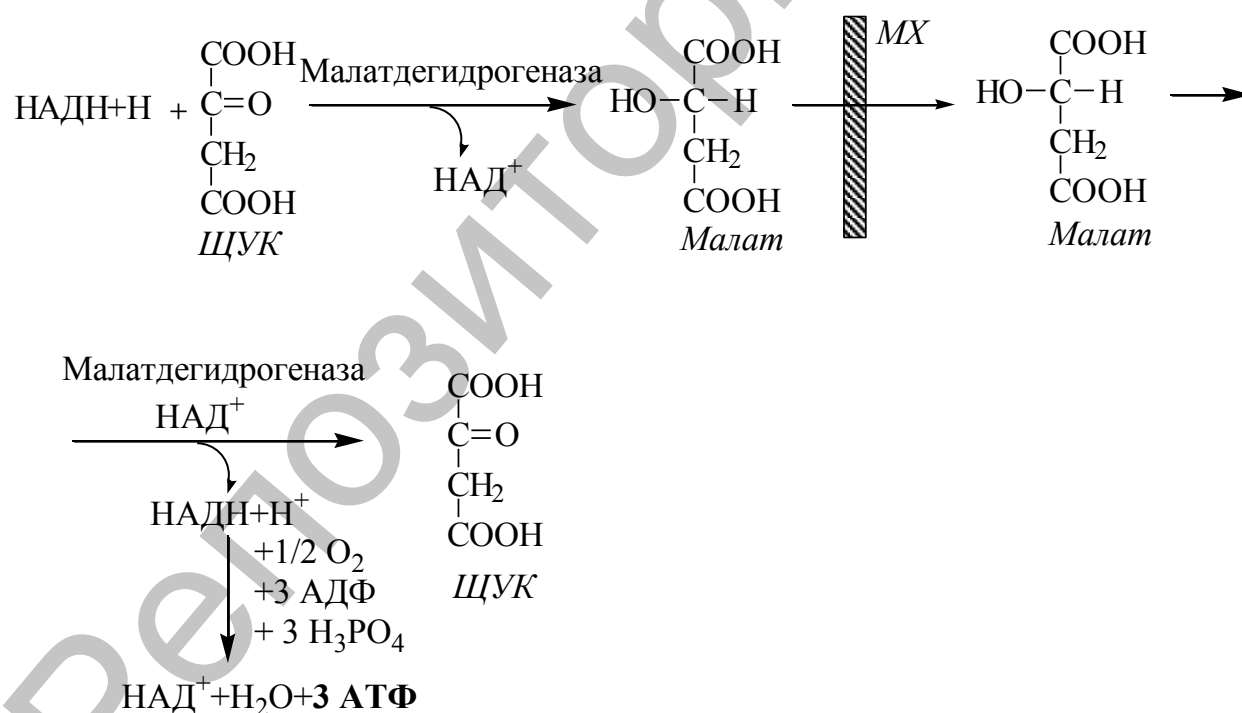
Энергетический баланс аэробного распада глюкозы

1. При специфическом пути распада глюкозы образуется 2 молекулы пирувата, 2 АТФ (субстратное фосфорилирование) и 2 молекулы $\text{НАДН} + \text{Н}^+$.

2. Окислительное декарбоксилирование каждой молекулы пирувата - 3 АТФ; 2 молекул пирувата дадут 6 молекул АТФ.

3. В результате сгорания ацетил-КоА в ЦТК и сопряженных ЦПЭ - 12 АТФ; 2 молекулы ацетил-КоА дадут 24 АТФ.

4. Малатный челночный механизм переносит $\text{НАДН} + \text{Н}^+$ в митохондрии - 3 АТФ; 2 $\text{НАДН} + \text{Н}^+$ дадут 6 АТФ.



Малатный челночный механизм

Итого: при распаде 1 молекулы глюкозы в аэробных условиях образуется 38 молекул АТФ. В некоторых тканях действует не малатный, а глицерофосфатный челночный механизм переноса восстановительных эквивалентов; в этом случае в митохондрии поступит 2 молекулы ФАДН_2 ,

которые в ЦПЭ дадут 4 молекулы АТФ и тогда общее количество при полном окислении глюкозы будет 36 АТФ.

По современным представлениям считается, что $\text{НАДН} + \text{H}^+$ в полной дыхательной цепи дает 2,5 АТФ, а ФАДН_2 – 1,5 АТФ. Тогда полное окисление одной молекулы глюкозы будет сопровождаться выделением 32 (30) молекул АТФ (32 АТФ при малатном челночном переносе восстановительных эквивалентов через митохондриальную мембрану и 30 – при глицерофосфатном челночном механизме).

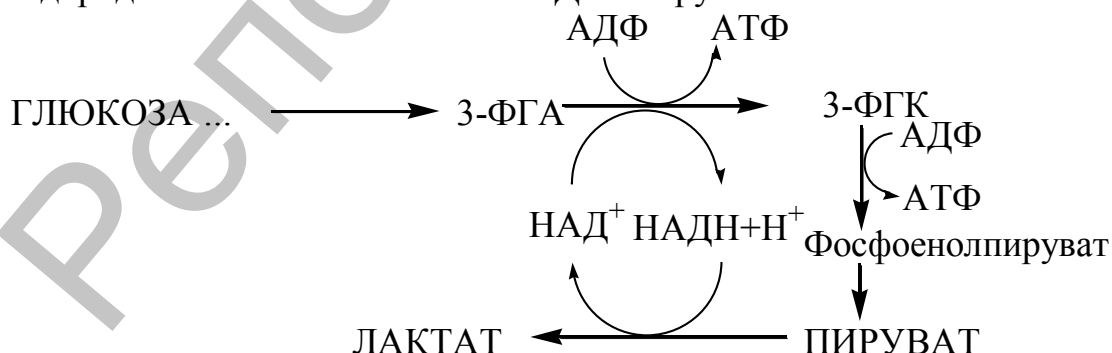
α -Глицерофосфатный челночный механизм переносит восстановительные эквиваленты за счет восстановления диоксиацетонфосфата до α -глицерофосфата с использованием $\text{НАДН} + \text{H}^+$ и фермента глицерофосфатдегидрогеназы. Эта реакция важна в жировой ткани при биосинтезе триацилглицеролов и глицерофосфолипидов.

В **анаэробных условиях** распад глюкозы до пирувата происходит аналогично, как и в аэробных условиях.

Судьба пирувата, образуемого при гликолизе, зависит от наличия или отсутствия кислорода. В анаэробных условиях в результате одиннадцатой реакции происходит восстановление пировиноградной кислоты и образуется *молочная кислота* (лактат). Реакция протекает при участии фермента *лактатдегидрогеназы* и кофермента $\text{НАДН} + \text{H}^+$, образованного при окислении 3-фосfogлицеролового альдегида в 1,3-бисфосfogлицероловую кислоту. Образование лактата позволяет регенерировать НАД^+ , который затем снова используется дегидрогеназой-3-фосfogлицеролового альдегида.



В гликолизе выделяют *центральную окислительно-восстановительную реакцию гликолиза* (гликолитическую оксидоредукцию), которая состоит в окислении 3-фосfogлицеролового альдегида с образованием $\text{НАДН} + \text{H}^+$ с последующим переносом атомов водорода от восстановленного НАД на пируват.



Гликолиз до лактата происходит только в *анаэробных условиях* (например, в *мышцах при интенсивной мышечной работе*) и в клетках, *лишенных митохондрий* (эритроциты).

Итак, энергетическая эффективность гликолиза в анаэробных условиях составляет 2 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы.

Анаэробному расщеплению могут подвергаться глюкозные остатки, отщепленные от концов цепей гликогена фосфоролитическим путем – *гликогенолиз*. Включение гликогена в процесс анаэробного распада осуществляется с помощью трех ферментов: 1) гликоген-фосфорилаза катализирует расщепление концевых α -1,4-гликозидных связей с выделением глюкозо-1-фосфата; 2) дебраншинг фермент катализирует расщепление α -1,6-гликозидных связей с выделением глюкозо-1-фосфата; 3) фосфоглюкомутаза катализирует превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат. Поскольку при гликогенолизе на образование глюкозо-6-фосфата АТФ не тратится, в процессе гликогенолиза накапливаются не две, а три молекулы АТФ на глюкозный остаток. Однако это не означает, что гликогенолиз энергетически более выгоден, чем гликолиз, так как на синтез гликогена из глюкозы расходуется АТФ.

Итак, при расщеплении гликогена в анаэробных условиях (гликогенолиз) образуется 3 молекулы АТФ (не тратится АТФ на образование глюкозо-6-фосфата).

Эффект Пастера - ингибирование гликолиза (накопления лактата) кислородом. Механизмы эффекта:

1. При аэробном распаде углеводов не функционирует окислительно-восстановительная реакция гликолиза, поскольку восстановительные эквиваленты НАДН+Н⁺ из цитоплазмы переносятся в митохондрии. Поэтому НАДН+Н⁺ не может служить для восстановления пирувата в лактат.

2. При наличии аэробных условий образуются цитрат и АТФ, которые аллостерически тормозят активность фосфофруктокиназы (реакция лимитирует скорость всего процесса).

3. Дыхание подавляет гликолиз из-за конкуренции за АДФ между митохондриальной цепью переноса электронов и фосфоглицераткиназой и пируваткиназой гликолиза в цитоплазме. АДФ преимущественно используется в реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях, а не субстратного фосфорилирования в гликолизе.

8.4. Брожение

Гликолиз лежит в основе ряда процессов брожения, т.е. катаболических превращений углеводов микроорганизмами в анаэробных условиях (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Виды брожения

Вид брожения	Микроорганизмы, вызывающие брожение	Конечный продукт
Молочнокислое гомоферментативное	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactobacterium ps.</i>	Молочная кислота
Молочнокислое гетероферментативное	Бактерии из родов <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Scnigella</i>	Молочная, муравьиная, янтарная кислоты,

		этанол
Спиртовое	Некоторые грибы, преимущественно дрожжи <i>Saccharomyces sp.</i>	Этанол
Маслянокислое	<i>Butyribacterium sp.</i> , <i>Sarcina maxima</i> , некоторые виды из родов <i>Clostridium</i> <i>Neisseria</i>	Бутанол, изопропанол, этанол, ацетон, уксусная и масляная кислоты
Бутиленгликолевое	Некоторые виды из родов <i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i>	Ацетон, бутиленгликоль, молочная и муравьиная кислоты
Пропионовокислое	<i>Clostridium propionium</i> , <i>Propionibacterium sp.</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , некоторые виды из родов <i>Micromonospora</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Veillonella</i>	Пропионовая, янтарная, уксусная кислоты

Брожение, как и анаэробное расщепление углеводов, - это внутренние окислительно-восстановительные процессы, в результате которых роль конечного акцептора электронов и протонов играет не кислород, а органические соединения.

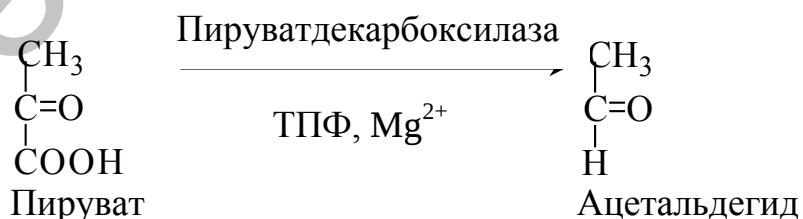
Гомоферментативное молочнокислое брожение идентично по химизму реакциям гликолиза в анаэробных условиях. В результате из глюкозы образуется молочная кислота с почти 100%-м выходом, при гетероферментативном (смешанном) молочнокислом брожении из глюкозы, кроме молочной кислоты, образуются другие продукты в процессе ее метаболизма

Спиртовое брожение осуществляется так называемыми дрожжеподобными организмами, а также некоторыми плесневыми грибами. Суммарную реакцию спиртового брожения можно изобразить следующим образом:



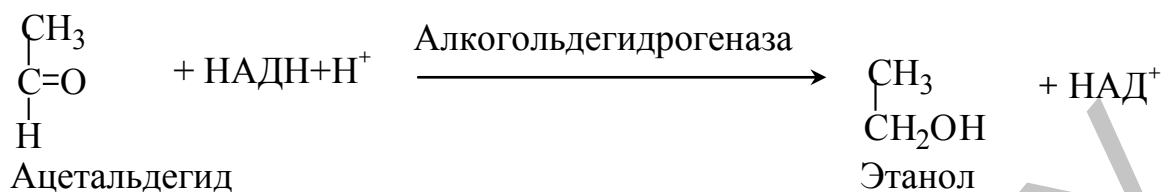
Процесс спиртового брожения протекает по пути гликолиза до образования пирувата.

В дрожжевых клетках (спиртовое брожение) пируват вначале подвергается декарбоксилированию, в результате чего образуется ацетальдегид. Данная реакция катализируется пируватдекарбоксилазой, который требует наличия ионов Mg^{2+} и кофермента тиаминпирофосфата:



Затем образовавшийся ацетальдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от $НАДН_2$, восстанавливаясь при этом в этанол. Реакция катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой.

Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO_2 , а не молочная кислота, как при гликолизе.



Утилизация этанола происходит с участием 3-х ферментативных систем: 1) алкогольдегидрогеназа (80%), микросомальная этанолюкисляющая система (15%) и каталаза (около 5%).

1. Алкоголь окисляется в печени цитозольным ферментом *алкогольдегидрогеназой* до ацетальдегида, что сопровождается накоплением избыточного количества НАДН. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{НАД}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{НАДН} + \text{H}^+$. НАДН конкурирует с восстановительными эквивалентами, образованными при окислении других субстратов, за дыхательные цепи.

2. Далее ацетальдегид окисляется до ацетата митохондриальной *альдегиддегидрогеназой*. $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{НАДН} + \text{H}^+$.

3. Ацетат превращается в *ацетил-КоА*, который окисляется в ЦТК для получения энергии.

4. *Ацетил-КоА* может быть использован для биосинтеза липидов в печени.

5. Этанол может быть окислен микросомальной этанолюкисляющей системой $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{НАДФН} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{НАДФ}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$. Этанол может ингибировать метаболизм некоторых лекарств, например, барбитуратов, конкурируя за цитохром Р-450.

Алкоголь всасывается в желудке (20%) и в кишечнике (80%). Всасывание замедляется при одновременном потреблении жирной пищи.

8.5. Пентозофосфатный путь обмена углеводов

Пентозофосфатный путь распада глюкозы (ПФП) называется также гексозомонофосфатным шунтом или фосфоглюконатным путем. Это альтернативный путь гликолизу и ЦТК для окисления глюкозы.

Ферменты пентозофосфатного пути локализованы в *цитозоле*. Наиболее активно ПФП протекает в *почках, печени, жировой ткани, коре надпочечников, эритроцитах, лактирующей молочной железе*. В большинстве из этих тканей протекает процесс биосинтеза жирных кислот и стероидов, что требует НАДФН.

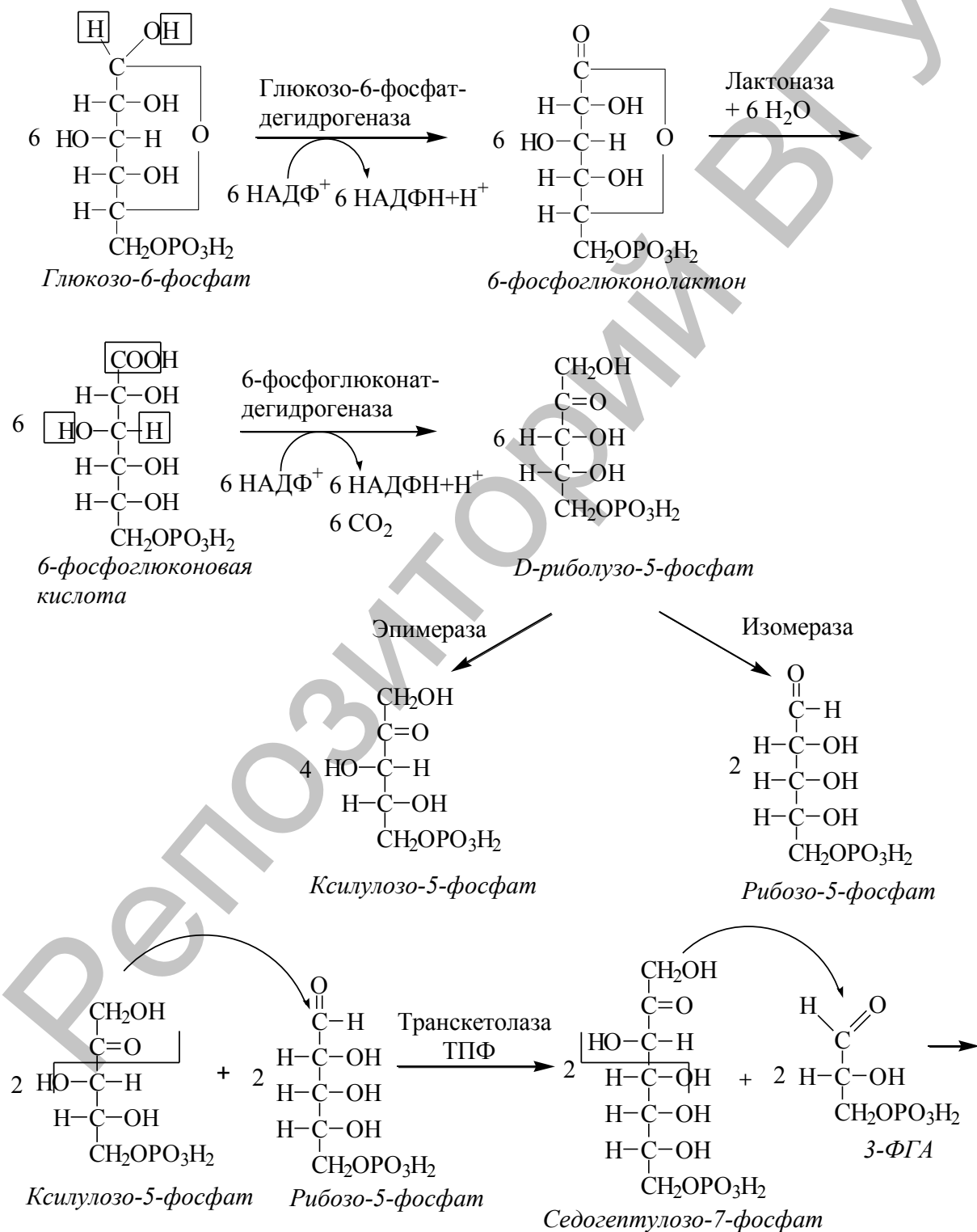
Выделяют 2 стадии ПФП: окислительную и неокислительную.

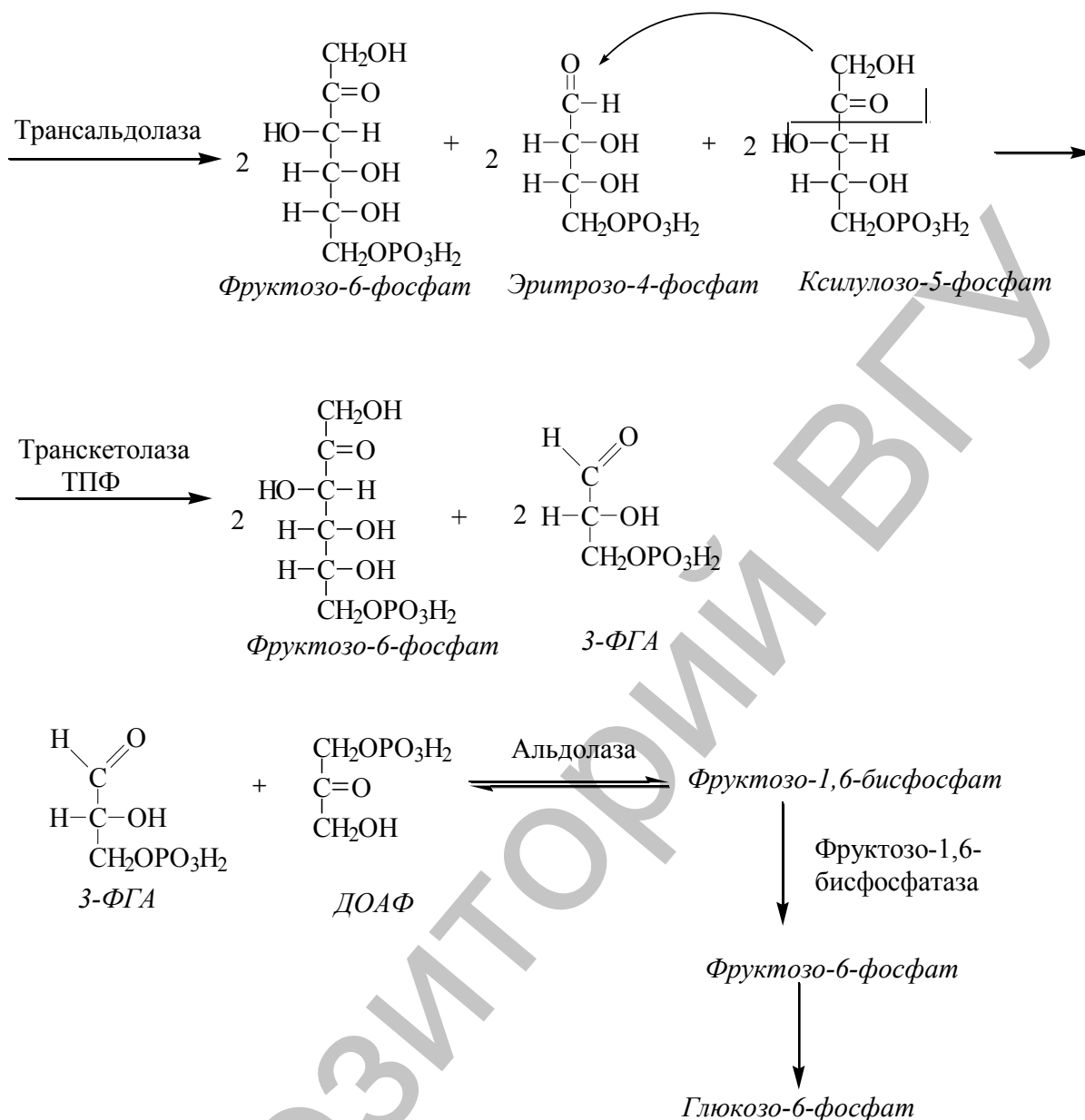
Окислительная стадия ПФП включает пять реакций:

1. *Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа* является НАДФ-зависимым ферментом и дегидрирует глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконолактон.

2. 6-фосфоглюконолактон – нестабильное соединение, которое либо спонтанно, либо с помощью фермента *лактоназы* гидролизуется с образованием 6-фосфоглюконовой кислоты (6-фосфоглюконата).

3. *6-фосфоглюконатдегидрогеназа* (декарбоксилирующая) дегидрирует и декарбоксилирует 6-фосфоглюконат. В результате образуется *рибулозо-5-фосфат*.





4. Под действием *эпимеразы* из рибулозо-5-фосфата образуется ксилулозо-5-фосфат,

5. Фермент *изомеразы* превращает рибулозо-5-фосфат в рибозо-5-фосфат. Если рибозо-5-фосфат вовлекается в анаболические процессы, пентозофосфатный путь на этом этапе может быть завершен. Для этого рибозо-5-фосфат превращается в 5-фосфорибозил 1-пирофосфат (ФРПФ) в реакции, катализируемой рибозофосфат-пирофосфокиназой.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа лимитирует превращения в окислительных реакциях пентозофосфатного пути. Активность окислительных реакций пентозофосфатного пути оценивают по трем показателям: 1) активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 2) по количеству ФРПФ; 3) объему биосинтеза пуриновых нуклеотидов. По степени выраженности окислительных реакций пентозофосфатного пути

на основании количественной оценки этих трех показателей органы располагаются в последовательности: почки > печень > сердечная мышца > скелетная мышца.

Неокислительные реакции могут начинаться от фруктозо-6-фосфата и завершаться образованием пентозофосфатов или они могут быть продолжением окислительных реакций, включая превращения пентозофосфатов до фруктозо-6-фосфата (последний вариант превращений ранее назывался «пентозный цикл»).

Процесс включает взаимопревращения моносахаридов, содержащих 3, 4, 5 и 6 углеродных атомов:

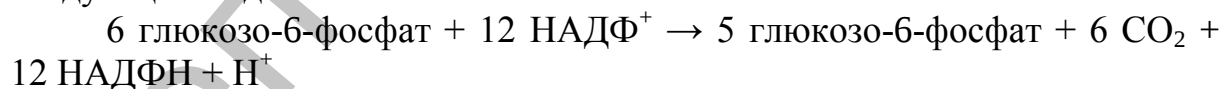
6. Под действием *транскетолазы* (кофермент тиаминпирофосфат) происходит взаимодействие ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата. В результате переноса гликоальдегидной группы образуется семиуглеродный моносахарид – седогептулозо-7-фосфат и 3-фосфоглицероловый альдегид.

7. Фермент *трансальдолаза* катализирует перенос остатка диоксиацетона от седогептулозо-7-фосфата на 3-фосфоглицероловый альдегид с образованием эритрозо-4-фосфата и фруктозо-6-фосфата.

8. Затем снова действует *транскетолаза* и переносит гликоальдегидную группу с ксилулозо-5-фосфата на эритрозо-4-фосфат. В результате образуется *фруктозо-6-фосфат* и *3-фосфоглицероловый альдегид*.

9. Фруктозо-6-фосфат и 3-ФГА могут в дальнейшем метаболизироваться через гликолиз и ЦТК, а также использоваться на синтез глюкозы (фруктозо-6-фосфат → глюкозо-6-фосфат → глюкоза).

По классическим представлениям в результате пентозофосфатного пути из 6 молекул глюкозо-6-фосфата образуется 5 молекул глюкозо-6-фосфата и 6 молекул CO_2 . 6 молекул CO_2 образуются из C-1 атомов шести молекул глюкозо-6-фосфата. Суммарное уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного пути можно представить в следующем виде:



Однако пентозофосфатный путь отличается крайней гибкостью. Основной способ его регуляции – это доступность метаболитов. Если в клетке потребности в рибозо-5-фосфате и НАДФН сбалансированы, то неокислительной стадии не нужно. Но если, например, жировым клеткам НАДФН нужно значительно больше, чем рибозо-5-фосфата, то избыток последнего через неокислительные реакции и реакции глюконеогенеза превращается в глюкозо-6-фосфат. В этом случае молекулы глюкозы вступают повторно в окислительные реакции и могут полностью окисляться до CO_2 . Следовательно, неокислительные реакции

пентозофосфатного служат гарантом для удовлетворения потребности клетки в НАДФН или ФРПФ.

Функции пентозофосфатного пути

1. Образование НАДФН+Н⁺ (50% потребности организма), необходимого для биосинтеза жирных кислот, холестерина, микросомального окисления и т.д. Особенно важен этот процесс для функционирования эритроцитов. В этих клетках НАДФН необходим для поддержания отношения глутатион восстановленный/глутатион окисленный на уровне 1:500. Восстановленный глутатион служит для поддержания остатков цистеина в гемоглобине и других белках в восстановленном состоянии.

2. Синтез рибозо-5-фосфата, используемого для образования 5-фосфорибозил 1-пирофосфата, который необходим для синтеза пуриновых нуклеотидов и присоединения оротовой кислоты в процессе биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.

3. Синтез углеводов с различным числом атомов углерода (C₃-C₇).

4. У растений образование рибулозо-1,5-бисфосфата, который используется как акцептор CO₂ в темновой стадии фотосинтеза.

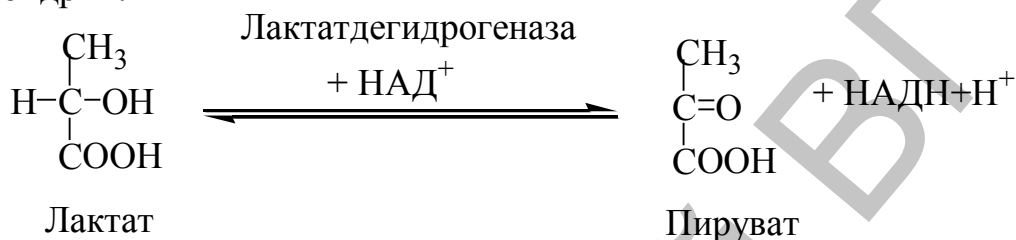
Путь Энтнера-Дудорова характерен для некоторых микроорганизмов (бактерии рода *Pseudomonas*), которые получают энергию с помощью специального метаболического пути, связанного с пентозофосфатным путем превращений углеводов через 6-фосфоглюконовую кислоту, а с гликолизом – через 3-фосфоглицериновый альдегид. Первые две реакции пути Энтнера-Дудорова идентичны началу пентозофосфатного пути. Затем следуют специфичные для этого пути метаболизма реакции образования кетодезоксифосфоглюконовой кислоты с последующим ее альдолазным расщеплением на две триозы - 3-фосфоглицериновый альдегид и пируват. В этом пути образуется 1 молекула АТФ, 1 молекула НАДН и 1 молекула НАДФН. Это кратчайший путь образования пирувата (4 реакции) у прокариот, тогда как в гликолизе требуется 9 реакций.

8.6. Глюконеогенез

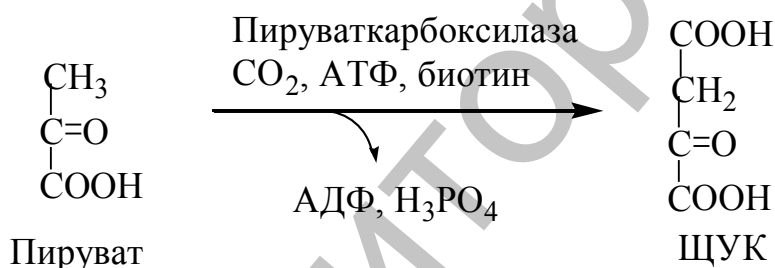
Глюконеогенез – синтез углеводов из неуглеводных предшественников (гликогенных аминокислот, глицерола, лактата, пропионовой кислоты). Глюконеогенез протекает в *цитозоле* клеток *печени* и *почек*, хотя некоторые предшественники образуются в митохондриях. Глюконеогенез необходим для синтеза глюкозы, которая является источником энергии, особенно для нервной ткани и эритроцитов. При голодании более 1 суток, за счет глюконеогенеза поддерживается базальный уровень глюкозы в крови и обеспечивается промежуточными продуктами ЦТК. При *интенсивной физической работе* синтез глюкозы происходит из *лактата* и *глицерола*, при *голодании* – из *глицерола*, образующегося при распаде жиров и *аминокислот*, поступающих при катаболизме белков мышц.

Большинство стадий глюконеогенеза представляет собой обращение реакций гликолиза. Только три реакции гликолиза (гексокиназная, фосфофруктокиназная и пируваткиназная) необратимы, поэтому в процессе глюконеогенеза на трех этапах используются другие ферменты.

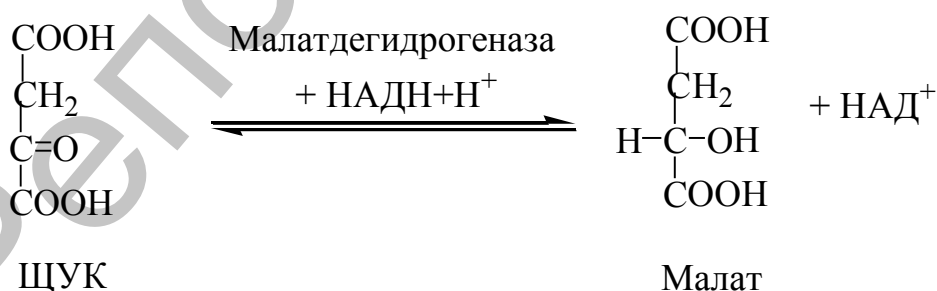
При интенсивной мышечной работе образуется лактат, который током крови поступает в печень. В цитозоле под действием *лактатдегидрогеназы* лактат окисляется в пируват, который поступает в митохондрии.



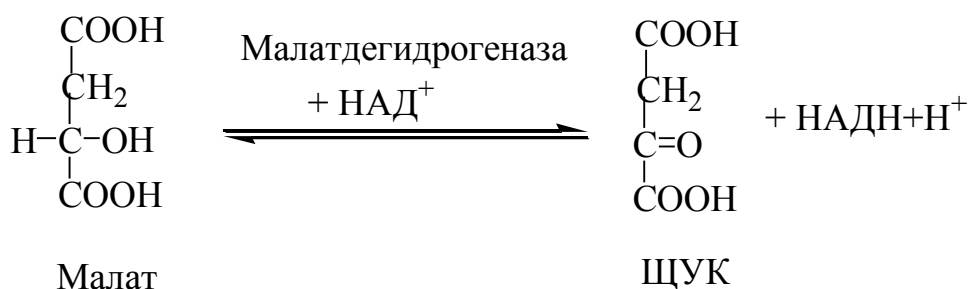
Синтез фосфоенолпирувата из пирувата происходит в несколько этапов. Вначале пируват при участии *пируваткарбоксилазы*, CO_2 и АТФ карбоксилируется с образованием ЩУК.



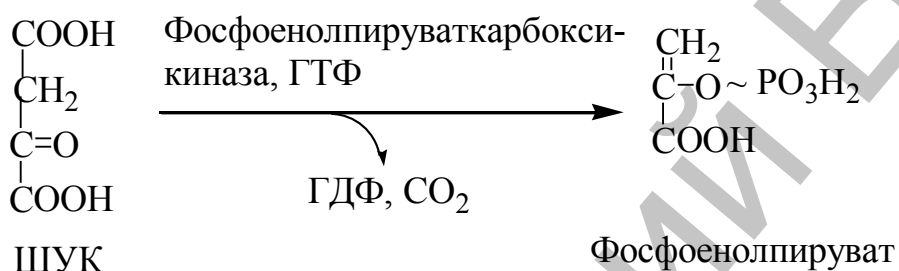
Для транспорта из митохондрий в цитозоль ЩУК восстанавливается в малат с участием фермента *НАД-зависимой малатдегидрогеназы*.



В цитозоле происходит обратный процесс окисления малата в ЩУК под действием *цитозольной малатдегидрогеназы* с коферментом НАД^+ .



Затем ЩУК в результате декарбоксилирования и фосфорилирования под влиянием фермента *фосфоенолпируваткарбоксикиназы* превращается в *фосфоенолпируват*. Донором фосфатного остатка служит ГТФ.



Фосфоенолпируват в результате ряда обратимых реакций гликолиза превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат. Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат катализируется специфической фосфатазой – *фруктозо-1,6-бисфосфатазой*.

В последующей обратимой стадии биосинтеза глюкозы фруктозо-6-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, который дефосфорилируется под влиянием фермента *глюкозо-6-фосфатазы*.

В организме существует *взаимосвязь гликолиза и глюконеогенеза*. Основным субстратом для глюконеогенеза является лактат, образованный активной скелетной мышцей. Плазматическая мембрана обладает высокой проницаемостью для лактата. Поступив в кровь, лактат переносится в печень, где в цитозоле окисляется в пируват. Пируват затем превращается в глюкозу по пути глюконеогенеза. Глюкоза поступает далее в кровь и поглощается скелетными мышцами. Эти превращения составляют *цикл Кори*.

Регуляция глюконеогенеза

Аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы является ацетил-КоА. Когда в клетке накапливается митохондриальный ацетил-КоА, биосинтез глюкозы из пирувата усиливается.

Фруктозо-1,6-бисфосфатаза ингибируется АМФ. В то же время АМФ является аллостерическим активатором фосфофруктокиназы. При низкой концентрации АМФ и высоком уровне АТФ происходит стимуляция глюконеогенеза. Напротив, когда величина АТФ/АМФ низка, в клетке наблюдается расщепление глюкозы.

При избытке глюкозы увеличивается концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата, который активирует фосфофруктокиназу и ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу, что способствует усилению гликолиза и уменьшению скорости глюконеогенеза.

Регуляция при физической работе: 1) АДФ и сами гексозы, которые накапливаются в мышцах в начале работы, аллостерически активируют ферменты распада глюкозы; 2) глюкокортикоиды и глюкагон, выделяющиеся при длительной работе и голодании стимулируют в печени синтез ферментов глюконеогенеза; 3) жирные кислоты, которые мобилизуются из жировой ткани при длительной работе и голодании и продукты их обмена (АТФ, ацетил-КоА, цитрат) аллостерически ингибируют в мышцах и печени ферменты синтеза глюкозы.

После еды выделяется инсулин, который повышает проницаемость клеток для глюкозы, активирует гексокиназу и стимулирует превращение глюкозы в резервные молекулы.

8.7. Синтез и распад гликогена

Гликоген – главная форма запасаания углеводов у животных. Гликоген запасается, главным образом, в печени (до 6% от массы печени, ~ 150 г) и в мышцах, где его содержание редко превышает 1% (~ 300 г).

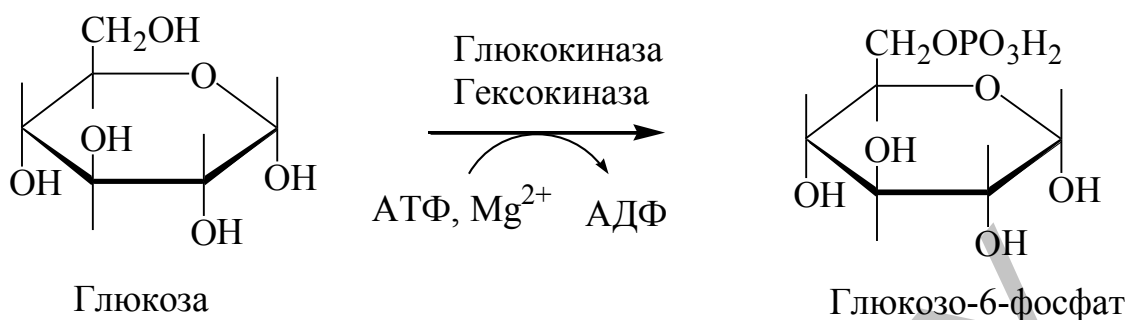
Гликоген печени используется в основном для поддержания физиологических концентраций глюкозы в крови, прежде всего между приемами пищи. Поэтому содержание гликогена в печени варьирует в широких пределах. Через 12-18 часов после приема пищи запас гликогена печени практически полностью истощается, после чего начинается снабжение организма глюкозой с помощью глюконеогенеза. Функция мышечного гликогена состоит в том, что он является легкодоступным источником глюкозы, используемой для гликолиза в самой мышце и не участвует в регуляции уровня глюкозы в крови. Содержание мышечного гликогена заметно истощается только после продолжительной и напряженной физической работы.

Синтез гликогена (гликогенез)

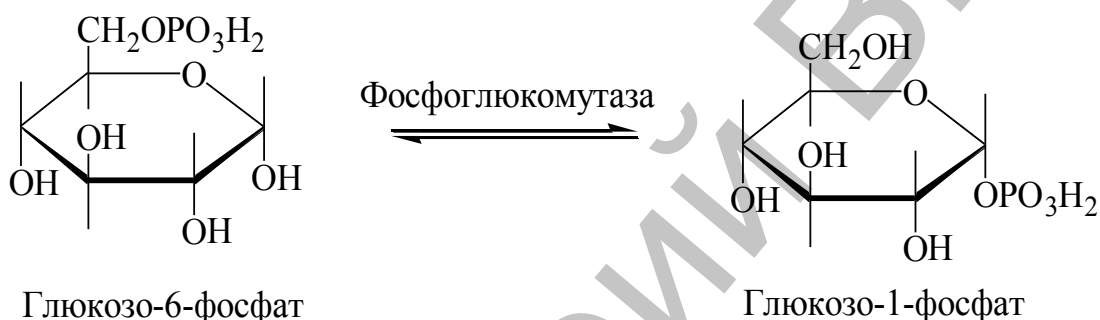
Синтез гликогена начинается через 1-2 ч после приема пищи, содержащей углеводы. Синтез гликогена включает 3 стадии: 1) образование активной формы глюкозы (УДФ-глюкозы); 2) синтез линейной цепочки гликогена, т.е. образование α -1,4-гликозидной связи и 3) образование ветвления, т.е. образование α -1,6-гликозидной связи.

Образование активной формы глюкозы (УДФ-глюкозы)

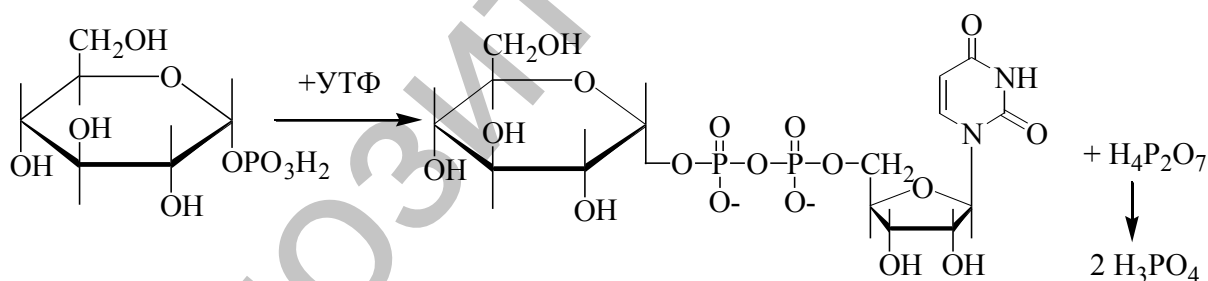
1. Глюкоза фосфорилируется с затратой молекулы АТФ до глюкозо-6-фосфата. Это та же реакция, которая является первой в процессе гликолиза. Фосфорилирование глюкозы катализируется в мышцах ферментом *гексокиназой*, а в печени – *глюкокиназой*.



2. Под действием *фосфоглюкомутазы* глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат.



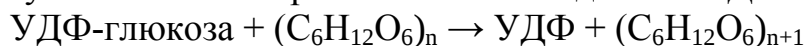
3. Глюкозо-1-фосфат взаимодействует с УТФ с участием фермента *глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы*, в результате образуется УДФ-глюкоза и пирогосфат. Пирогосфат расщепляется пирогосфатазой до 2-х молекул неорганического фосфата, что делает реакцию необратимой.



Образовавшаяся УДФ-глюкоза является переносчиком и донором активированных остатков глюкозы в последующей реакции синтеза гликогена. Эта функция нуклеозиддифосфатсахаров была установлена аргентинским биохимиком Л.Лелуаром, удостоенным Нобелевской премии за эти работы.

Образование α -1,4-гликозидной связи

Для образования α -1,4-гликозидной связи необходимо наличие затравки гликогена – небольшой молекулы гликогена, состоящего из не менее 4-х остатков глюкозы. Под действием фермента *гликогенсинтазы* образуется гликозидная связь между C_1 атомом активированной глюкозы, находящейся в составе УДФ-глюкозы и C_4 атомом конечного остатка глюкозы в молекуле гликоген-затравки с высвобождением УДФ.



Гликоген

УДФ-глюкоза

УДФ

Гликогенсинтаза

Гликоген

6 мол. УДФ-глюкозы

6 мол. УДФ

Гликогенсинтаза

Гликоген

Гликогенветвящий фермент

Гликоген

УДФ-глюкоза

Гликогенсинтаза

— остатки глюкозы, соединенные соответственно связями α -1,4 и α -1,6

Образование α -1,6-гликозидной связи

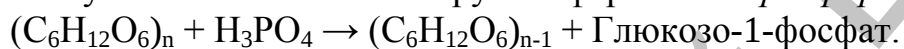
122

(амило[1,4]→[1,6]-трансглюкозидаза) переносит фрагмент (1→4) цепи из 6-7 остатков глюкозы на ту же или соседнюю цепь, присоединяя переносимый фрагмент (1→6) связью (рис. 8.1). Таким образом, образуется точка ветвления в молекуле.

Гликогенолиз – это процесс расщепления гликогена, приводящий к вовлечению глюкозных остатков этого запасного полисахарида в гликолиз.

Существует 2 пути распада внутриклеточного гликогена: гидролитический или амилолитический (более древний) и фосфоролитический. При гидролитическом пути распад гликогена осуществляется под действием фермента γ -амилазы в печени в присутствии воды и образуется свободная глюкоза.

Фосфоролитический путь является основным путем распада гликогена у животных и катализируется ферментом *фосфорилазой*.



Фосфоролитическое расщепление гликогена энергетически выгодно, т.к. высвобождается фосфорилированная глюкоза. Кроме того, фосфорилированная глюкоза в мышечной ткани не может высвобождаться в кровь вследствие отсутствия фермента глюкозо-6-фосфатазы.

Фосфоролитическое расщепление гликогена включает несколько стадий.

1. Фермент *фосфорилаза* специфично катализирует расщепление α -1,4-гликозидных связей гликогена. Остатки глюкозы отщепляются от концов молекулы гликогена до тех пор, пока на ветвях, идущих от точки ветвления не останется примерно по 4 остатка глюкозы.

2. Фермент α -1,4→1,4-глюкантрансфераза переносит трисахаридный фрагмент с одной цепи на другую, открывая α -1,6-гликозидную связь.

3. Гидролитическое расщепление α -1,6-гликозидной связи осуществляет фермент *амило-1,6-гликозидаза* (деветвящий, дебраншинг), что приводит к отщеплению одной молекулы свободной глюкозы и открывает для действия гликогенфосфорилазы новый участок, состоящий из остатков глюкозы, соединенных α -1,4-связями (рис. 8.2).

4. Из глюкозо-1-фосфата образуется глюкозо-6-фосфат. В печени имеется специфический фермент *глюкозо-6-фосфатаза*, который отщепляет фосфат от глюкозо-6-фосфата. Образовавшаяся глюкоза диффундирует из клеток в кровь и поглощается преимущественно мозгом и мышцами. Это заключительная стадия гликогенолиза в печени, приводящая к повышению содержания глюкозы в крови.

Главные ферменты, контролирующие метаболизм гликогена, - *гликогенфосфорилаза* и *гликогенсинтаза* – регулируются аллостерически и ковалентной модификацией путем фосфорилирования и дефосфорилирования фермента (рис. 8.3).

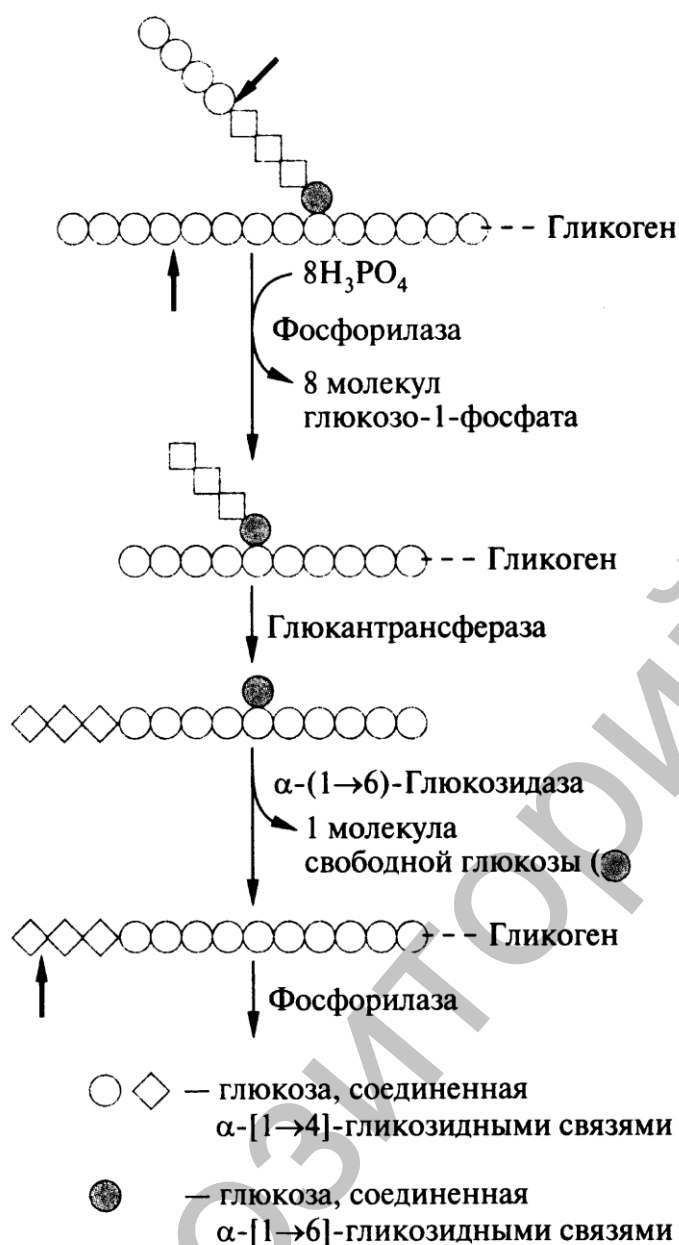


Рис. 8.2. Действие дебраншинг фермента

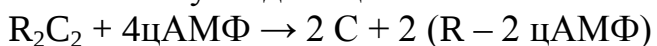
1. В печени фосфорилаза находится в *активной* и *неактивной* форме. *Активная* фосфорилаза (*фосфорилаза а*) – *фосфорилированный* тетрамер. Под действием специфической фосфатазы фосфорилаза *а* переходит в *неактивную* фосфорилазу *б* (димер) в результате гидролитического отщепления фосфата от остатка серина. Переход неактивной фосфорилазы *б* в фосфорилазу *а* происходит путем *фосфорилирования* под действием киназы фосфорилазы.

2. Киназа фосфорилазы существует в 2-х формах – *активной* – *фосфорилированной* и *неактивной* – *дефосфорилированной*. Переход активной формы в неактивную осуществляется при отщеплении

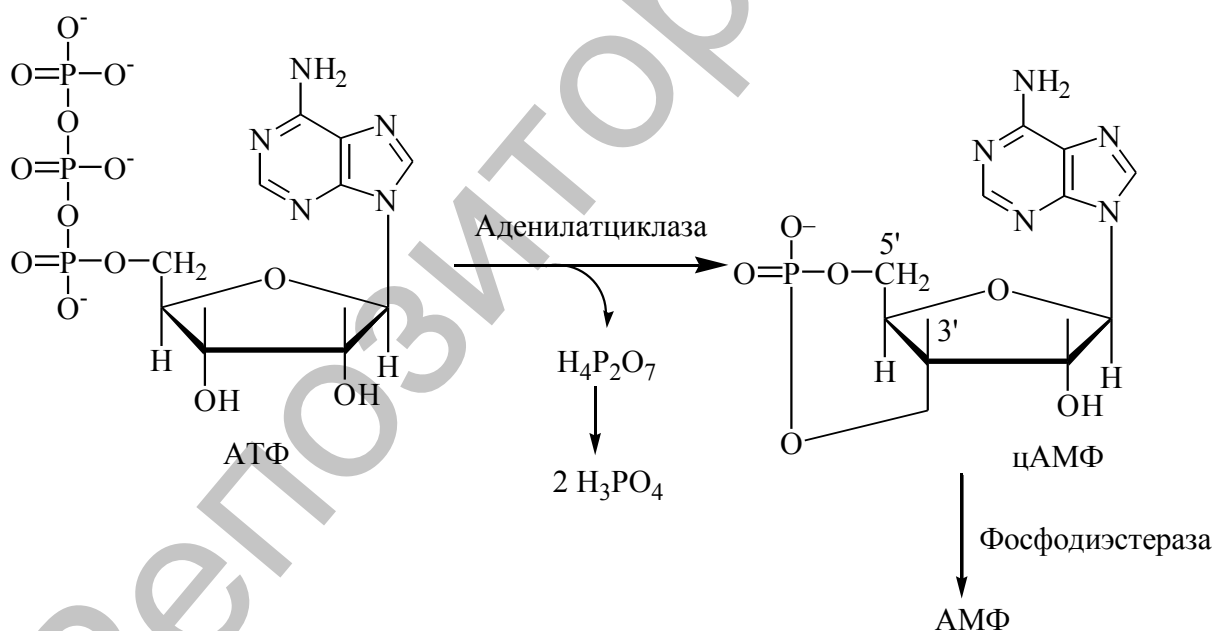
фосфорной кислоты. Активация киназы фосфоорилазы происходит при участии фермента *протеинкиназы*.

3. *Гликогенсинтаза* может находиться в *фосфорилированном* и *нефосфорилированном* состоянии. *Активна дефосфорилированная* форма фермента – *гликогенсинтаза I*, которая переходит в неактивную *гликогенсинтазу D* (зависима от глюкозо-6-фосфата) путем фосфорилирования под действием *протеинкиназы*. Активация фермента происходит под действием фосфатазы путем отщепления остатков фосфорной кислоты.

4. Протеинкиназа состоит из 4-х *субъединиц* (тетрамер) – 2-х *регуляторных (R)* и 2-х *каталитических (C)*. В комплексе фермент неактивен и активируется под действием циклического АМФ (цАМФ). 2 молекулы цАМФ присоединяются к каждой регуляторной субъединице протеинкиназы, что вызывает его диссоциацию с высвобождением каталитических субъединиц.



Активная протеинкиназа переносит остаток фосфорной кислоты от АТФ на специфические белки (ферменты), что приводит к изменению их активности.



5. Образование цАМФ происходит из АТФ под действием фермента *аденилатциклазы*, который находится на внутренней поверхности мембраны и связан с рецептором для гормонов на внешней стороне мембраны.

6. Фермент *фосфодиэстераза* разрушает цАМФ путем разрыва кольца с образованием АМФ.

При *голодании* или в *стрессовых ситуациях* увеличивается потребность в глюкозе.

1. В мышце под действием *адреналина* и в печени – *глюкагона* и *адреналина* происходит активация аденилатциклазы, которая приводит к образованию цАМФ. цАМФ, связываясь с R-субъединицей протеинкиназы, активирует ее. Протеинкиназа фосфорилирует киназу фосфорилазы и переводит ее в активную форму. Киназа фосфорилазы фосфорилирует фосфорилазу *b* и переводит ее в фосфорилазу *a*, что активирует *распад гликогена*. *Инсулин* ингибирует аденилатциклазу и активирует фосфодиэстеразу, что уменьшает концентрацию цАМФ. Протеинкиназа, киназа фосфорилазы и фосфорилаза остаются в неактивной форме, что тормозит *распад гликогена*. Таким образом, происходит каскад ферментативных реакций, что создает высокую степень амплификации. При распаде гликогена – 3 ферментативных стадии контроля, при синтезе – 2.

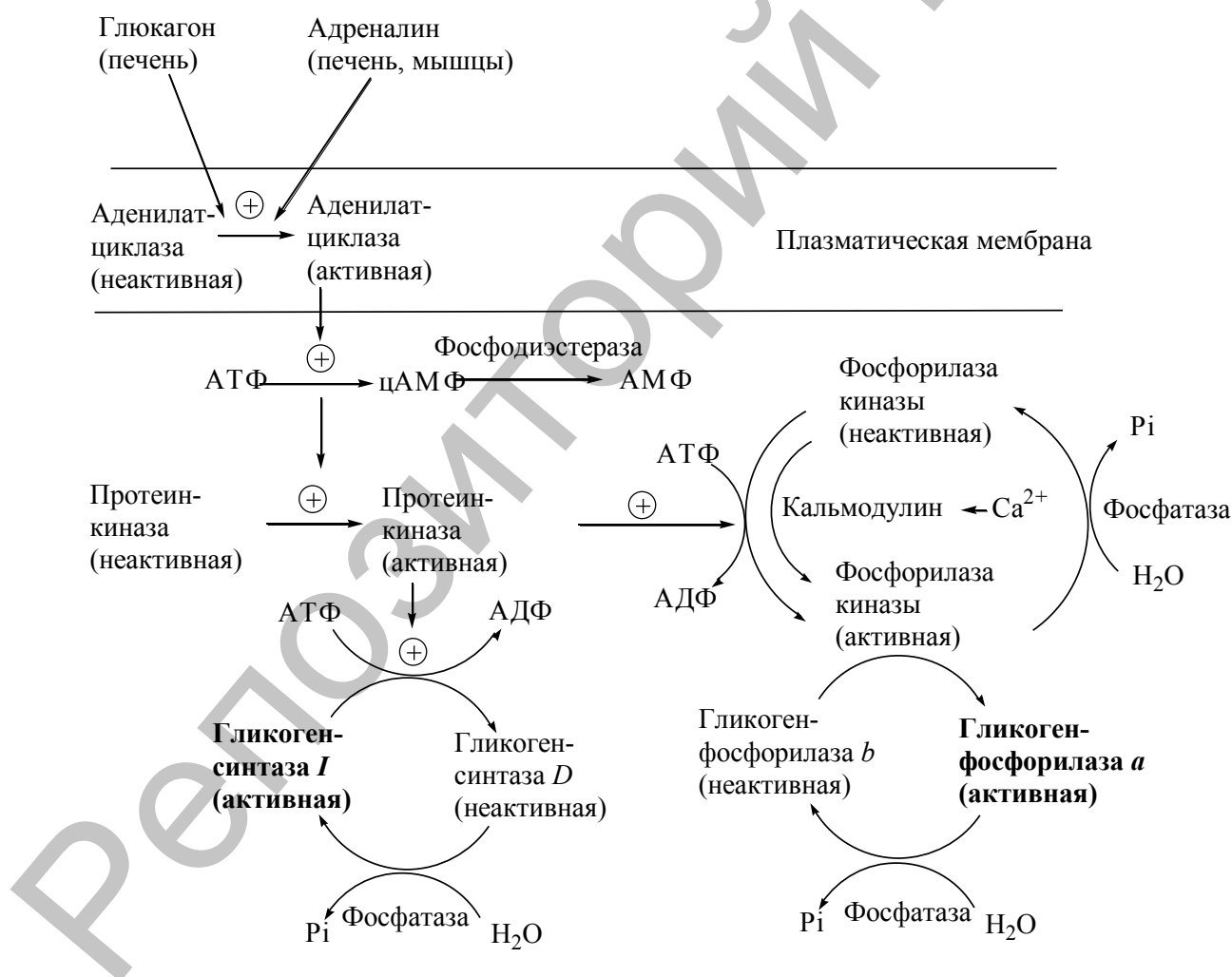


Рис. 8.3. Регуляция синтеза и распада гликогена

2. В состав мышечной фосфорилазы входит пиридоксальфосфат (витамин B₆), необходимый для ее действия. В мышцах фосфорилаза *b* может активироваться аллостерически под действием АМФ, оставаясь при

этом дефосфорилированной. АТФ действует как отрицательный аллостерический эффе́ктор.

3. В мышцах сразу после мышечного сокращения гликогенолиз возрастает в несколько сотен раз. Процесс включает быструю активацию фосфорилазы через ионы кальция. Ионы Ca^{2+} активируют киназу фосфорилазы, связываясь с субъединицей киназы фосфорилазы, идентичной Ca^{2+} -связывающему белку – кальмодулину.

4. Гликогенсинтаза D может активироваться аллостерически под действием глюкозо-6-фосфата. Инсулин стимулирует синтез гликогена в мышце, способствуя дефосфорилированию и активации гликогенсинтазы.

8.8. Метаболизм гексоз

Среди гексоз, абсорбируемых в ЖКТ человека, преобладают глюкоза, фруктоза и галактоза. В тканях, в первую очередь в печени, функционируют специальные пути превращения фруктозы и галактозы в глюкозу.

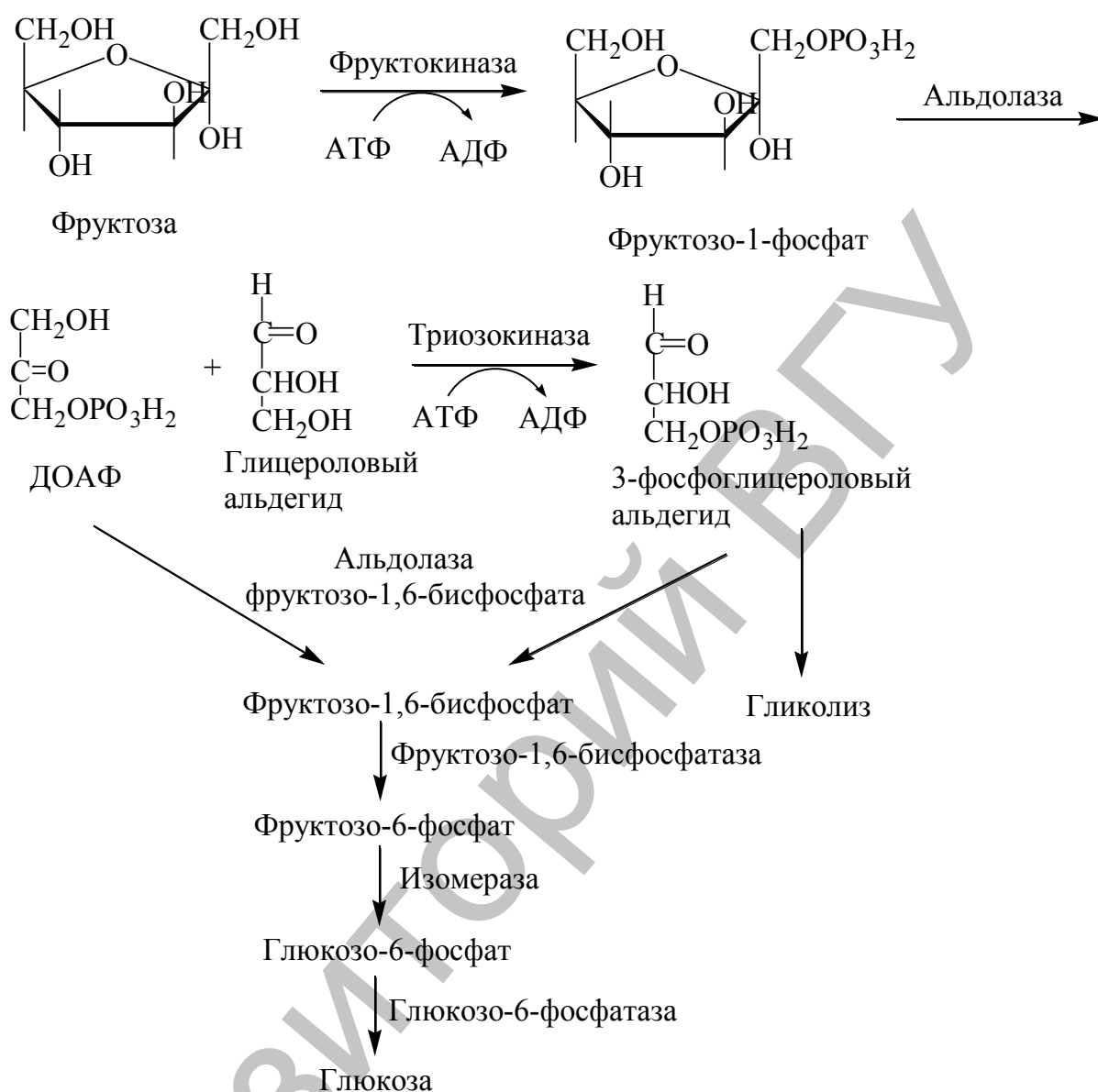
В сутки в организм человека поступает около *100 г фруктозы*. ~ 80% поступившей фруктозы метаболизируется в печени и превращается в глюкозу. В печени, почках и кишечнике фермент фруктокиназа фосфорилирует фруктозу с использованием АТФ до фруктозо-1-фосфата. Этот фермент не катализирует фосфорилирование глюкозы и на его активность (в отличие от глюкокиназы) не влияют голодание и инсулин. Поэтому фруктоза может использоваться у больных сахарным диабетом и при поражении печени. Распад фруктозы в печени по пути гликолиза происходит быстрее, чем глюкозы, так как фруктоза минует стадию, характерную для метаболизма глюкозы, катализируемую фосфофруктокиназой.

Фруктоза может быть фосфорилирована с образованием фруктозо-6-фосфата в реакции, катализируемой гексокиназой – ферментом, который катализирует реакции фосфорилирования глюкозы и маннозы. Однако сродство данного фермента к фруктозе гораздо ниже, чем к глюкозе, поэтому этот путь не является основным при усвоении фруктозы и протекает медленно.

Наследственные нарушения обмена фруктозы:

1. Дефект *фруктокиназы*. В крови накапливается фруктоза (фруктоземия), которая поступает в мочу (фруктозурия). Это состояние называется *эссенциальная фруктозурия*. Протекает бессимптомно.

2. Дефект *альдозазы фруктозо-1-фосфата*. Непереносимость фруктозы. Накопление фруктозо-1-фосфата ингибирует ферменты фосфорилазу гликогена, фосфоглюкомутазу и альдозазу фруктозо-1,6-бисфосфата, что приводит к резко выраженной гипогликемии и поражению глюкозо-зависимых органов и тканей (печень, мозг, почки и др.). Может приводить к летальному исходу.

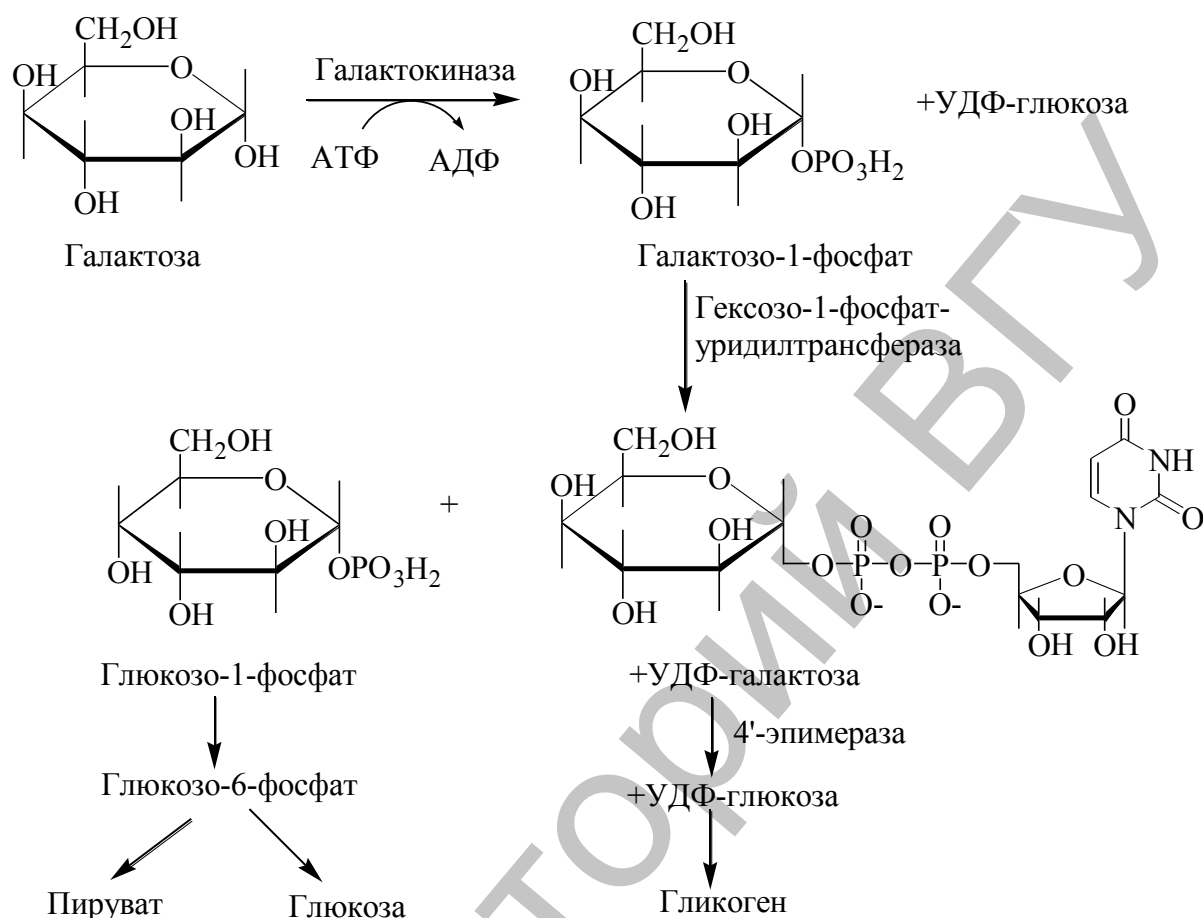


Галактоза образуется при гидролизе в кишечнике дисахарида лактозы (молочного сахара). В печени галактоза легко превращается в глюкозу.

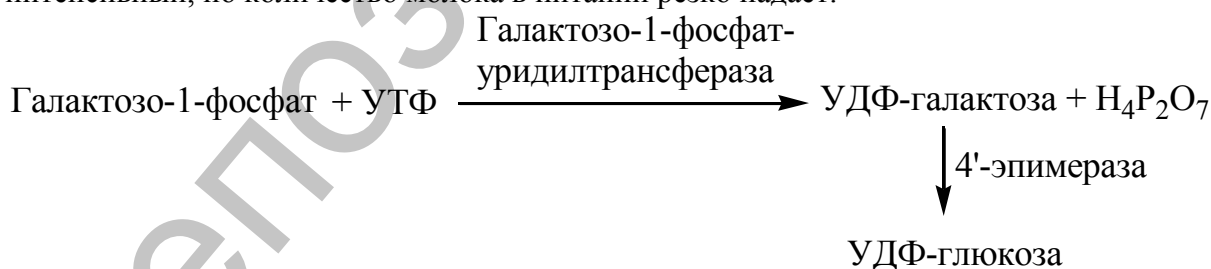
Галактоза фосфорилируется ферментом *галактокиназа* с использованием АТФ и образуется галактозо-1-фосфат. Галактозо-1-фосфат реагирует с УДФ-глюкозой с образованием УДФ-галактозы и глюкозо-1-фосфата. Фермент: *гексозо-1-фосфат-уридилтрансфераза*. На этой стадии галактоза занимает место в УДФ-глюкозе. УДФ-галактоза под действием *4'-эпимеразы* превращается в УДФ-глюкозу.

Нарушение метаболизма галактозы наблюдается при наследственном дефекте уридилтрансферазы. Прием молока вызывает тошноту и рвоту. Происходит накопление галактозы в тканях. В ткани глаза галактоза восстанавливается, что приводит к развитию катаракты. В печени галактозо-1-фосфат вызывает снижение содержания неорганического фосфата. Развиваются нарушения функции печени и психики.

Характерна триада симптомов: умственная отсталость, катаракта (помутнение хрусталика), гепатоспленомегалия (увеличение печени и селезенки).



Детям с дефектом этого фермента назначают диету, из которой исключают галактозу до 2-4 лет. В этом возрасте появляется второй путь, который менее интенсивный, но количество молока в питании резко падает.



Глава 9. ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез - это совокупность процессов, в ходе которых солнечная энергия запасается в виде химических связей органических соединений, синтезируемых из неорганических веществ. Фотосинтез состоит из двух фаз: *световой* (фотофизический и фотохимический этапы) и *темновой*.

Световая фаза: свет + $12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{НАДФН} + 18 \text{АТФ} + 6 \text{O}_2$.

Темновая фаза: $12 \text{НАДФН} + 18 \text{АТФ} + 6 \text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O}$.

Фотосинтез происходит в клетках эукариот (высшие зеленые растения и низшие их формы - зеленые, бурые и красные водоросли) и одноклеточных (эвгленовые, динофлагелляты и диатомовые водоросли), а также в клетках прокариот (сине-зеленые водоросли, зеленые и пурпурные бактерии). Примерно половина фотосинтеза на Земле осуществляется высшими зелеными растениями, а остальная половина – главным образом одноклеточными водорослями.

Фотосинтезирующие бактерии кислород не образуют. В качестве доноров водорода некоторые бактерии используют неорганические соединения. Например, зеленым серным бактериям донором водорода служит сероводород и вместо молекулярного кислорода выделяется сера. Другие фотосинтезирующие бактерии используют в качестве доноров водорода органические соединения, например, лактат. Такой фотосинтез получил название *бескислородного*, в отличие от *кислородного* фотосинтеза, который осуществляют растения и аэробные бактерии.

9.1. Фотосинтезирующие структуры

У бактерий фотосинтезирующие структуры представлены *мезосомами* - впячивания клеточной мембраны с образованием пластинчатых органоидов. *Хроматофоры* - это изолированные из разрушенных бактерий мезосомы. У эукариот имеются специализированные органеллы для осуществления фотосинтеза - *хлоропласты*. Подобно митохондриям, хлоропласты способны делиться в собственном ритме (содержат необходимые для деления ДНК, РНК и аппарат синтеза белка). Хлоропласты крупнее митохондрий: их длина 3-10 мкм, диаметр 0,2-2,0 мкм. В клетках высших растений содержится несколько десятков хлоропластов. Помимо хлоропластов, в них имеются и *митохондрии*, которые обеспечивают клетки энергией в темноте за счет дыхания. По структуре хлоропласты напоминают строение митохондрий: они окружены двумя мембранами - наружной и внутренней. Внутренняя мембрана уложена в виде стопок уплощенных пузырьковидных дисков - *ламеллы*. Уплощенные пузырьки ламелл называют *тилакоидами* (замкнутая полость с поперечником 15 нм); внутри тилакоида - внутритилакоидное пространство (*thylakoid lumen*). Тилакоиды уложены поперек хлоропласта стопками, называемыми *гранами*. В клетке высших растений содержится до 50 гран, которые соединены между собой мембранными перемычками. Водная среда между гранами является *стромой* хлоропласта. В гране от 10 до 20 тилакоидов. Элементарной структурной и функциональной фотосинтетической единицей мембран тилакоидов, содержащей аппарат улавливания и трансформации солнечной энергии, является *квантосома* (величина около 17,5 нм, м.м. порядка 2 млн Да). В ламеллярной системе протекают световые процессы фотосинтеза, в строме - темновые ферментативные реакции, связанные с фиксацией CO₂ (Рис. 1). Транспорт веществ через внутреннюю мембрану

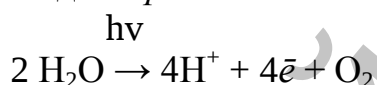
хлоропласта осуществляется с помощью *транслоказ*, например, перенос АТФ в обмен на АДФ.

9.2. Фазы фотосинтеза

Световая фаза фотосинтеза протекает в квантосомах мембран тилакоидов, а темновая – в строме хлоропласта. Световая фаза протекает на свету. На этой стадии энергия света трансформируется в химическую энергию АТФ, а бедные энергией электроны воды переходят в богатые энергией электроны НАДФН. Побочным веществом, образующимся в ходе световой стадии, является кислород.

Световая фаза включает три процесса:

1. Начальной реакцией является фотохимический процесс окислительного расщепления воды – *фотоокисления*:



2. Энергия высокоэнергетических электронов воды используется специализированной мембранной системой для фосфорилирования АДФ и образования АТФ в системе *фотосинтетического фосфорилирования*.

3. Часть энергии электронов восстанавливает НАДФ⁺ в реакции фотовосстановления:



Продукты световой фазы (АТФ и НАДФН) используются в темновой стадии, где происходит восстановительный синтез глюкозы из СО₂. Без световой стадии темновая стадия невозможна.

9.3. Пигменты фотосинтеза

К пигментам фотосинтеза относятся: зеленые - *хлорофиллы a, b, c, d*; желтые, красные, пурпурные – *каротиноиды* и красные и синие – *фикобилины*.

1. Все фотосинтезирующие организмы содержат хлорофиллы – зеленые магний-порфириновые пигменты. Известно свыше 10 видов хлорофиллов, различающихся природой химических групп, присоединенных к пиррольным структурам порфиринового ядра, окраской, распространением среди живых организмов. В молекуле хлорофилла *a*, присутствующего в хлоропластах всех клеток зеленых растений, содержится четыре замещенных пиррольных кольца. Пятое, непиррольное кольцо, представлено остатком малоновой кислоты, этерифицированной метиловым спиртом. Длинная изопреноидная боковая цепь в молекуле хлорофилла *a* представляет собой остаток спирта фитола, присоединенного сложноэфирной связью к карбоксильной группе пропионовой кислоты в кольце IV. Четыре центральных атома азота в молекуле хлорофилла *a* координационно связаны с ионом Mg²⁺ (рис. 12.1).

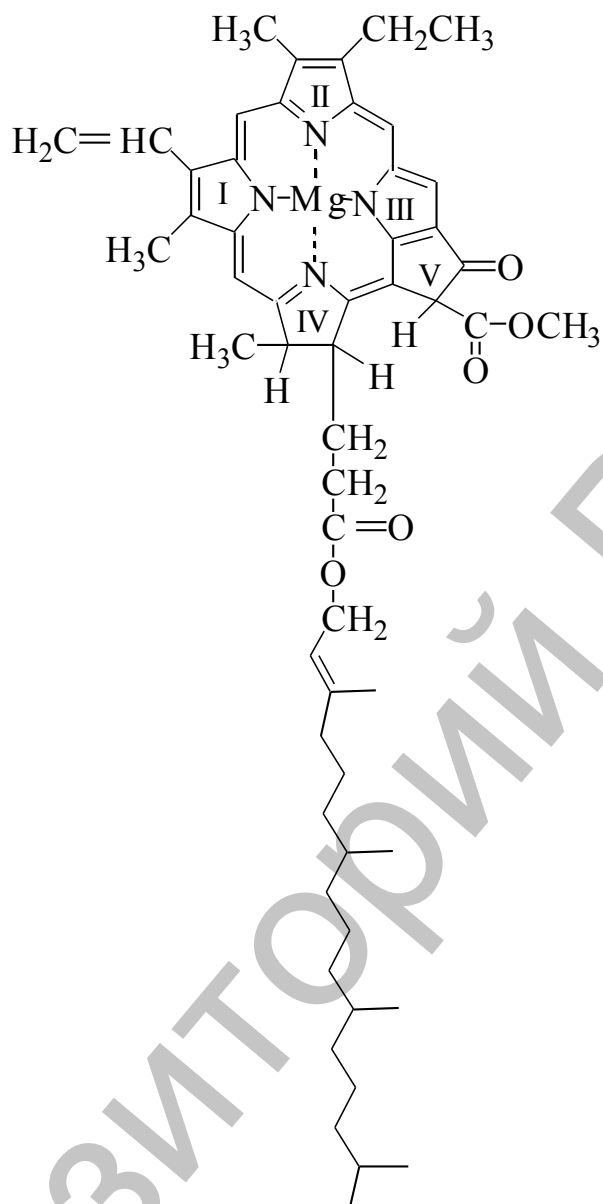


Рисунок 9.1. Структура хлорофилла а

В фотосинтезирующих клетках высших растений всегда присутствуют хлорофиллы двух типов. Один из них – хлорофилл *a*, а второй представлен у многих видов хлорофиллом *b*, отличающимся от хлорофилла *a* тем, что вместо метильной группы в кольце II в нем содержится альдегидная группа. Атом Mg^{2+} способствует образованию агрегатов молекул хлорофилла, что облегчает улавливание света. Длинная гидрофобная боковая цепь служит не только для закрепления молекул хлорофилла в липидном бислое, но и для придания им определенной ориентации.

У всех зеленых растений содержатся хлорофиллы *a* и *b*, в диатомовых водорослях – хлорофилл *c*, в красных водорослях – хлорофилл *d*. Все хлорофиллы являются фоторецепторами, так как интенсивно

поглощают видимый свет (в спектрах поглощения имеются четыре полосы – три в красно-желтой и одна в синей областях).

2. Среди вспомогательных пигментов наиболее распространен β -каротин – изопреноидное соединение, которое служит у животных предшественником витамина А, и желтый каротиноид ксантофилл. Каротиноиды поглощают свет в ином диапазоне длин волн, передают поглощенную энергию на молекулы хлорофилла и поэтому функционируют как световые рецепторы, дополняющие хлорофиллы. Каротиноиды предохраняют молекулы хлорофилла от разрушения в процессе фотоокисления.

3. Фикобилины (*фикоэритрины, фикоцианины*), построенные из линейно связанных четырех пиррольных структур, поглощают энергию в зеленой и желтой областях спектра и передают ее на хлорофилл.

9.4. Характеристика фотосистем

Светопоглощающие пигменты тилакоидных мембран собраны в функциональные наборы, которые называются *фотосистемами*. Различают фотосистемы I и II. Все пигментные молекулы фотосистем поглощают фотоны, но только одна молекула в каждом ансамбле обладает способностью превращать световую энергию в химическую. Эта специализированная трансформирующая энергию пигментная молекула представляет собой молекулу хлорофилла *a*, соединенную с особым белком и называется *фотохимическим реакционным центром*. Все прочие пигментные молекулы в фотосистеме называются *светособирающими* или *антенными* молекулами. Их функция заключается в поглощении световой энергии. Эту энергию они затем передают реакционным центрам, с которых и происходит фотохимический акт. Функции реакционных центров выполняют пигмент P_{700} , поглощающий свет с длиной волны 700 нм и пигмент P_{680} , поглощающий свет с длиной волны 680 нм. На долю этих фотохимически активных форм хлорофилла приходится 1/400 часть общего количества хлорофилла в клетке. Энергетический уровень возбужденного состояния P_{700} и P_{680} ниже, чем у других хлорофиллов-фоторецепторов, поэтому они способны забирать поглощенную энергию фотонов от фоторецепторов в виде экситонов. При поглощении этой энергии пигменты-реакционные центры теряют электроны.

Функциональная единица фотосистемы I содержит около 200 молекул хлорофилла *a* и 50 молекул каротиноидов и одну молекулу пигмента P_{700} . Фотосистема II включает 200 молекул хлорофилла *a*, 200 молекул хлорофилла *b*, фикобиллины или ксантофиллы и одну молекулу пигмента P_{680} .

9.5. Механизм световой стадии фотосинтеза

При поглощении кванта света фотосборщиками фотосистемы I, происходит их возбуждение и энергия возбуждения в виде экситонов передается на реакционный центр фотосистемы – пигмент P_{700} . Окислительно-восстановительный потенциал пигмента P_{700} в невозбужденном состоянии равен +0,4 В. При поглощении экситонов, P_{700} переходит в возбужденное состояние, что сопровождается изменением окислительно-восстановительного потенциала до -0,60 В (т.е. изменение потенциала на 1,0 В). В результате один из электронов этой фотосистемы приобретает большое количество энергии, покидает реакционный центр и переходит через *ферредоксин связанный*, *ферредоксин свободный*, *НАДФ-редуктазу* на молекулу *НАДФ* с величиной ОВП – 0,32 В. Два электрона транспортируются двумя молекулами ферредоксина.

Но так как пигмент P_{700} отдал электрон, у него образовалась «электронная дырка», подлежащая восстановлению. В заполнении «электронной дырки» принимает участие фотосистема II.

При попадании света экситоны поглощаются пигментом P_{680} , который переходит в возбужденное состояние. Это сопровождается изменением ОВП от + 1,0 В (в темноте, основное состояние) до – 0,06 В (в возбужденном состоянии). В итоге электрон перемещается от пигмента P_{680} к пигменту P_{700} (ОВП = + 0,46 В) с целью заполнения «электронной дырки» через цепь переносчиков: *прочно связанный пластохинон* → *подвижный пластохинон* → *цитохром b_{559}* → *цитохром b_{552}* → *пластоцианин (Cu)* → *окисленная форма P_{700}* . В результате у пигмента P_{680} возникает «электронная дырка», которая заполняется за счет электронов воды (ОВП воды + 0,82 В, а ОВП окисленного пигмента P_{680} + 1,0 В). При *фотолизе воды* выделяется кислород и протоны. Эти протоны присоединяются к НАДФ, принявшему 2 электрона от возбужденного пигмента P_{700} .

Перенос электронов идет против градиента ОВП за счет энергии света. Такой перенос электронов, сопряженный с восстановлением НАДФ, носит название *нециклического переноса*. Возможен циклический перенос электронов: *пигмент P_{700}* → *цитохром b_{563}* → *цитохром c_{552}* → *пластоцианин* → P_{700} .

При циклическом и нециклическом путях переноса электронов происходит высвобождение энергии, которая аккумулируется в АТФ. Этот процесс называется *фотосинтетическим фосфорилированием*; при циклическом переносе происходит циклическое фосфорилирование, при нециклическом – нециклическое.

Механизм фотосинтетического фосфорилирования

1. При переносе электронов на пигмент P_{700} в мембране тилакоида из стромы хлоропласта внутрь тилакоида переносятся протоны.

2. Внутри тилакоида происходит фотолиз воды и накапливаются протоны.

3. В результате на мембране тилакоида создается электрохимический потенциал, величиной 0,25 В.

4. Протоны выходят из тилакоида в строму хлоропласта через протонный канал (CF_0) АТФ-синтазы. При возвращении протонов через протонный канал и сопрягающую часть АТФ-синтазы (CF_1) синтезируется АТФ. В строме хлоропласта вышедшие протоны и электроны от пигмента P_{700} восстанавливают НАДФ.

CF_1 (состоит из пяти субъединиц). Каждая CF_1 содержит три $\alpha\beta$ димера, которые вместе образуют 3 каталитических сайта. Каждый димер может связать АДФ и фосфат с образованием АТФ. Каждый из димеров отличается по аффинности к нуклеотидам; при возвращении протонов из тилакоида в строму хлоропласта через канал CF_0 изменяется конформация одного из сопрягающих сайтов CF_1 субъединицы АТФ-синтазы, что обеспечивает синтез и освобождение молекулы АТФ. Согласно одной из моделей, предполагается, что перенос протонов через CF_0 вызывает вращение CF_1 для оптимизации образования АТФ.

Отличия фотосинтетического фосфорилирования от окислительного фосфорилирования в митохондриях: 1) в тилакоидах направление переноса протонов и электронов через мембрану противоположно направлению его в митохондриальной мембране; 2) внутри тилакоида сконцентрирован положительный заряд из-за накопления протонов, а на внешней стороне мембраны тилакоида концентрируется относительный отрицательный заряд; 3) основная доля электрохимического потенциала создается за счет градиента рН; 4) протоны выталкиваются из внутритилакоидного пространства наружу через протон-зависимую АТФ-синтазу.

Суммарное уравнение световой фазы: $\text{свет} + 12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{НАДФН} + 18 \text{АТФ} + 6 \text{O}_2$;

9.6. Темновая фаза фотосинтеза

Продукты световой стадии АТФ и НАДФН₂, образующиеся в строме хлоропласта, используются для синтеза глюкозы из CO_2 . Ассимиляция диоксида углерода представляет циклический процесс, который называется *циклом Кальвина*, который состоит из трех стадий – карбоксилирование, восстановление и регенерация.

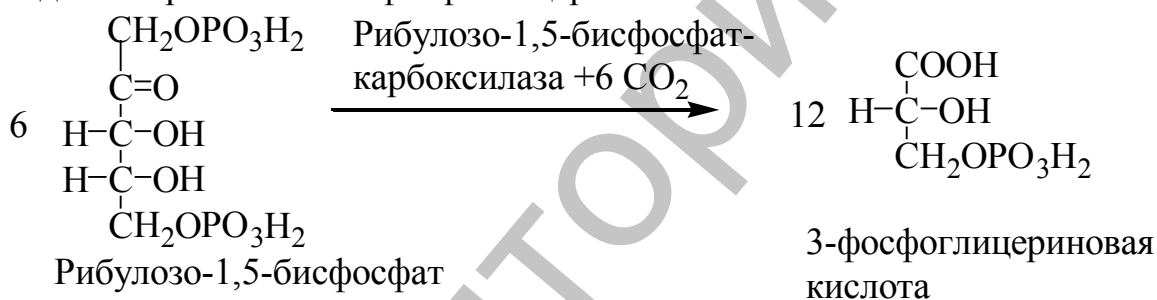
Синтезированные на свету АТФ и НАДФН используются для связывания CO_2 и восстановления его до углеводов. CO_2 присоединяется к рибулозо-1,5-бисфосфату при участии фермента рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Rubisko, КФ 4.1.1.39), который локализован на внешней поверхности мембран тилакоидов.

Фермент составляет 1/6 часть всех белков хлоропласта и 50% от растворимых белков листьев C_3 растений. Он характеризуется молекулярной массой 550 кДа и состоит из 8 идентичных больших и 8 идентичных малых субъединиц; активный центр фермента локализуется в каждой большой субъединице. Это наиболее

распространенный белок на земле. Высокая концентрация фермента определяется его низкой каталитической активностью. Число оборотов фермента ниже в 10^3 - 10^5 раз по сравнению с другими ферментами, например, дегидрогеназами. Концентрация активных центров Rubisco около 4 ммоль/л, а концентрация субстрата реакции CO_2 составляет 10 мкмоль/л, что создает необычную ситуацию, когда концентрация активных центров существенно превышает концентрацию субстрата.

Фермент катализирует реакции карбоксилирования с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата и оксигенации с образованием молекулы 3-фосфоглицерата и молекулы 2-фосфогликолата (токсический для растения продукт). Аффинность фермента существенно отличается для двух субстратов: K_m для CO_2 составляет 9 мкмоль/л, а K_m для O_2 составляет 535 мкмоль/л. Однако концентрация кислорода в атмосфере – 21%, а CO_2 – 0,0316%; в процессе фотосинтеза в листе при 25 °C отношение оксигенирования к карбоксилированию находится в пределах 1:4 – 1:2. Фиксация 1 молекулы CO_2 требует расходования 3 молекул АТФ и 2 молекул НАДФН, в то время как реакция оксигенирования требует 5 молекул АТФ и 3 молекул НАДФН. Считают, что Rubisco может фиксировать одну молекулы кислорода на каждые три молекулы углекислого газа.

По классической схеме присоединение CO_2 к рибулозо-1,5-бисфосфату под действием фермента рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы ведет к образованию 3-фосфоглицерата.

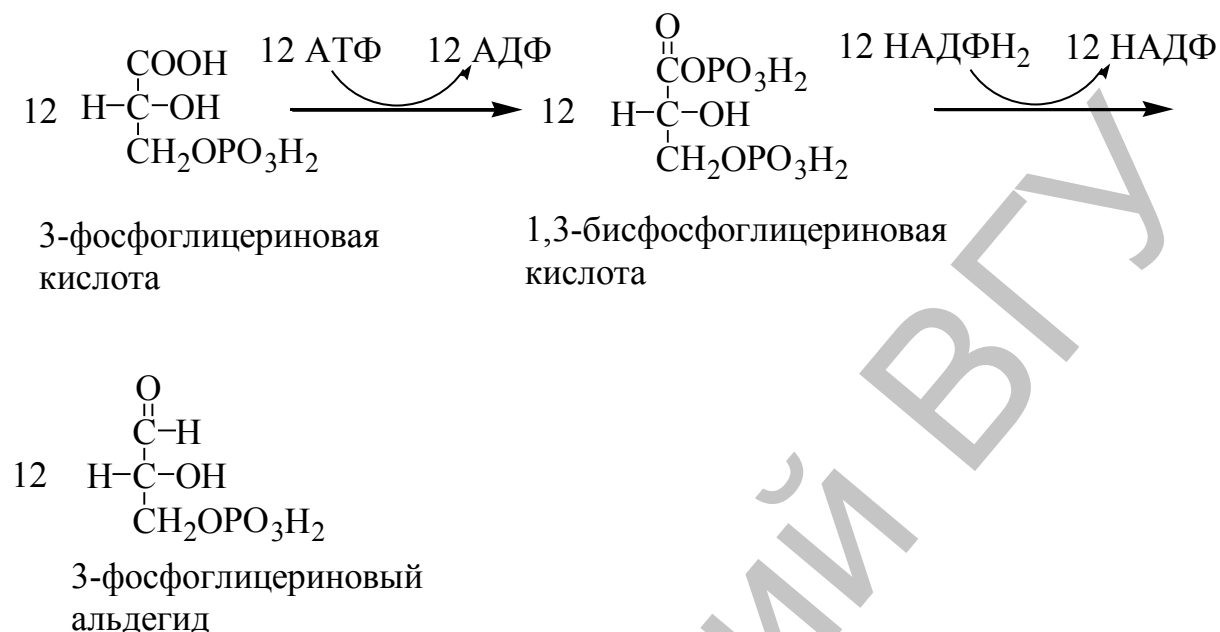


Далее 3-фосфоглицерат восстанавливается с помощью НАДФН и АТФ до 3-фосфоглицеролового альдегида. Восстановление 1,3-бисфосфоглицероловой кислоты в 3-фосфоглицероловый альдегид катализирует фермент НАДФ-зависимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Дальнейшие стадии приводят к образованию молекулы глюкозы и 6 молекул рибулозо-5-фосфата, на фосфорилирование которых затрачивается еще 6 молекул АТФ. Таким образом, регенерируются все 6 молекул рибулозо-1,5-бисфосфата. В итоге на каждую молекулу CO_2 расходуется 2 НАДФН и 3 АТФ. *Первичным продуктом* при ассимиляции CO_2 является *3-фосфоглицериновая кислота*, а другие органические вещества являются продуктами ее преобразований. Пять из каждых шести молекул 3-фосфоглицериновой кислоты используется в стадии регенерации, а одна молекула в листе растения либо экспортируется в цитозоль для синтеза сахарозы, либо в хлоропласте вступает в реакции синтеза крахмала.

Суммарное уравнение реакций темновой фазы:

$6 \text{ Р-1,5-БФ} + 6 \text{ CO}_2 + 18 \text{ АТФ} + 12 \text{ НАДФН} \rightarrow \text{ГЕКСОЗА} + 6 \text{ Р-1,5-БФ} + 18 \text{ АДФ} + 18 \text{ Рн} + 12 \text{ НАДФ}.$



Регуляция темновой фазы фотосинтеза

1. На свету функционирует тиоредоксин-опосредованный механизм регуляции ряда ферментов хлоропласта. Восстановленный ферредоксин активирует фосфатазу фруктозо-1,6-бисфосфата, бисфосфатазу седогептулезы, киназу рибулозофосфата и НАДФ-глицеральдегид-дегидрогеназу; образующийся фруктозо-6-фосфат стимулирует рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу. В темноте: фосфатаза фруктоза-1,6-бисфосфата неактивна, накапливающийся фруктоза-1,6-бисфосфат ингибирует рибулоза-1,5-бисфосфат-карбоксилазу. Благодаря этому механизму АТФ-синтаза на свету не катализирует гидролиз АТФ, происходящий в темноте. В последние годы описан другой белок – *активаза Rubisco*, который активируется светом по тиоредоксин-опосредованному механизму.

2. В регуляции ключевых реакций цикла Кальвина играют роль снижение концентрации протонов во внутритилакоидном пространстве и повышение ионов магния в строме; важную роль играет также концентрация неорганического фосфата, за использование которого конкурируют ферменты цикла Кальвина и АТФ-синтаза.

3. В последние годы появились доказательства того, что некоторые ферменты цикла Кальвина образуют временные мультипротеиновые комплексы, обеспечивающие регуляцию цикла. Кроме того, отдельные ферменты цикла (седогептулоза-1,7-бисфосфатаза, альдолаза) играют определенную роль в регуляции фиксации CO_2 .

4. Известно, что большая субъединица *Rubisco* кодируется геном хлоропласта, а остальные белки цикла Кальвина кодируются генами ядра

клетки. Поэтому импорт синтезированных белков из цитоплазмы клеток в хлоропласты может быть объектом разнообразных регуляторных воздействий. Гены ферментов цикла Кальвина и процессы их экспрессии чувствительны к внешним воздействиям. Например, высокий уровень глюкозы или сахарозы ведет к уменьшению количества иРНК ферментов цикла, включая малую субъединицу Rubisco, седогептулоза-1,7-бисфосфатазу и фруктоза-1,6-бисфосфатазу. Такой тип обратной отрицательной регуляции перспективен для понимания процессов регуляции жизнедеятельности растений.

9.7. Бескислородные фотосинтезирующие организмы

Бескислородные фотосинтезирующие бактерии не способны окислять воду и используют ряд доноров электронов с меньшим положительным восстановительным потенциалом: сульфиды, тиосульфаты или сукцинат (янтарная кислота). Все *бескислородные фотосинтетические бактерии* содержат только простые типы реакционных центров. У *пурпурных бактерий* реакционные центры содержат хиноны как конечные акцепторы электронов. В этих бактериях перенос электронов циклический. Реакционный центр пурпурных бактерий, собирающий энергию фотонов, напоминает фотосистему II высших растений. *Зеленые серные бактерии* в качестве конечного акцептора электронов используют железо-серные центры, аналогичные фотосистеме I высших растений. В мембране этих бактерий имеется комплекс, собирающий энергию фотонов и включающий бактериохлорофилл и каротиноиды (называется хлоросома). *Зеленые скользящие бактерии* содержат хлоросомы, но реакционный центр у них такой же, как у пурпурных бактерий. Открытые в 80-х годах прошлого века *гелиобактерии* в качестве реакционного центра содержат комплекс, похожий на фотосистему I высших растений, но содержат бактериохлорофилл *g* в качестве основного фотосинтетического пигмента.

Рентгеноструктурный анализ показал, что *реакционный центр пурпурных бактерий* содержит два связанных интегральных мембранных белка, названных L и M субъединицы. Некоторые содержат H субъединицу и *c*-тип цитохромного комплекса. L и H субъединицы связывают кофакторы, вовлеченные в транспорт электронов. К ним относятся 4 молекулы бактериохлорофилла *a*, 2 молекулы бактериофеофитина, две молекулы хинона (убихинон или менахинон), атом железа и часто каротиноид.

9.8. Бесхлорофилльный фотосинтез

Бесхлорофилльный фотосинтез обнаружен у солелюбивых бактерий, имеющих фиолетовый светочувствительный пигмент. Этим пигментом оказался белок бактериородопсин, содержащий, подобно зрительному пурпуру сетчатки родопсину, производное витамина A – ретиналь. Бактериородопсин, встроенный в мембрану солелюбивых бактерий, образует на этой мембране в ответ на поглощение ретиналем света протонный потенциал, преобразующийся в АТФ.

9.9. Хемосинтез

Если источником энергии для фиксации CO₂ служат реакции окисления неорганических соединений, то такой путь синтеза углеводов называют хемосинтезом. *Нитрифицирующие* бактерии восстанавливают CO₂ до органических соединений,

используя для этого энергию окисления минеральных соединений азота. Аммиак окисляется до нитритов и далее нитриты окисляются до нитратов. Процесс нитрификации происходит в природе в больших масштабах и является источником нитратов, содержащихся в почвах, в пресных и соленых водоемах. В некоторых регионах с сухим климатом нитраты, образующиеся в результате нитрификации, накапливаются в виде огромных залежей. Таковы, например, залежи селитры в Чили.

Другим источником энергии для хемосинтеза служит окисление соединений железа. Бактерии, осуществляющие этот процесс, называют *железобактериями*. Они окисляют Fe^{2+} в Fe^{3+} . Железобактерии, окисляющие закисные соединения железа, чрезвычайно широко распространены как в пресных, так и в морских водоемах. Благодаря их хемосинтетической активности, на дне водоемов образуются большие отложения железных руд.

Еще одна группа минеральных соединений, служащих сырьем для хемосинтеза, это соединения серы. Обширная группа *серобактерий* окисляет эти соединения по схеме: сульфид $\rightarrow$ сера $\rightarrow$ тиосульфит $\rightarrow$ сульфит $\rightarrow$ сульфат. Деятельность серобактерий играет важную роль в круговороте соединений серы и железа, поскольку эти микроорганизмы широко распространены в разнообразных водоемах, почвах, в разрушающихся горных породах, в месторождениях различных сульфидных минералов. Жизнедеятельностью серобактерий обусловлено так называемое сернокислое выветривание горных пород. Серная кислота, которая служит продуктом окисления сульфидов и молекулярной серы, нередко оказывается причиной разрушения некоторых каменных и металлических сооружений. В аэробных условиях серобактерии могут быть основной причиной быстрого разрушения серных руд.

Довольно широко распространены в почвах бактерии, окисляющие водород, за что они получили название *водородоокисляющих* бактерий. Подобно другим хемоавтотрофам, водородные бактерии используют часть энергии окисления для автотрофной ассимиляции CO_2 , восстанавливая его, например, до метана (CH_4).

Синтез углеводов хемотрофными бактериями осуществляется в цикле Кальвина.

Глава 10. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Липиды - это группа соединений, не растворимых в воде, но растворимых в органических растворителях (спирт, эфир и др.).

10.1. Общая характеристика липидов

Липиды делят на 2 группы: *неомыляемые* (не содержат жирных кислот) и *омыляемые*. К *неомыляемым* липидам относят *стероиды*, *каротиноиды* и *терпеноиды* (построены из изопреновых остатков).

Холестерол является основным стеролом животных и человека. *Эргостеролы* содержатся в грибах. *Ситостерол* и *стигмастерол* типичны для растений, *фукостерол* обнаружен у бурых водорослей. Наличие определенного стерола специфично для определенного класса или семейства животных и растений: губки содержат ряд уникальных стеролов с 28 и 29 атомами углерода в молекуле, а морские звезды и голотурии содержат *стелластеролы*. Существует мнение, что чем примитивнее организм, тем более разнообразный набор стеролов для него характерен. В настоящее время описано более 60 животных *зоостеролов* и более 140 растительных *фитостеролов*.

Омыляемые липиды делят на *простые* и *сложные*. К простым липидам относят жиры - *триацилглицеролы* (резерв энергии) и *воски* - эфиры одноатомного спирта с жирной кислотой (кожное сало).

Триацилглицеролы могут быть простыми или смешанными. К простым триацилглицеролам относятся те, в которых все три кислотных радикала принадлежат одной кислоте, например трипальмитин, триолеин. В состав смешанных триацилглицеролов входят остатки разных высших жирных кислот. В природных жирах, представляющих собой смесь разнообразных триацилглицеролов, доля простых мала. Например, жир коровьего молока является олеопальмитобутирином. Для характеристики нейтральных жиров продолжительное время используют константы: 1) кислотное число – количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Увеличение кислотного числа свидетельствует о гидролизе триацилглицеролов; 2) йодное число - количество граммов йода, связываемое 100 г данного жира. Поскольку присоединение йода происходит по месту двойных связей, йодное число дает представление о содержании в жире ненасыщенных жирных кислот.

Сложные липиды делят на фосфолипиды и гликолипиды.

Фосфолипиды широко распространены в растительных и животных тканях, в микроорганизмах они являются преобладающей формой липидов. Фосфолипиды содержатся, главным образом, в мембранных структурах. Значительное количество фосфолипидов содержится в сердце, печени животных, в семенах растений и в яйцах птиц. Высоким содержанием фосфолипидов отличается нервная система позвоночных.

В зависимости от спирта фосфолипиды подразделяются на *глицерофосфолипиды* – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, плазмалогены (вместо одного остатка жирной кислоты включен ее альдегид) и *сфингофосфолипиды* (входят в состав мембран и липопротеинов). *Гликолипиды* делят на *ганглиозиды* – аминоспирт сфингозин, жирная кислота, гексозы, N-ацетилнейраминаовая кислота (плазматические мембраны нервных и глиальных клеток, серое вещество); *цереброзиды* - аминоспирт сфингозин, жирная кислота, галактоза; *сульфатиды* - цереброзидсульфаты (миелиновые оболочки, белое вещество).

Функции липидов:

1) *пластическая* – липиды входят в состав мембран и определяют их свойства (проницаемость, жидкость, передача нервного импульса и др.);

2) *энергетическая* – липиды служат энергетическим материалом для организма. При окислении 1 г жира выделяется 39 кДж/моль энергии, что в 2 раза больше, чем при окислении 1 г белков или углеводов. Липиды - долгосрочный резерв энергии;

3) *защитная* – липиды предохраняют тело и органы от механического повреждения и сохраняют тепло (подкожный жир, жировая капсула почек, сальник в брюшной полости);

4) *регуляторная функция* (эйкозаноиды, стероидные гормоны);

5) *эмульгирование жиров* (пищеварение), стабилизация липидсодержащих жидкостей (желчь) и транспорт гидрофобных молекул

(мицеллы, липопротеины). С нарушениями обмена липидов связаны такие заболевания как атеросклероз, ожирение, желчно-каменная болезнь и др.

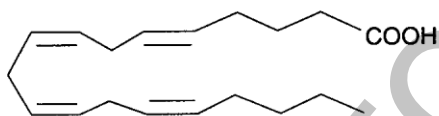
б) являются растворителем для *жирорастворимых витаминов*.

Жирные кислоты, входящие в состав омыляемых липидов, могут быть насыщенными и ненасыщенными, как правило, содержат четное число углеродных атомов (14-20) и являются неразветвленными. Наиболее распространенными являются пальмитиновая (16С) и стеариновая (18С) кислоты.

Незаменимыми (эссенциальными) являются *линолевая*, *линоленовая* и *арахидоновая* кислоты. При достаточном поступлении с пищей линолевой кислоты имеется адекватный синтез арахидоновой кислоты. Незаменимые жирные кислоты выполняют три важные функции: 1) из них образуются биорегуляторы - *эйкозаноиды*; 2) необходимы для *построения мембран* (обеспечивают текучесть мембраны); 3) участвуют в транспорте холестерина и образовании *липопротеинов*.

10.2. Эйкозаноиды

Эйкозаноиды - это производные эйкозаполиеновых жирных кислот, т.е. C₂₀-жирных кислот (*арахидоновой кислоты*).



Их делят на простаноиды и лейкотриены. Термин простагландины часто используют для обозначения всех простаноидов.



Источником арахидоновой кислоты являются фосфолипиды мембран (рис. 10.1). В клетках содержится малое количество свободной арахидоновой кислоты. Из фосфолипидов она освобождается под действием фосфолипазы A₂.

В активации фосфолипазы принимает участие Ca²⁺, тромбин, ангиотензин II, брадикинин, липопероксиды, адреналин.

Глюкокортикоиды тормозят активность фосфолипазы A₂, тем самым ингибируют синтез всех эйкозаноидов.

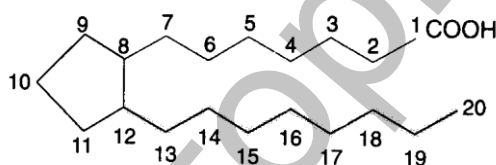
Арахидоновая кислота может вступать в *циклооксигеназный* и *липоксигеназный* пути превращения.



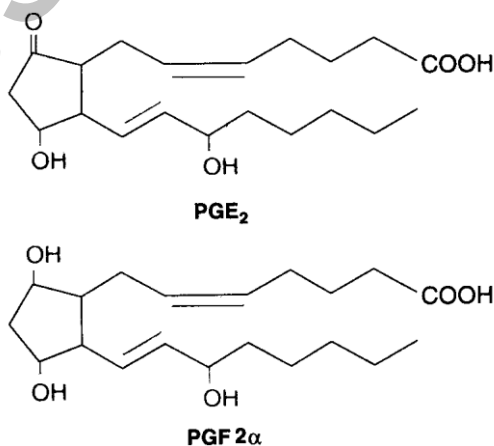
Рис. 10.1. Синтез эйкозаноидов

Простагландины были вначале открыты в семенной жидкости в 1930 г. Сейчас известно, что они содержатся практически во всех тканях и их называют "местные гормоны". Они синтезируются из арахидоновой кислоты.

Структура простагландинов. Простагландины являются аналогами простановой кислоты и в своей структуре содержат цикlopentanовое кольцо (образуется 8 и 12 атомами углерода), и две боковых цепи с карбоксильной группой на одной из них.



Номенклатура. Простагландины делятся на группы A, B, E, D, F в зависимости от строения пятичленного кольца и характера заместителя. В зависимости от числа двойных связей все простагландины делят на группы 1, 2, 3. Группа указывается цифрой справа внизу от названия, например PGE₁, PGF_{2α}.



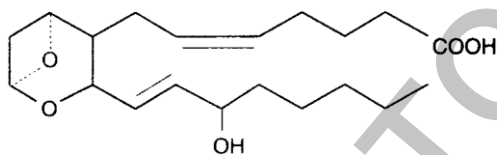
Метаболизм простагландинов. Циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты приводит к образованию эндоперекиси, из которой далее синтезируются простагландины. Для реакции необходимо 2 молекулы кислорода. Инактивация

простагландинов происходит при участии фермента 15-гидрокси-простагландин-дегидрогеназы, который встречается во всех тканях, но больше всего в легких. Время жизни простагландинов короткое - один оборот крови.

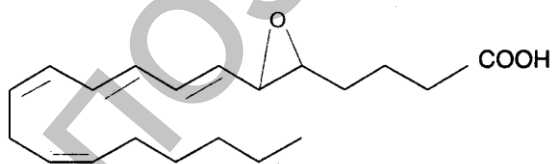
Функции простагландинов. Простагландины действуют как *локальные гормоны*. В мембранах клеток различных тканей есть рецепторы для простагландинов. После связывания PGE с рецепторами в клетках увеличивается содержание цАМФ, а в случае PGF - цГМФ. Поэтому часто эффекты разных простагландинов могут быть противоположными. Например, PGE вызывает расслабление, а PGF - сокращение гладких мышц матки (т.е. PGE способствует оплодотворению, а PGF - вызывает аборт). PGE индуцируют аллергические реакции, а PGF - их подавляют. PGE₁ является мощным пирогеном (повышает температуру тела).

Простациклины образуются в эндотелиальных клетках эндокарда и сосудов. Они препятствуют агрегации тромбоцитов; расширяют коронарные сосуды и снижают давление крови, действуя на гладкие мышцы сосудов.

Тромбоксаны образуются в тромбоцитах. Вызывают сужение сосудов и способствуют агрегации тромбоцитов. Эффекты противоположны простациклинам.



Лейкотриены образуются в лейкоцитах, мастоцитах, тромбоцитах, легких, сердце, селезенке.



Липоксигеназа вводит кислород в 5, 12 и 15 положения арахидоновой кислоты, образуя гидропероксиды. Только 5-липоксигеназа образует LT (LTA₄ → LTB₄ (C₄) → LTD₄, LTE₄). Лейкотриены участвуют в воспалительных и аллергических реакциях, суживает мускулатуру бронхов.

10.3. Транспорт липидов

Жиры гидрофобны, поэтому существуют специальные механизмы их транспорта в крови. Свободные (неэстерифицированные) жирные кислоты

переносятся кровью в виде комплексов с альбуминами. Холестерол, его эфиры, триацилглицеролы, фосфолипиды транспортируются в составе липопротеинов.

Липопротеины являются молекулярными комплексами, состоящими из липидов и белков.

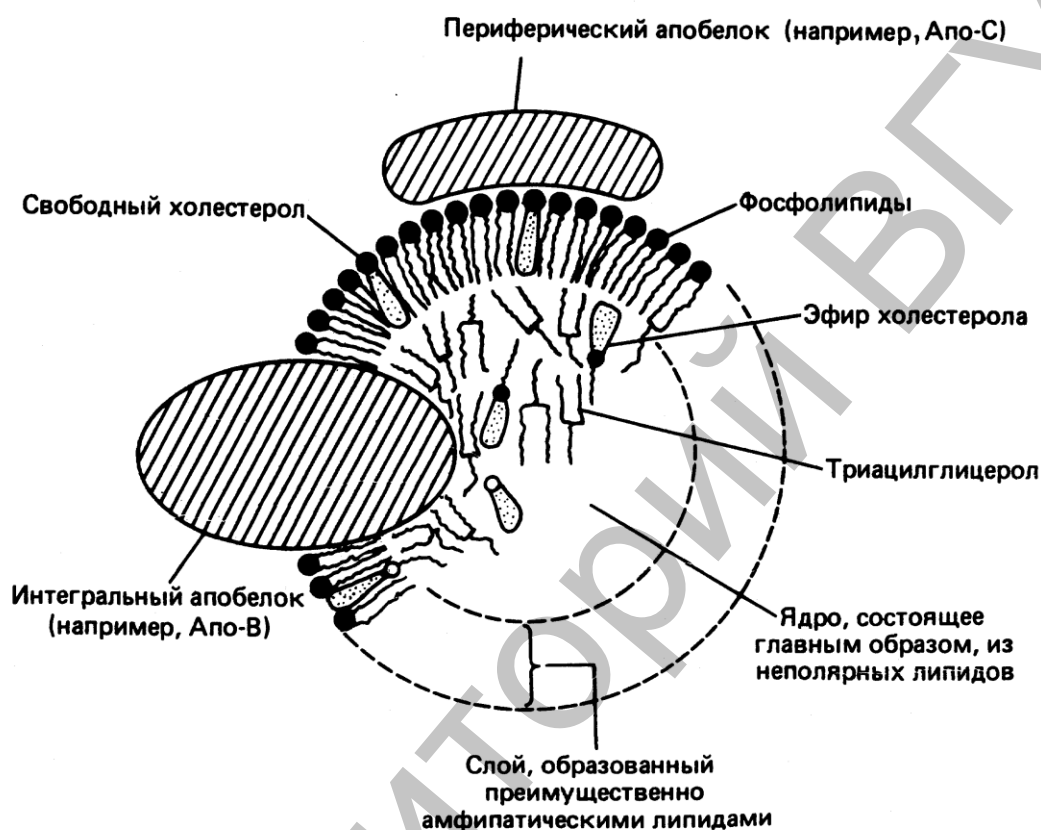


Рис. 10.2. Строение липопротеина

Существует несколько классов липопротеинов (ЛП), но всех их объединяют следующие особенности: 1) поверхностный слой липопротеинов состоит из фосфолипидов, свободного холестерола и белков; 2) каждый липопротеин содержит особый набор поверхностных белков - аполипопротеинов (апо), которые обозначаются буквами латинского алфавита (А,В,С); 3) сердцевина (ядро) липопротеина состоит из гидрофобных триацилглицеролов, эфиров холестерола (рис. 10.2).

Аполипопротеины выполняют следующие функции: 1) являются структурными компонентами липопротеинов; 2) участвуют в узнавании и взаимодействии с рецепторами мембран; 3) активируют ферменты метаболизма липопротеинов.

Липопротеины подразделяются на 4 основные класса в зависимости от плотности (определяемой с помощью ультрацентрифугирования) и электрофоретической подвижности (табл. 10.1).

Таблица 10.1.

Классификация липопротеинов по методу разделения

Класс	Ультрацентрифугирование	Электрофорез
Хиломикроны	Хиломикроны	Хиломикроны
Липопротеины очень низкой плотности	ЛПОНП (VLDL)	пре- β -ЛП
Липопротеины низкой плотности	ЛПНП (LDL)	β -ЛП
Липопротеины высокой плотности	ЛПВП (HDL)	α -ЛП

Основные параметры и состав липопротеинов представлен в табл. 10.2.

Хиломикроны (ХМ) – самые крупные частицы. ХМ синтезируются в слизистой кишечника и участвуют в *экзогенном транспорте пищевых липидов к различным тканям*. Основным липидом являются *триацилглицеролы*.

ЛПОНП синтезируются в печени. Основным липидом являются *триацилглицеролы*. Основная функция – *транспорт эндогенных липидов из печени в периферические ткани*.

ЛПНП образуются в кровеносном русле из ЛПОНП. Содержат много *холестерола* (основной транспортер холестерина), который транспортируется *в периферические ткани*.

ЛПВП образуются в печени, содержат много фосфолипидов и белков; у этих ЛП компоненты оболочки преобладают над сердцевиной.

Таблица 10.2

Состав липопротеинов

Липопротеины	Молекулярная массы, Да	Диаметр, нм	Состав, %			
			белок	ТГ	ФЛ	ХС
Хиломикроны	1-10 млн.	100-1000	1-2	88-90	4-7	5-6
ЛПОНП	5-100 тыс.	30-90	7-10	50-56	18	20-23
ЛПНП	2-4 млн.	20-25	20-21	10-13	21-24	45-47
ЛПВП	200-400 тыс.	10-15	35-50	5-8	30-43	20-35

ТГ – триацилглицеролы, ФЛ – фосфолипиды. ХС - холестерол

Различают экзогенный (транспорт пищевых липидов) и эндогенный (транспорт липидов, синтезированных в организме) транспорт.

Экзогенный транспорт. Продукты переваривания липидов всасываются в клетки слизистой оболочки кишечника в составе мицелл. Жирные кислоты с числом углеродных атомов <12 всасываются в кровь и по воротной вене транспортируются в печень. Длинноцепочечные жирные кислоты ($C >12$) в клетках кишечника реэстерифицируются в триацилглицеролы, которые по составу напоминают пищевые жиры. Полученные триацилглицеролы вместе с фосфолипидами, холестерином и

белками (2%) образуют хиломикроны. Хиломикроны содержат апопротеин В48 и апоА.

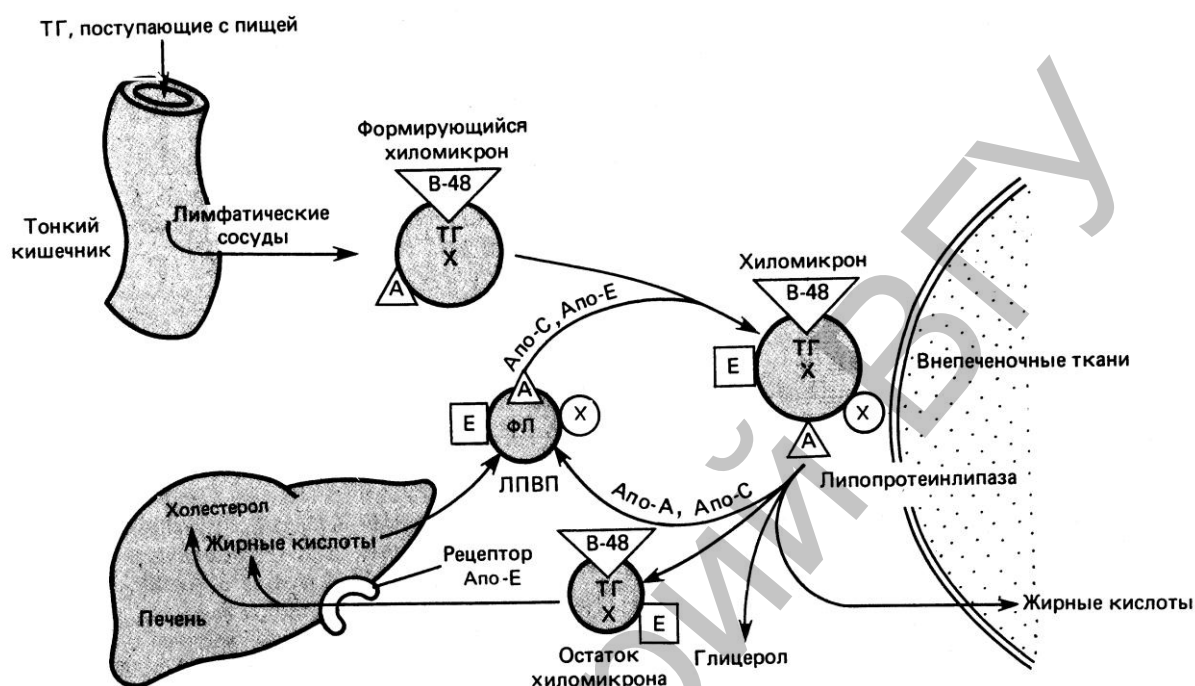


Рис. 10.3. Экзогенный транспорт липидов (по Марри Р. и др., 2004)

Хиломикроны поступают в лимфу. В крови встречаются с частицами ЛПВП, содержащими апоЕ и апоС. Хиломикроны отдают апоА частицам ЛПВП, а взамен приобретают апоЕ и апоС. Один из аполипопротеинов группы С - апоСII - служит активатором фермента липопротеинлипазы (ЛПЛ). Этот фермент синтезируется и секретируется жировой и мышечной тканями, клетками молочных желез. Секретируемый фермент прикрепляется к плазматической мембране эндотелиальных клеток капилляров тех тканей, где он синтезировался. АпоСII, находящийся на поверхности ХМ, активирует ЛПЛ. Она гидролизует триацилглицеролы в составе ХМ до глицерола и жирных кислот. Эти жирные кислоты либо поступают в клетки жировой и мышечной ткани, либо соединяются с альбуминами плазмы. В результате действия ЛПЛ хиломикроны резко уменьшаются в размерах и их называют ремнанты (остаток). Ремнанты ХМ рецепторным путем захватываются печенью (рис. 10.3).

Эндогенный транспорт. В клетках печени ресинтезируются триацилглицеролы и фосфолипиды, которые характерны для данного организма. Они включаются в состав ЛПОНП. В состав ЛПОНП входят апоВ100 и апоС. Это основная транспортная форма триацилглицеролов. В другой класс липопротеинов, образуемых в печени - ЛПВП входят холестерол, фосфолипиды, апоА. Эти частицы плоские и их называют - насцентные ЛПВП. (В их ядре нет гидрофобных молекул). Эти ЛПВП

играют большую роль в обратном транспорте холестерина из клеток периферических тканей в печень.

В капиллярах жировой и мышечной тканей апоСII ЛПОНП активирует ЛПЛ, которая катализирует гидролиз триацилглицеролов ЛПОНП и превращает их в ЛППП (липопротеины промежуточной плотности). ЛППП под действием синтезированной в печени циркулирующей печеночной триацилглицероллипазы, теряют еще часть триацилглицеролов и превращаются в ЛПНП. Основным липидом ЛПНП становится холестерин, который в составе ЛПНП переносится к клеткам всех тканей. Следовательно, ЛПНП образуются непосредственно в сосудистом русле (рис. 10.4).

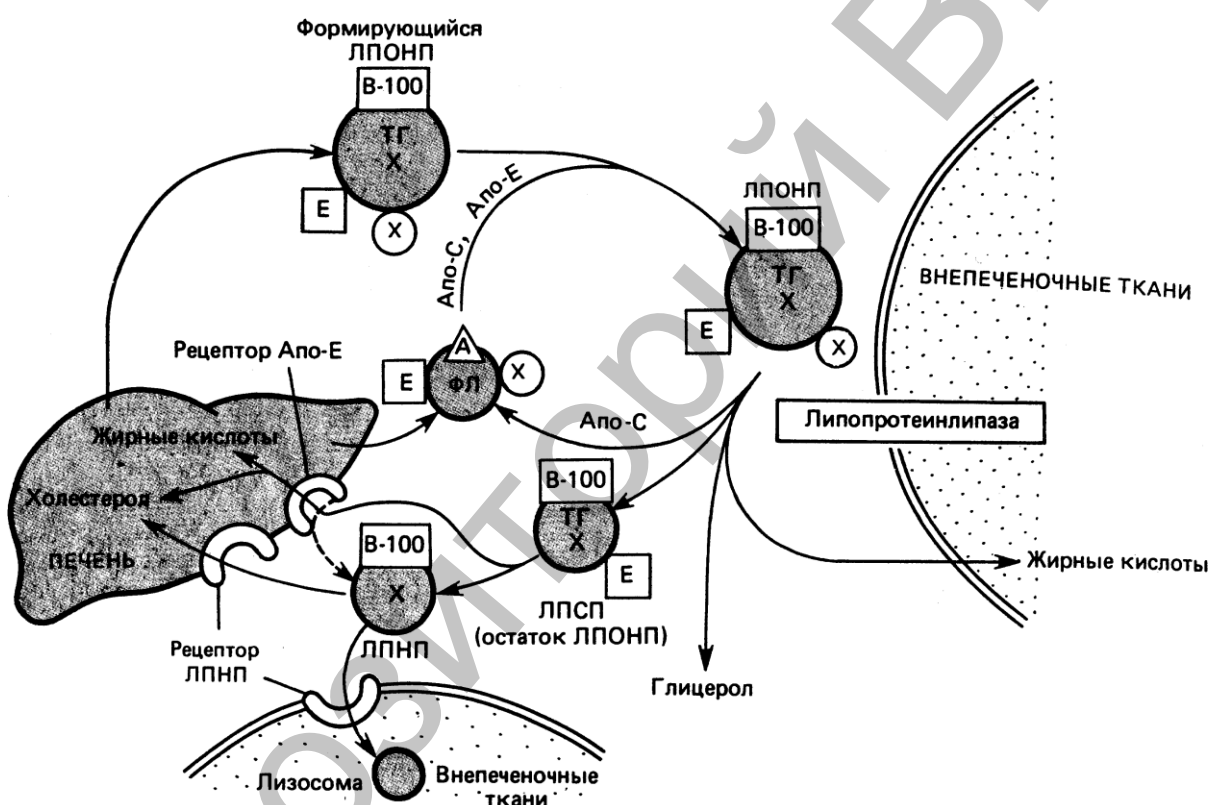


Рис. 10.4. Эндогенный транспорт липидов (по Марри Р. и др., 2004)

Итак, в результате экзогенного и эндогенного транспорта в капиллярах жировой и мышечной тканей освобождаются жирные кислоты и глицерол. Жирные кислоты связываются с альбуминами и транспортируются к тканям-потребителям.

10.4. Окисление жирных кислот

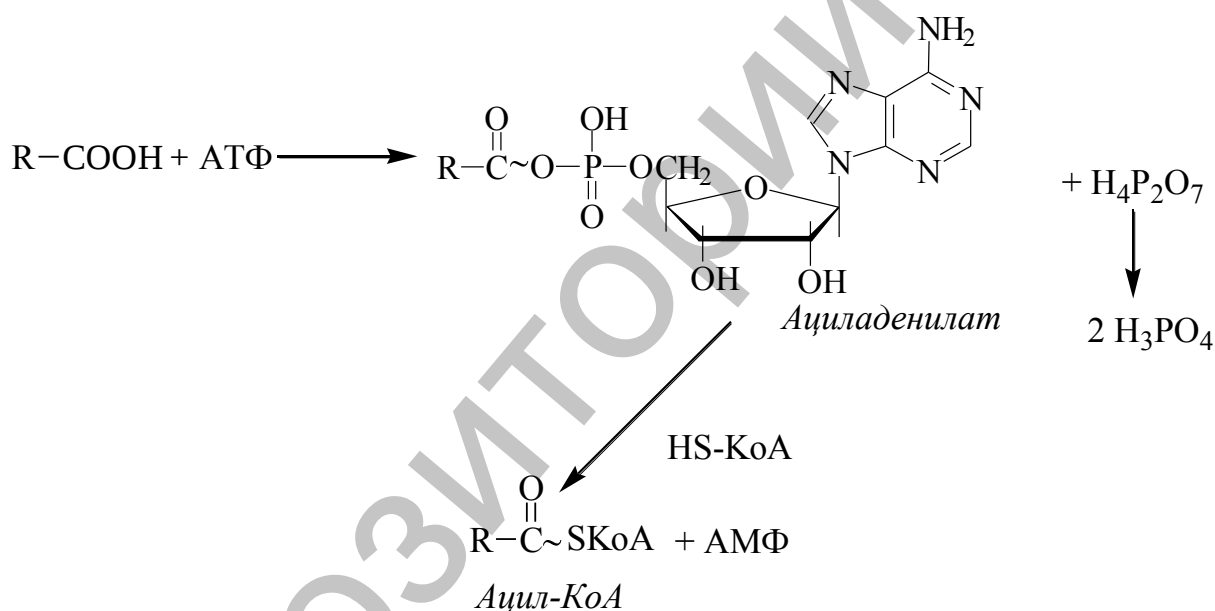
Окислительное расщепление жирных кислот – универсальный процесс, протекающий во всех видах живых организмов. У млекопитающих окисление жирных кислот с энергетической целью происходит в печени, почках, скелетной и сердечной мышцах. Окисление жирных кислот происходит в митохондриях. В мозге, эритроцитах и

мозговом слое надпочечников жирные кислоты не окисляются. В клетке окисление жирных кислот локализовано в *матриксе митохондрий*.

Первые предположения о путях окисления жирных кислот высказал Ф.Кнопп еще в 1904 г., выдвинув свою гипотезу «β-окисления», в соответствии с которой происходит последовательное отщепление двухуглеродных фрагментов с карбоксильного конца молекулы.

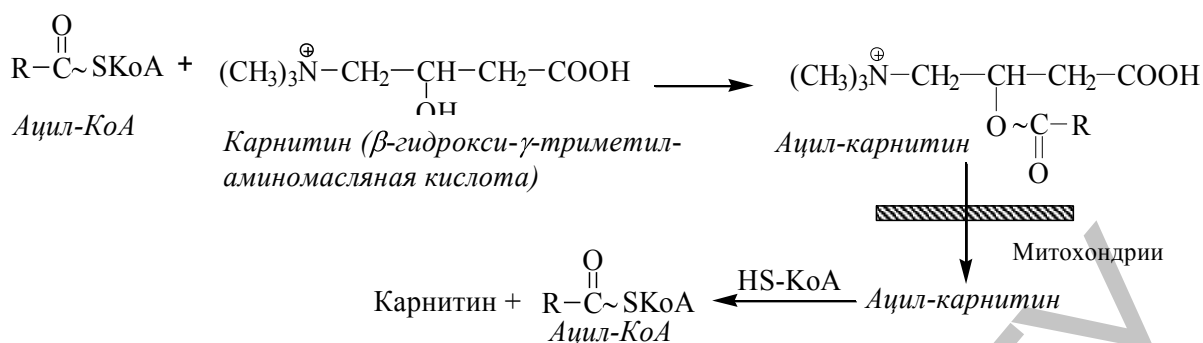
Процесс окисления условно делят на 3 этапа: 1) активация жирных кислот в цитозоле и их транспорт в митохондрии; 2) сам процесс; 3) окисление образующегося ацетил-КоА в ЦТК.

Активация жирной кислоты происходит в цитозоле под действием ферментов *ацил-КоА-синтетаз* (тиокиназ). Известен ряд тиокиназ, специфичных к жирным кислотам с разной длиной углеводородной цепи. Эти ферменты в клетках прокариот прикреплены к клеточной мембране. У эукариот – к внешней мембране митохондрий.



Реакция протекает в 2 этапа и требует АТФ, HS-КоА и Mg^{2+} . Вначале жирная кислота взаимодействует с АТФ с образованием ациладенилата, который затем реагирует с HS-КоА. Для активации используется энергия 2-х макроэргических связей, т.к. АТФ превращается в пиррофосфат, который гидролизует пиррофосфатазой до неорганического фосфата.

Образованный ацил-КоА переносится через мембрану митохондрий с помощью карнитина (β-гидрокси-γ-триметиламиномасляная кислота) и ферментов, локализованных в цитозоле и митохондриях - карнитинацил-трансфераз. В цитозоле образуется ацил-карнитин, который способен транспортироваться через мембрану митохондрий. В митохондриях происходит обратный процесс под действием митохондриальной карнитин-ацилтрансферазы и ацил-КоА освобождается.



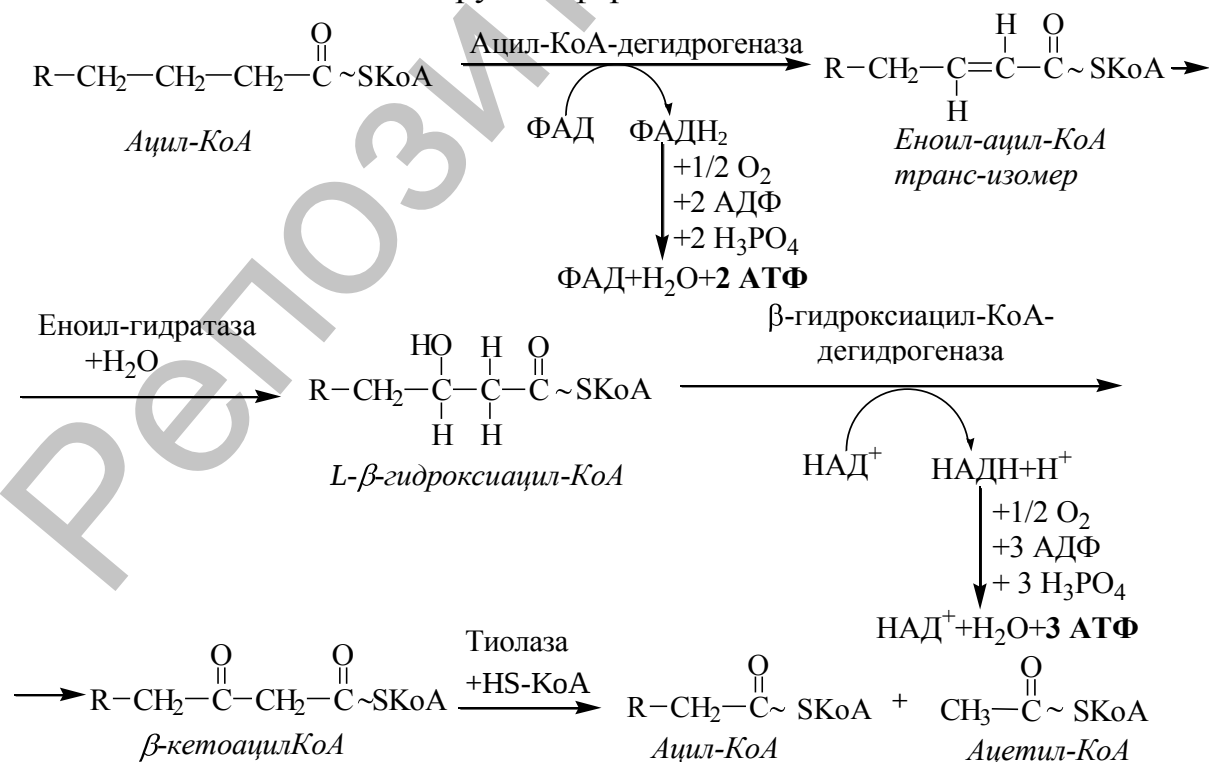
Окисление жирной кислоты: в результате каждого цикла β -окисления, включающего 4 реакции, происходит высвобождение ацетил-КоА и жирная кислота укорачивается на 2 углеродных атома.

1. **Дегидрирование.** Ацил-КоА подвергается дегидрированию под действием фермента ацил-КоА-дегидрогеназы, содержащей в качестве простетической группы ФАД. Образуется двойная связь между α и β углеродными атомами. Фермент обладает стереоспецифичностью, поэтому в результате этой реакции образуется только *транс*-изомер.

2. **Гидратация.** Еноил-КоА-гидратаза присоединяет молекулу воды и образуется L- β -гидроксиацил-КоА.

3. **Дегидрирование.** β -гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа (НАД-зависимая дегидрогеназа) катализирует второе окисление. Образуется β -кетоацил-КоА и НАДН.

4. Конечной реакцией β -окисления является высвобождение ацетил-КоА из ацил-КоА. Катализируется ферментом тиолазой.



Ацетил-КоА вступает в ЦТК: Ацетил-КоА + ЩУК → ЦТК (12 АТФ).
А укороченный ацил-КоА вновь вступает в следующий цикл β-окисления.

Катаболизм жирных кислот обеспечивает *продукцию энергии*. Расчет выделяемой энергии вели по формуле:

$$[5(n/2 - 1) + n/2 \cdot 12] - 2$$

где: 5 - число молекул АТФ, образуемое при одном акте β-окисления; n - число атомов углерода в жирной кислоте; n/2-1 - число актов β-окисления; n/2 - число молекул ацетил-КоА; 12 - число молекул АТФ при полном окислении одной молекулы ацетил-КоА; - 2 – количество высокоэнергетических фосфатов, используемых на активацию жирной кислоты (при активации АТФ распадается на АМФ и пирогосфат).

Учитывая смену представлений об энергетическом выражении НАДН – 2,5 АТФ и ФАДН₂ – 1,5 АТФ расчетная формула видоизменяется:

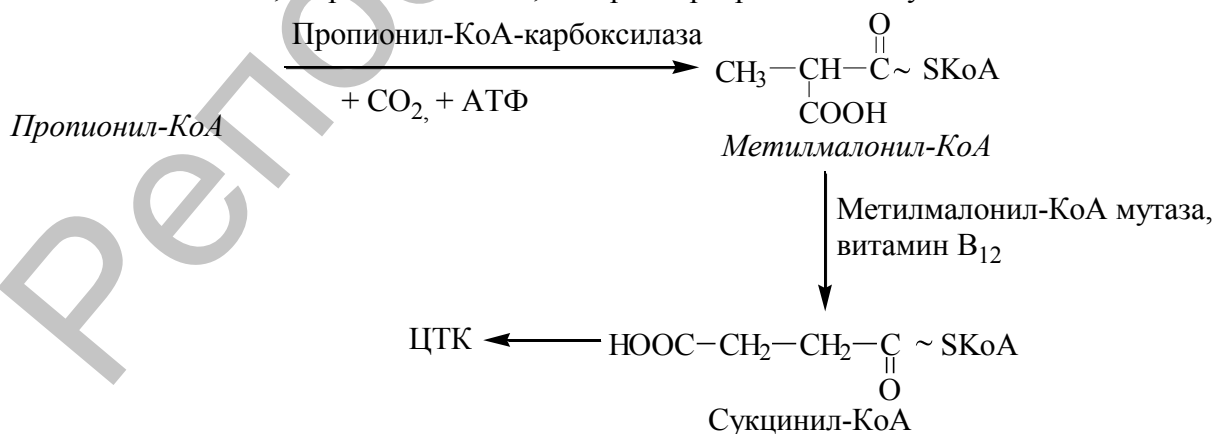
$$[4(n/2 - 1) + n/2 \cdot 10] - 2$$

Ненасыщенные жирные кислоты до места двойной связи окисляются так же, как насыщенные. Однако двойные связи природных ненасыщенных жирных кислот имеют *цис*-конфигурацию, а в КоА-эфирах жирных кислот, являющихся промежуточными продуктами при β-окислении насыщенных жирных кислот, двойные связи имеют *транс*-конфигурацию. Кроме того, последовательное удаление двухуглеродных фрагментов при окислении ненасыщенных жирных кислот до первой двойной связи дает Δ^{3,4}-ацил-КоА, а не Δ^{2,3}-ацил-КоА, который является промежуточным продуктом β-окисления насыщенных жирных кислот.

В организме имеется фермент, который, во-первых, осуществляет перемещение двойной связи из положение 3-4 в положение 2-3 и, во-вторых, изменяет конфигурацию двойной связи из *цис*- в *транс*-, т.е. катализирует реакцию двойной изомеризации: Δ^{3,4}-*цис*, Δ^{2,3}-*транс*-еноил-КоА-изомераза. Далее процесс идет обычным путем.

Скорость окисления ненасыщенных жирных кислот выше, чем насыщенных.

При окислении жирных кислот с *нечетным числом углеродных атомов* образуется не ацетил-КоА, а пропионил-КоА, который превращается в сукцинил-КоА:

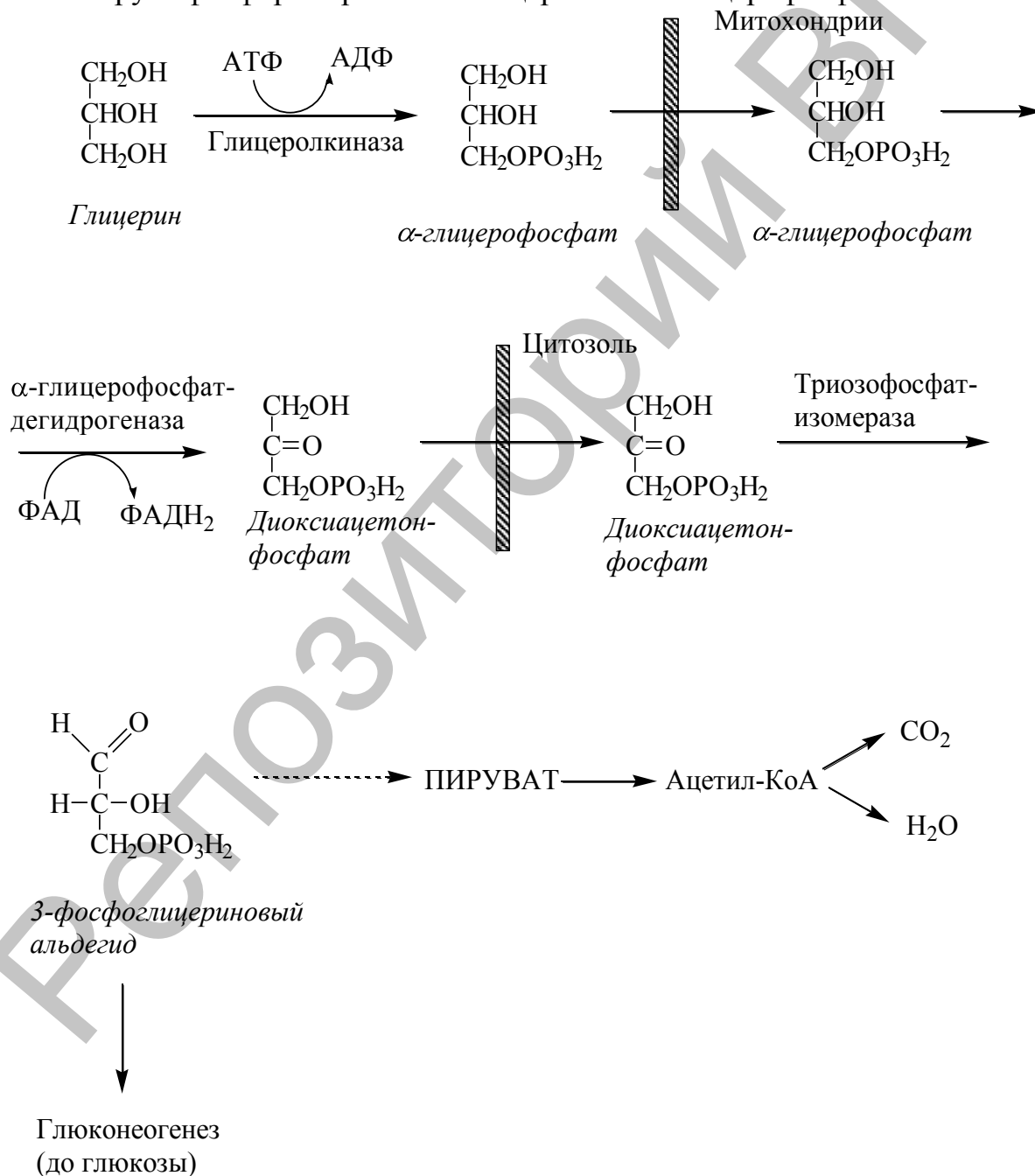


При регуляции окисления первостепенное значение имеет доступность жирных кислот. Поступление жирных кислот определяется содержанием жиров в пище и скоростью липолиза эндогенных липидов.

Вторым контролирующим фактором является уровень запаса энергии в клетке: β -окисление жирных кислот активируется АДФ и ингибируется АТФ.

10.5. Окисление глицерола

При липолизе триацилглицеролов жировых клеток или ХМ и ЛПОНП кроме жирных кислот образуется глицерол. Глицерол свободно транспортируется кровью. В почках, печени, лактирующих молочных железах имеется фермент глицеролкиназа, который в цитозоле катализирует фосфорилирование глицерола в α -глицерофосфат.



Дальнейшие превращения 3-фосфоглицеролового альдегида могут быть двоякими:

1) По реакциям глюконеогенеза:

$\text{ДАФ} + 3\text{-ФГА} \rightarrow \text{Ф-1,6-БФ} \rightarrow \text{Ф-6-Ф} \rightarrow \text{Г-6-Ф} \rightarrow \text{глюкоза}$

2) По реакциям гликолиза:

$3\text{-ФГА} \rightarrow 1,3\text{-БФГК} \rightarrow 3\text{-ФГК} \rightarrow 2\text{-ФГК} \rightarrow \text{ФЭП} \rightarrow \text{пируват} \rightarrow \text{ацетил-КоА} \rightarrow \text{ЦТК}$

Энергетический баланс окисления глицерола до CO_2 и H_2O :

- на стадии глицеролкиназы - 1 АТФ;
- на стадии α -глицерофосфатдегидрогеназы + 2 АТФ;
- на стадии дегидрогеназы $3\text{-ФГА} \rightarrow \text{НАДН} + \text{H}^+ \rightarrow + 3 \text{ АТФ}$;
- на стадии глицераткиназы + 1 АТФ \ субстратное
- на стадии пируваткиназы + 1 АТФ / фосфорилирование;
- при окислительном декарбоксилировании пирувата в ацетил-КоА $\rightarrow \text{НАДН} + \text{H}^+ \rightarrow + 3 \text{ АТФ}$
- окисление ацетил-КоА в ЦТК и сопряженных цепях переноса электронов $\rightarrow + 12 \text{ АТФ}$. Итого: $22 - 1 = 21 \text{ АТФ}$

Современное представление об энергетике окисления глицерола можно получить, используя примечание к схеме окисления высших жирных кислот.

Для синтеза липидов используется ацетил-КоА, основными источниками которого являются: 1) β -окисление жирных кислот; 2) окислительное декарбоксилирование пирувата; 3) некоторые (кетогенные) аминокислоты.

10.6. Синтез кетоновых тел

Ацетил-КоА включается в ЦТК в условиях, когда расщепление жиров и углеводов сбалансировано. Ускоренный катаболизм жирных кислот или сниженный уровень использования углеводов (как по отдельности, так и в сочетании) могут приводить к накоплению ацетил-КоА и синтезу из него кетоновых тел. Синтез кетоновых тел протекает в печени. Ферменты локализованы в матриксе митохондрий.

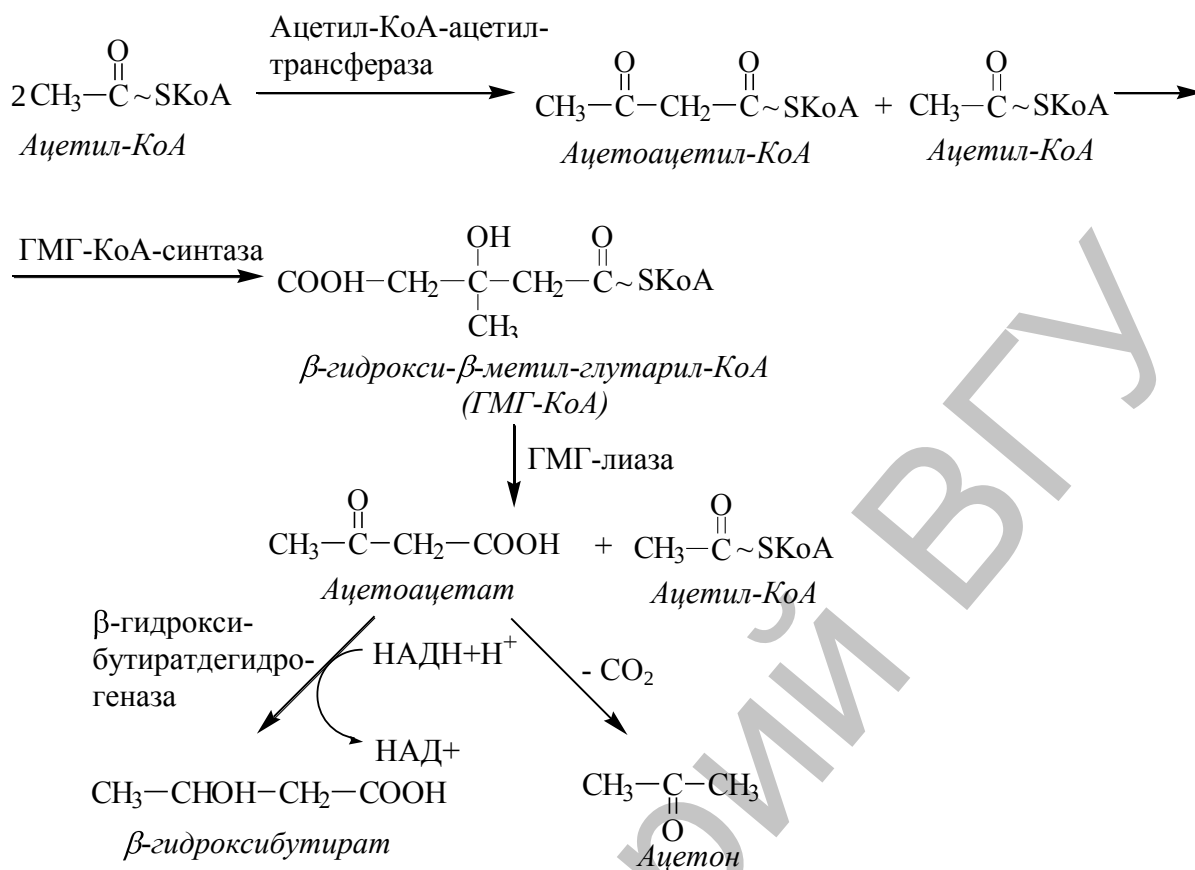
1. 2 молекулы ацетил-КоА конденсируются с образованием *ацетоацетил-КоА*. Фермент – *ацетил-КоА-ацетилтрансфераза*.

2. Ацетоацетил-КоА взаимодействует с третьей молекулой ацетил-КоА. Образуется β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА (*ГМГ-КоА*). Фермент – *ГМГ-КоА синтаза*.

3. *ГМГ-КоА-лиаза* расщепляет ГМГ-КоА до *ацетоацетата* и *ацетил-КоА*.

4. Ацетоацетат спонтанно декарбоксилируется с образованием *ацетона* или восстанавливается с помощью β -гидроксибутират-дегидрогеназы до β -гидроксибутирата. *Ацетоацетат, ацетон и β -гидроксибутират* - кетоновые тела.

В норме образуется небольшое количество кетоновых тел.



Кетоновые тела являются водорастворимыми молекулами и транспортируются к различным органам. Ацетоацетат и β -гидроксибутират являются важными источниками энергии для *скелетных мышц, сердечной мышцы и мозга*. В тканях, где отсутствуют митохондрии (эритроциты) кетоновые тела не используются.

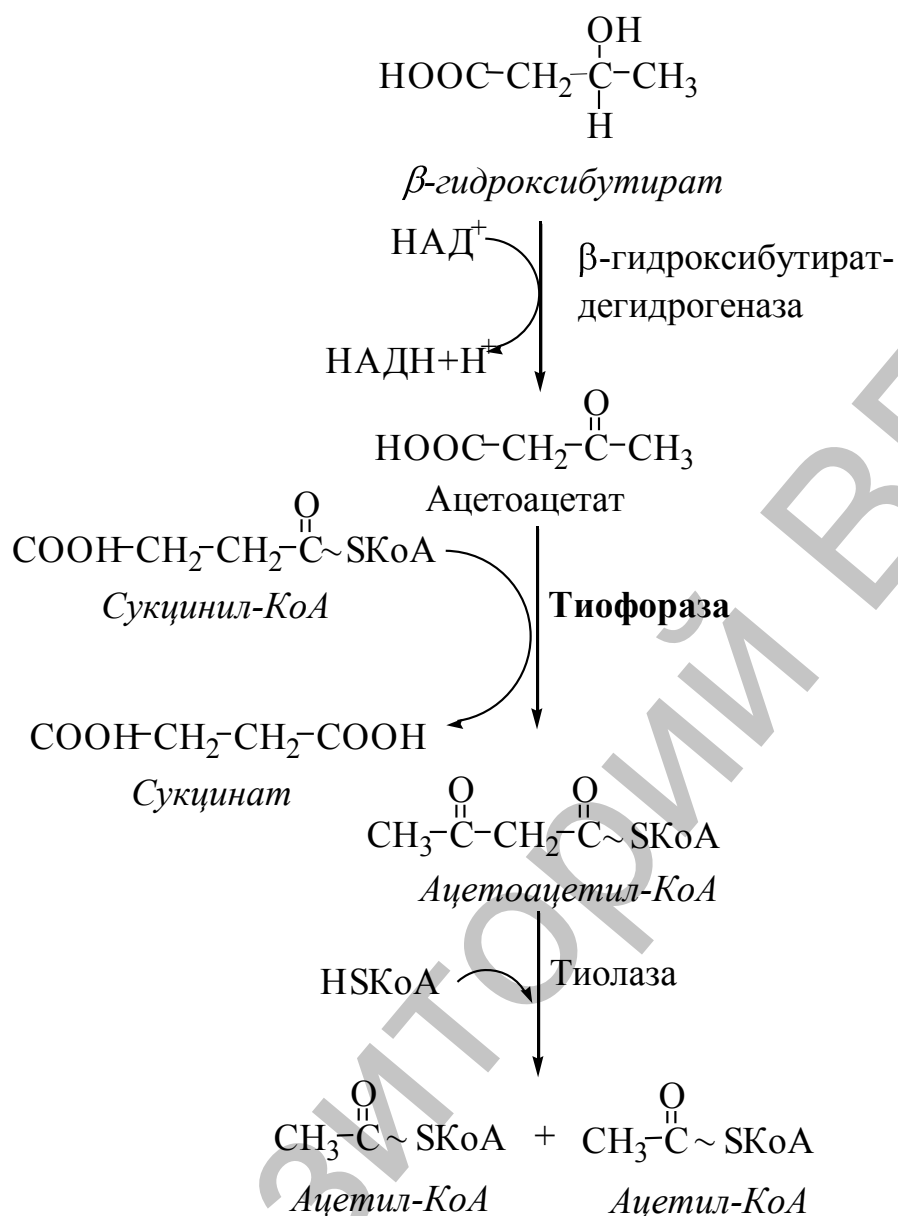
В печени ацетоацетат не может окисляться, поскольку отсутствует фермент *тиофараза*, необходимый для использования кетоновых тел. В периферических тканях β -гидроксибутират превращается в ацетоацетат, который активируется в ацетоацетил-КоА митохондриальным ферментом тиюфаразой. Источником HS-KoA является сукцинил-КоА (промежуточный продукт ЦТК). Тиюалаза расщепляет ацетоацетил-КоА до 2-х молекул ацетил-КоА.

Кетогенез регулируется гормонами: *глюкагон* – активирует, *инсулин* – ингибирует.

При голодании и диабете образуется избыток кетоновых тел. Это приводит к их накоплению в крови и развитию метаболического ацидоза. При большом избытке кетоновых тел они выводятся почками, т. е. возникает кетонурия. В тяжелых случаях ацетон выводится через легкие и может быть обнаружен в выдыхаемом воздухе.

Регуляция кетогенеза

1. Биосинтез кетоновых тел активизируется только при увеличении в крови свободных жирных кислот, т.е. для регуляции кетогенеза важны факторы, контролирующие стадию мобилизации свободных жирных кислот из жировой ткани.



2. Свободные жирные кислоты в печени используются для биосинтеза либо триацилглицеролов, либо включаются в процесс β -окисления. Расхождение путей метаболизма жирных кислот регулируется скоростью их транспорта через митохондриальную мембрану в матрикс, где и происходит β -окисление.

3. Ацетил-КоА в матриксе митохондрий может либо окисляться в ЦТК, либо метаболизировать по пути кетогенеза, т.е. образовывать кетоновые тела.

10.7. Синтез холестерина

Холестерол (холестерин) может поступать с пищей или синтезироваться *de novo*. Синтез холестерина осуществляется в клетках почти всех органов и тканей, однако в значительных количествах - в печени 80%, в пищеварительном тракте - 10% и коже - 5%. За сутки в организме взрослого синтезируется около 500 мг холестерина.

Функции холестерина:

1. Структурный компонент клеточных мембран.

2. Предшественник для синтеза всех других стероидов в организме (стероидных гормонов, витамина Д и желчных кислот).
3. Структурный компонент липопротеинов, участвующих в транспорте липидов в организме.

Ферменты, участвующие в синтезе холестерина локализованы в *цитозоле* и *микросомальной фракции* клеток. Синтез происходит из ацетил-КоА с затратой АТФ, Mg^{2+} , НАДФН₂. В синтезе выделяют 5 стадий:

1. *Синтез ГМГ-КоА* (β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА). 2 молекулы ацетил-КоА конденсируются с образованием ацетоацетил-КоА, к которому затем присоединяется третья молекула ацетил-КоА и синтезируется ГМГ-КоА. Данные реакции аналогичны реакциям при синтезе кетонowych тел. Однако, эти пути различаются, поскольку кетонowe тела синтезируются в митохондриях, а синтез холестерина происходит в цитозоле. Таким образом, существует 2 пула ГМГ-КоА в клетках.

2. *Синтез мевалоната*. ГМГ-КоА-редуктаза катализирует восстановление ГМГ-КоА до мевалоновой кислоты с использованием НАДФН.

3. *Синтез изопреновых единиц*. В результате 3-х реакций, катализируемых киназами, мевалонат превращается в *3-фосфо-5-пирофосфомевалонат*, который декарбоксилируется с образованием *изопентенилпирофосфата*. Изопентенилпирофосфат изомеризуется в диметилаллилпирофосфат. Оба соединения являются 5-углеродными изопреновыми единицами.

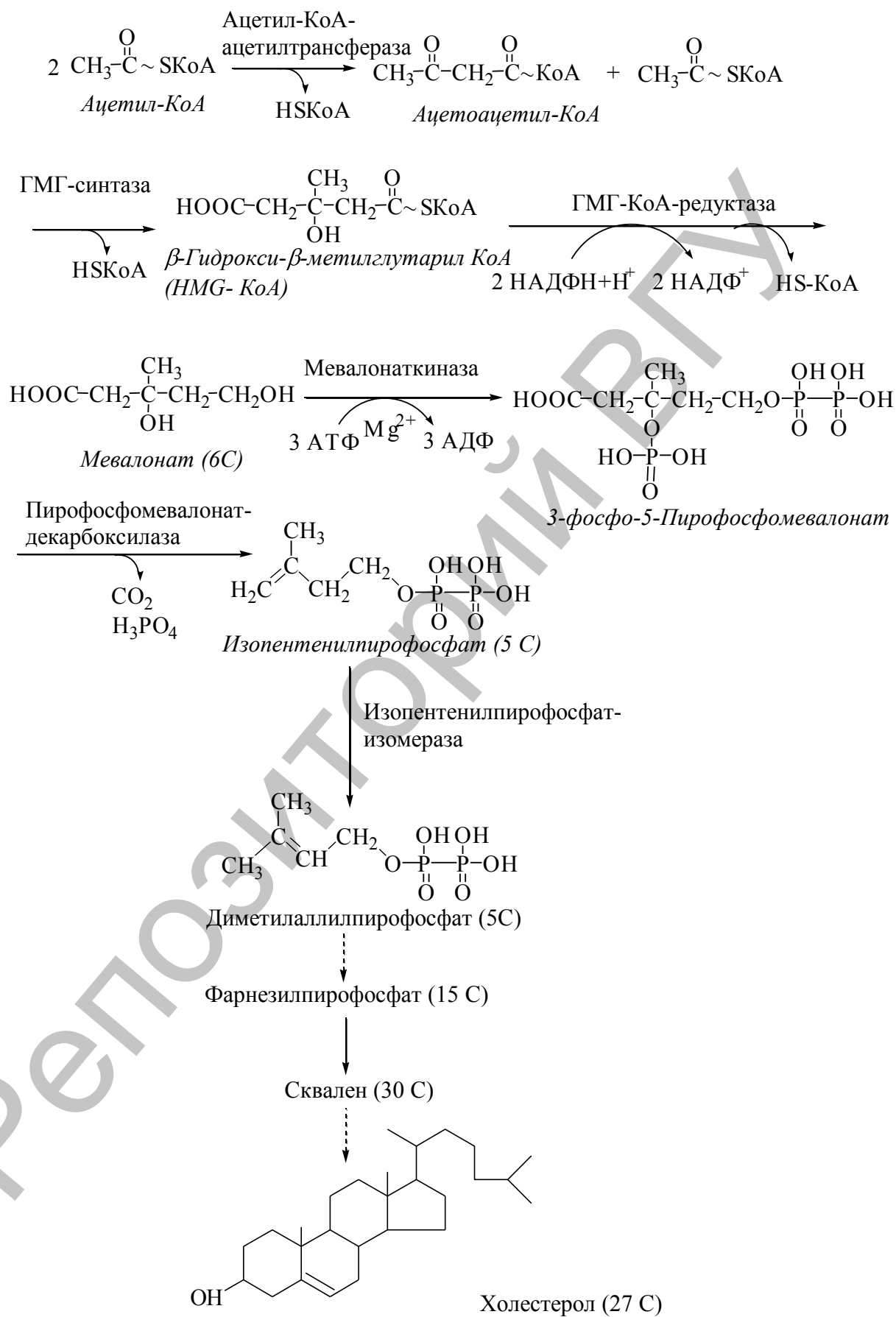
4. *Синтез сквалена*. Диметилаллилпирофосфат конденсируется и образуется фарнезилпирофосфат (15C). Из двух единиц фарнезилпирофосфата синтезируется сквален (30C).

5. *Превращение сквалена в холестерол*. Сквален подвергается гидроксированию и циклизации с использованием O₂ и НАДФН и превращается в ланостерол. Синтез холестерина из ланостерола является многоэтапным процессом, который включает:

- а) удаление 3-х метильных групп;
- б) насыщение двойной связи в боковой цепи;
- в) перемещение двойной связи в кольцо из положения 8,9 в положение 5,6.

Синтез холестерина является частью метаболического пути синтеза некоторых других изопреновых соединений, например, убихинона в митохондриальной цепи переноса электронов и долихола в гликопротеинах.

ГМГ-КоА редуктаза – *необратимая реакция*, которая определяет скорость синтеза холестерина. Известны следующие механизмы регуляции:



1. *Механизм обратной связи.* Конечный продукт холестерол контролирует синтез по механизму обратной связи. Повышение внутриклеточной концентрации холестерола *снижает* синтез фермента ГМГ-КоА-редуктазы. Это происходит за счет снижения транскрипции гена, ответственного за синтез фермента. Активность ГМГ-редуктазы и скорость синтеза холестерола *ускоряются* при снижении содержания холестерола в печени, пище, при действии радиации.

2. *Гормональная регуляция.* ГМГ-редуктаза существует в двух формах. Дефосфорилированная форма фермента активна, фосфорилированная форма – неактивна. Гормоны *глюкагон* и *глюкокортикоиды* способствуют формированию неактивной ГМГ-КоА-редуктазы и, следовательно, снижают скорость синтеза холестерола. *Инсулин* и *тироксин* повышают продукцию холестерола, способствуя образованию активной ГМГ-КоА-редуктазы.

10.8. Синтез жирных кислот

По сравнению с гликогеном жиры представляют более компактную форму хранения энергии, поскольку они менее окислены и гидратированы. При этом количество энергии, резервированное в виде нейтральных липидов в жировых клетках, ничем не ограничивается в отличие от гликогена. Центральным процессом в липогенезе является синтез жирных кислот, поскольку они входят в состав практически всех групп липидов. Кроме того, следует помнить, что основным источником энергии в жирах, способным трансформироваться в химическую энергию молекул АТФ, являются процессы окислительных превращений именно жирных кислот.

Общая характеристика биосинтеза жирных кислот:

1. Жирные кислоты могут синтезироваться из углеводов пищи через пируват или из аминокислот (при их избыточном поступлении) и накапливаются в виде триацилглицеролов

2. Основное место синтеза – *печень*. Кроме того, жирные кислоты синтезируются во многих тканях: *почки, мозг, молочная железа, жировая ткань*.

3. Ферменты синтеза локализованы в *цитозоле* клеток в отличие от ферментов окисления жирных кислот, которые находятся в митохондриях.

4. Синтез жирных кислот происходит из *ацетил-КоА*.

5. Для синтеза жирных кислот необходимы *НАДФН, АТФ, Mn^{2+} , биотин и CO_2* .

Синтез жирных кислот происходит в 3 этапа.

1) транспорт ацетил-КоА из митохондрий в цитозоль; 2) образование малонил-КоА; 3) удлинение жирной кислоты на 2 атома углерода за счет малонил-КоА до образования пальмитиновой кислоты.

1. *Транспорт ацетил-КоА* из митохондрий в цитозоль осуществляется с помощью цитратного челночного механизма (рис.13.5)

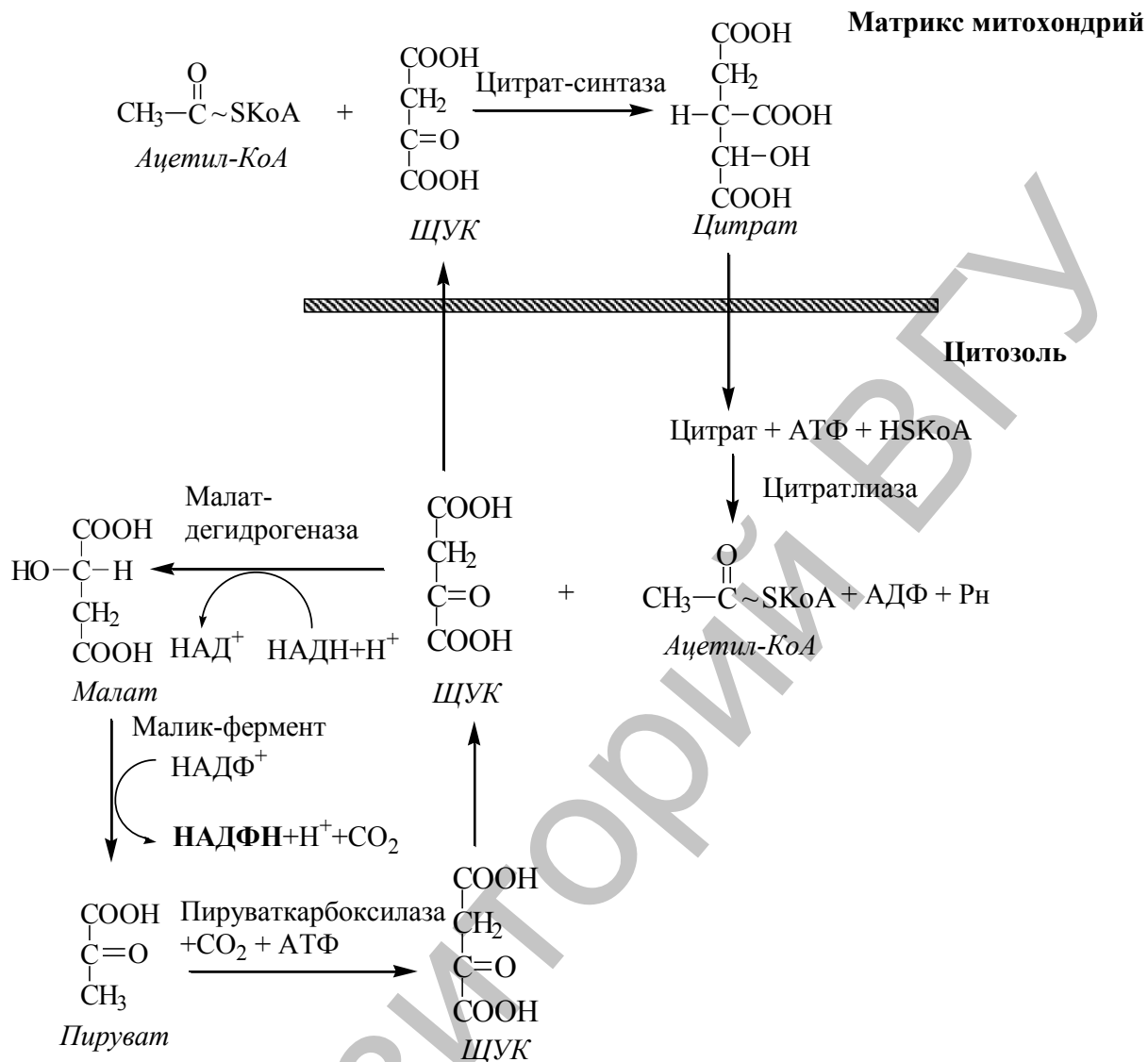


Рис. 10.5. Упрощенная схема цитратного челночного механизма и образования НАДФН

1.1. Цитратсинтаза катализирует реакцию взаимодействия ЩУК и ацетил-КоА с образованием цитрата

1.2. Цитрат транспортируется в цитозоль с помощью специфической транспортной системы.

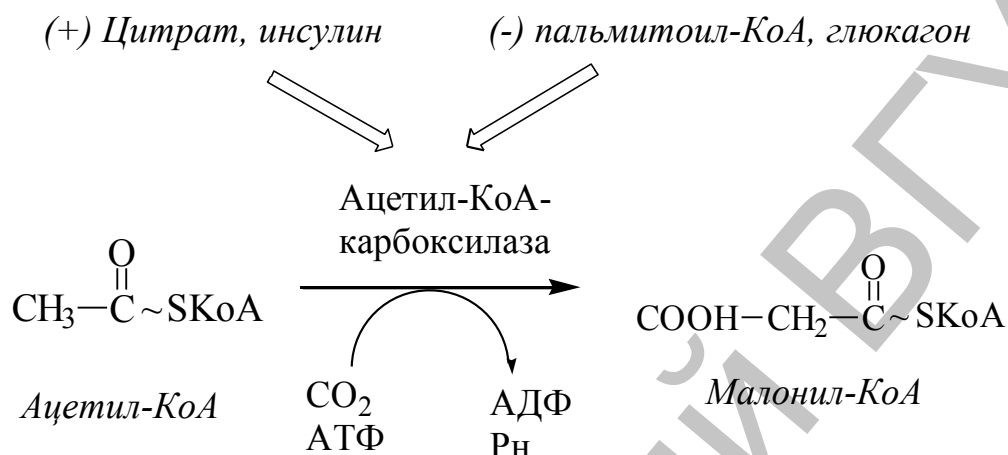
1.3. В цитозоле цитрат взаимодействует с HS-КоА и под действием цитратлиазы и АТФ образуется ацетил-КоА и ЩУК.

1.4. ЩУК может вернуться в митохондрии с помощью транслоказы, но чаще восстанавливается до малата под действием НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы.

1.5. Малат декарбоксилируется НАДФ-зависимой малатдегидрогеназой (*малик-фермент*): Образующийся НАДФН+H⁺ (50% потребности) используется для синтеза жирных кислот. Кроме этого генераторами НАДФН+H⁺ (50%) являются *пентозофосфатный путь* и *изоцитратдегидрогеназа*.

1.6. Пируват транспортируется в митохондрии и под действием пируваткарбоксилазы образуется ЦУК.

2. *Образование малонил-КоА.* Ацетил-КоА карбоксилируется под действием *ацетил-КоА-карбоксилазы*. Это АТФ-зависимая реакция, для которой необходим витамин Н (биотин) и CO_2 .



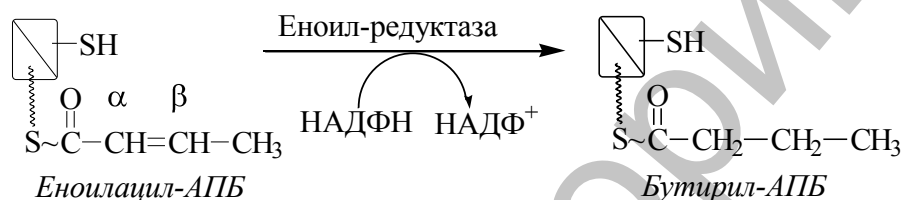
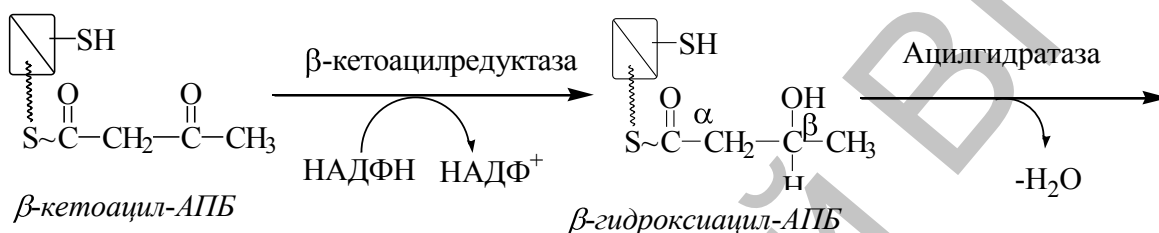
Эта реакция лимитирует скорость всего процесса синтеза жирных кислот: активаторы – цитрат и инсулин, ингибитор – синтезированная жирная кислота и глюкагон.

3. *Удлинение жирной кислоты.* Процесс протекает при участии *мультиферментного синтазного комплекса*. Он состоит из двух *полипептидных цепей*. Каждая полипептидная цепь содержит по 6 ферментов синтеза жирных кислот (*трансацилаза, кетоацил-синтаза, кетоацил-редуктаза, гидратаза, еноил-редуктаза, тиюэстераза*). Ферменты связаны между собой ковалентными связями. Ацилпереносящий белок (АПБ) является также частью полипептидной цепи, но это не фермент. Его *функция* связана только с переносом *ацильных радикалов*. В процессе синтеза важную роль играют SH-группы. Одна из них принадлежит 4-фосфопантетеину, входящему в состав АПБ и вторая – цистеину фермента кетоацил-синтазы. Первую называют *центральной*, а вторую *периферической* SH-группой.

Функциональная единица синтеза жирных кислот состоит из половины одного мономера, взаимодействующей с комплементарной половиной второго мономера. Следовательно, на синтазном комплексе одновременно синтезируются 2 жирные кислоты. Активной является только димерная форма комплекса. Перенос субстрата от фермента к ферменту происходит при участии АПБ.

Реакции синтеза жирных кислот

1. При участии *трансацилазы* остатки малонила переносятся на центральную SH-группу, а ацетила – на периферическую.

$$\begin{array}{c}
 \boxed{\diagup} \text{--SH}_{\text{(периф.)}} \\
 \text{SH} \\
 \text{(центр.)}
 \end{array}
 + \text{CH}_3\text{--}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{--}\text{SKoA}
 + \text{COOH--CH}_2\text{--}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{--}\text{SKoA}
 \xrightarrow{\text{Трансацилаза}}
 \begin{array}{c}
 \boxed{\diagup} \text{--}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{--}\text{CH}_3 \\
 \text{S--}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{--}\text{CH}_2\text{--}\text{COOH}
 \end{array}
 \xrightarrow[\text{--CO}_2]{\text{Кетоацилсинтаза}}$$


4. Фермент *ацилгидратаза* удаляет H_2O из β -гидроксиацил-АПБ и образуется *енолацил-АПБ*.

6. Если нужна масляная кислота (бутират), то *тиоэстераза* (деацилаза) отщепляет масляную кислоту с центральной SH-группы на цитоплазматический HS-KoA.

8. Этот процесс продолжается до образования *пальмитиновой кислоты* (часто весь комплекс называют пальмитатсинтазный комплекс). Она отщепляется тиаэстеразой и соединяется с цитоплазматическим HS-КоА. Полученный пальмитоил-КоА может ингибировать пальмитатсинтазу, вызывая диссоциацию комплекса на две полипептидных цепи.

Дальнейшая судьба пальмитоил-КоА двоякая: 1) участие в процессах эстерификации с образованием ацилглицеролов и эфиров холестерина; 2) дальнейшее удлинение цепи (элонгация и десатурация).

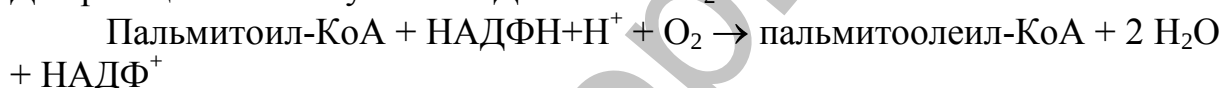
Дальнейшее *удлинение* пальмитиновой кислоты может происходить с участием 2-х систем.

Митохондриальная система удлинения жирной кислоты. Остаток пальмитиновой кислоты карнитином переносится в митохондрии, где происходит удлинение за счет присоединения *ацетил-КоА* по пути, обратному β -окислению. Для восстановления используется НАДФН.

Микросомальная система удлинения жирной кислоты является более активной. Удлинение происходит за счет малонил-КоА. Напоминает функционирование синтазного комплекса в цитоплазме. Отличие состоит в том, что промежуточные продукты не связываются с АПБ.

Синтез ненасыщенных жирных кислот

1. В микросомах с помощью оксидаз происходит введение двойных связей в насыщенные жирные кислоты с образованием *мононенасыщенных жирных кислот*: пальмитолеиновая (16:1, Δ^9) синтезируется из пальмитиновой кислоты; олеиновая (18:1, Δ^9) – из стеариновой кислоты). Для реакции используется НАДФН+H⁺ и O₂.



Согласно классическим представлениям у млекопитающих этот процесс осуществляется с помощью ферментов *десатураз* (десатурация – получение ненасыщенного продукта). Термин «десатуразы» широко используется в англоязычной биохимической литературе.

2. Полиеновые жирные кислоты – *линолевая и линоленовая не синтезируются*, а поступают с пищей (незаменимые). Остальные полиненасыщенные синтезируются из них. Особенно важен синтез арахидоновой кислоты, являющейся предшественником эйкозаноидов.

Разветвленные жирные кислоты синтезируются из продуктов деградации аминокислот с разветвленным радикалом (вал, иле, лей) через ацильные производные с КоА путем удлинения цепи и при участии АПБ.

Скорость синтеза жирных кислот регулируется *кратковременными и долговременными* механизмами контроля.

1. Кратковременная регуляция аллостерически на уровне *ацетил-КоА-карбоксилазы*.

2. Долговременная регуляция осуществляется через *синтез ферментов* и их *деградацию* при участии гормонов. Инсулин активирует ацетил-КоА-карбоксилазу путем дефосфорилирования фермента (кратковременно) и способен вызывать долговременную индукцию синтеза фермента. Глюкагон и адреналин оказывают противоположное действие.

10.9. Метаболизм триацилглицеролов и фосфолипидов

Липиды составляют около 15-20% массы тела человека. Триацилглицеролы (триглицериды, нейтральный жир) являются основными липидами тела человека и составляют 85-90% всех липидов. Большая часть триацилглицеролов накапливается в жировой ткани и является основным источником энергии организма, в отличие от углеводов и белков, которые не могут накапливаться в значительных количествах.

Триацилглицеролы являются резервом энергии в организме по двум причинам:

1. При окислении триацилглицеролов образуется в два раза больше энергии по сравнению с углеводами.

2. Триацилглицеролы являются *неполярными, гидрофобными* молекулами и поэтому накапливаются в безводной форме. (1 г гликогена связывает 2 г воды).

Запасов триацилглицеролов для обеспечения организма энергией хватает на несколько недель. Примером являются животные, впадающие в спячку на зиму. Медведи находятся в спячке около 7 месяцев, в течение которых энергия образуется при распаде триацилглицеролов.

Триацилглицеролы синтезируются во многих органах и тканях, но наиболее важную роль в их синтезе играют *печень, стенка кишечника, лактирующая молочная железа и жировая ткань*. Для синтеза необходимы активная форма глицерола - α -глицерофосфат и активные формы жирных кислот - *ацил-КоА*.

Активация глицерола:

1. В *стенке кишечника и почках* есть активная глицеролкиназа. Фермент отсутствует в жировой ткани

2. В *жировой ткани, мышцах* предшественником α -глицерофосфата является диоксиацетонфосфат, который образуется из глюкозы при гликолизе. Фермент *глицерол-3-фосфатдегидрогеназа*.

3. В *печени* имеют место оба пути образования α -глицерофосфата

. Синтез триацилглицеролов:

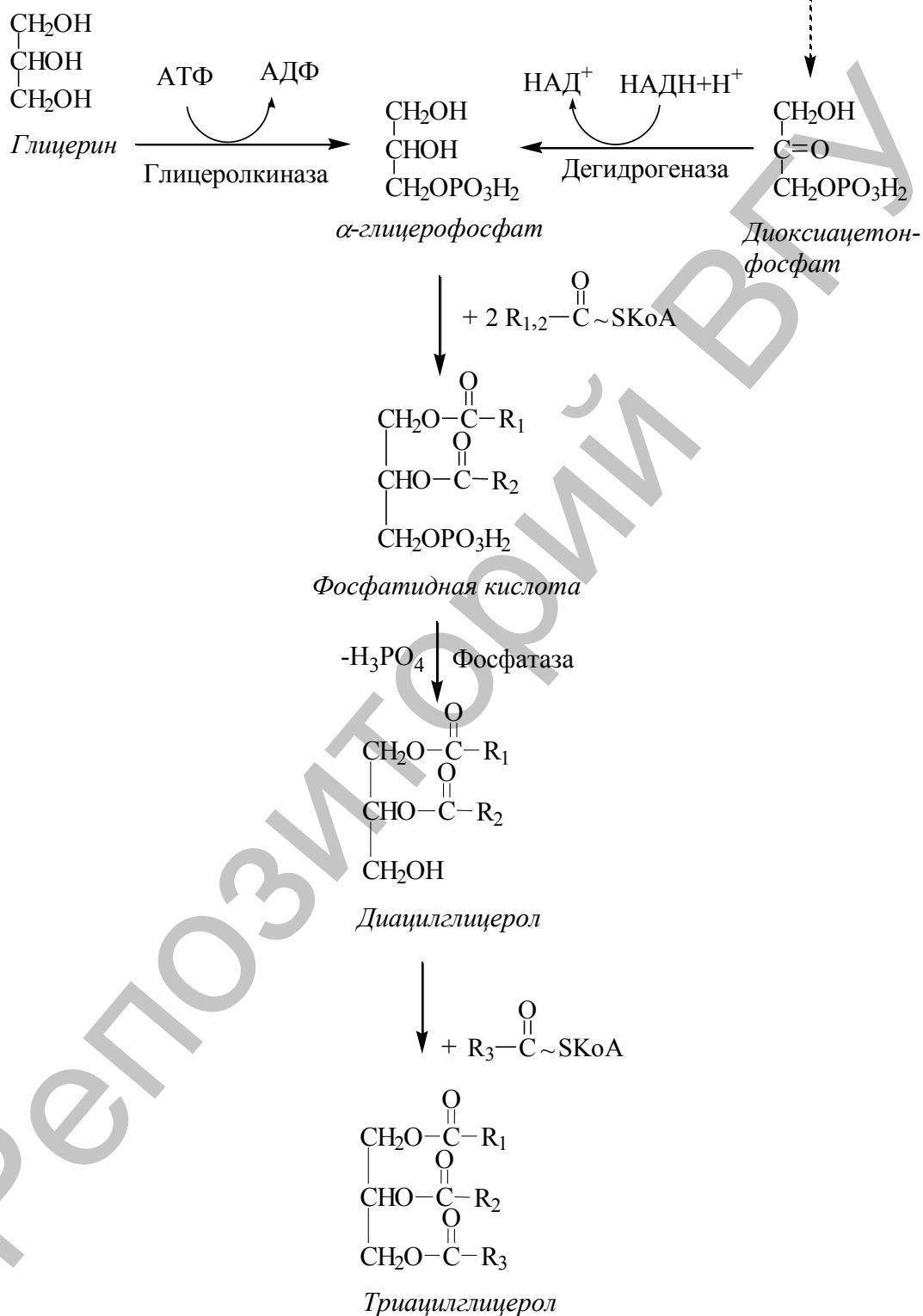
1. α -Глицерофосфат, образованный любым из этих путей, взаимодействует с *двумя молекулами активированных жирных кислот* с образованием *фосфатидной кислоты*.

2. Фосфатидная кислота дефосфорилируется под действием фермента *фосфатазы* с образованием *диацилглицерола*.

3. К диацилглицеролу присоединяется третья молекула *ацил-КоА* и образуется *триацилглицерол*.

КИШЕЧНИК
ПОЧКИ
ПЕЧЕНЬ

ЖИРОВАЯ
ТКАНЬ
МЫШЦЫ
ПЕЧЕНЬ



Промежуточные продукты синтеза – фосфатидная кислота и диацилглицерол – могут использоваться для биосинтеза фосфолипидов

В биосинтезе *глицерофосфолипидов* *фосфатидная кислота* является ключевым промежуточным соединением. Особенностью этих биосинтетических процессов является участие цитидинтрифосфата (ЦТФ) в синтезе и переносе активированных интермедиатов для реакции конденсации либо с фосфатидной кислотой, либо с продуктом ее дефосфорилирования 1,2-диацилглицеролом.

1. Фосфатидная кислота взаимодействует с ЦТФ. Образуется *цитидиндифосфатдиацилглицерол* (ЦДФ-ДАГ).

2. ЦДФ-ДАГ реагирует с серином и синтезируется *фосфатидилсерин*.

3. Фосфатидилсерин декарбоксилируется до *фосфатидилэтанолamina*.

4. С использованием S-аденозилметионина происходит метилирование фосфатидилэтанолamina и синтезируется *фосфатидилхолин*.

5. ЦДФ-ДАГ + инозитол → фосфатидилинозитол + ЦМФ.

Фосфатидилинозитол + АТФ → фосфатидилинозитол-4-фосфат + АДФ.

Фосфатидилинозитол-4-фосфат + АТФ → фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат + АДФ

Фосфатидилхолин является основной молекулой, образующей *бислой мембран, внешний слой липопротеинов*. Инозитол-4,5-бисфосфат мембран является субстратом для фосфолипазы C, что ведет к образованию вторичных внутриклеточных посредников, регулирующих фосфорилирование-дефосфорилирование белков (ферментов).

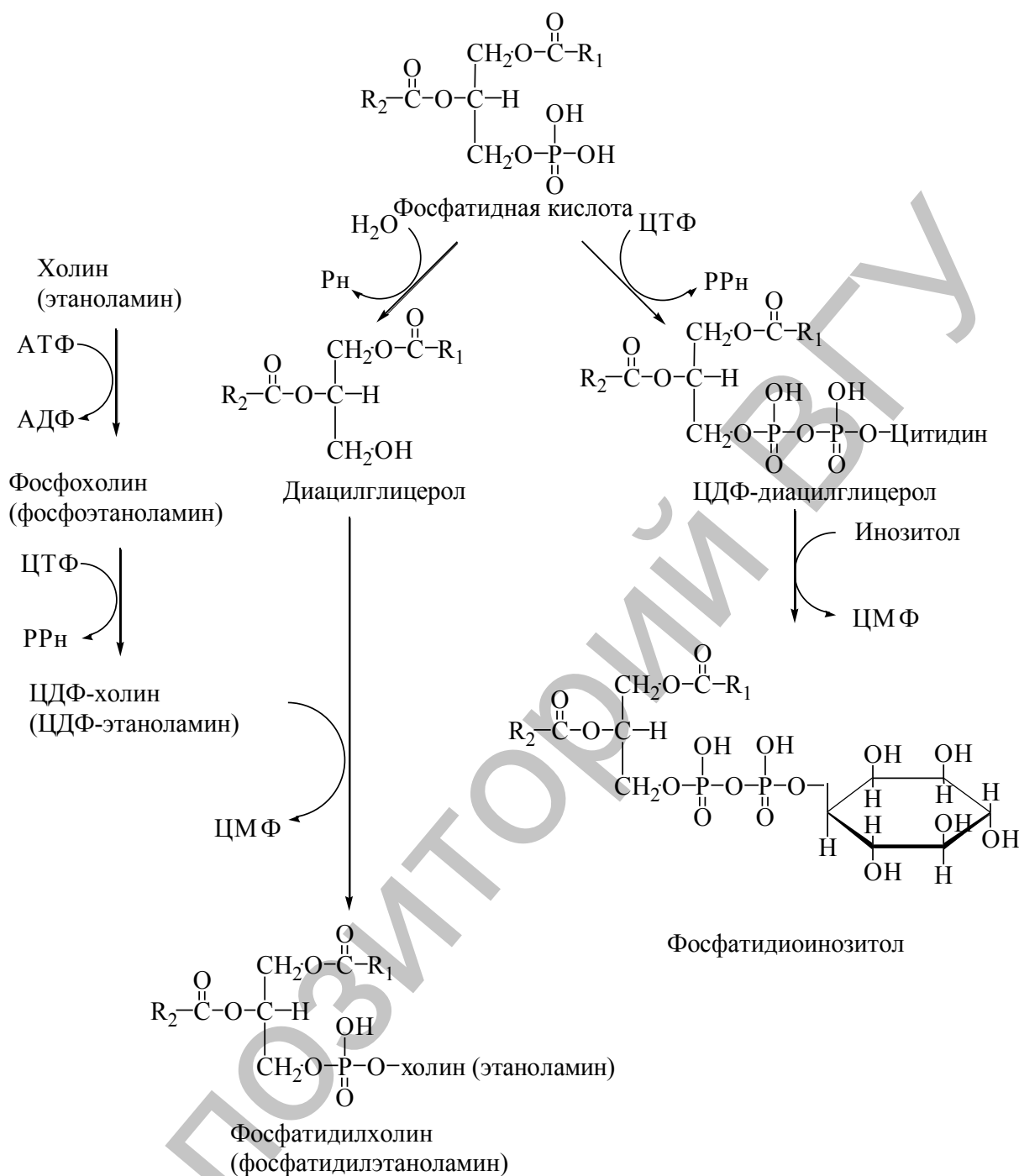
В животных тканях превалирует другой путь синтеза фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina, включающий активацию и взаимодействие с ЦТФ холина и этанолamina и последующий перенос фосфорилированных спиртов на 1,2-диацилглицерол.

Фосфатидилсерин в организме млекопитающих способен также синтезироваться в реакции обмена этанолamina, входящего в состав фосфатидилэтанолamina, на L-серин.

Фосфатидилэтанолamin + L-серин $\rightleftharpoons$ Фосфатидилсерин + Этанолamin

В последние годы интенсивно исследуются белки, способные осуществлять транспорт фосфолипидов. Этот процесс принципиально важен для обновления мембран.

Наиболее интенсивно синтез происходит в *печени, стенке кишечника, семенниках, молочной железе*. Реакции синтеза локализованы в *эндоплазматической сети*.



Глава 11. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ

Белки являются наиболее распространенными органическими веществами организма, которые составляют большую часть сухой массы тела (10-12 кг). Метаболизм белков рассматривается как метаболизм аминокислот.

11.1. Транспорт аминокислот

Транспорт свободных L-аминокислот через клеточные мембраны происходит вторичным активным транспортом сопряжен с функционированием Na⁺, K⁺-АТФазы. Перенос аминокислот внутрь клеток

осуществляется чаще всего как симпорт аминокислот и ионов натрия. Считают, что существует, по меньшей мере, шесть транспортных систем (транслоказ), каждая из которых настроена на перенос близких по строению аминокислот: 1) нейтральных аминокислот с небольшим радикалом (ала, сер, три); 2) нейтральных аминокислот с объемным радикалом и ароматических аминокислот (вал, лей, иле, мет, фен, тир); 3) кислых аминокислот (асп, глу), 4) основных аминокислот (лиз, арг), 5) пролина, 6) β -аминокислот (таурин, β -аланин). Эти системы, связывая ионы натрия, индуцируют переход белка-переносчика в состояние с сильно увеличенным сродством к аминокислоте; Na^+ стремится к транспорту в клетку по градиенту концентрации и одновременно переносит внутрь клетки молекулы аминокислоты. Чем выше градиент Na^+ , тем выше скорость всасывания аминокислот, которые конкурируют друг с другом за соответствующие участки связывания в транслоказе.

Известны другие механизмы активного транспорта аминокислот через плазматическую мембрану. Так, А.Майстером предложена оригинальная схема трансмембранного переноса аминокислот через плазматические мембраны, получившая *γ -глутаминильного цикла*.

В соответствии с гипотезой γ -глутаминильного цикла транспорта аминокислот через клеточные мембраны роль переносчика аминокислот принадлежит широко распространенному в биологических системах трипептиду глутатиону.

1. Главную роль в этом процессе играет фермент *γ -глутаминилтрансфераза* (транспептидаза), который локализован в плазматической мембране. Этот фермент осуществляет перенос γ -глутаминильной группы внутриклеточного трипептида глутатиона (γ -глу-цис-гли) на внеклеточную аминокислоту.

2. Образовавшийся комплекс *γ -глутаминил-аминокислота* проникает в цитозоль клетки, где аминокислота освобождается.

3. γ -Глутаминильная группа в виде 5-оксопролина через ряд ферментативных стадий и участия АТФ соединяется с цис-гли, что ведет к восстановлению молекулы глутатиона. При переносе следующей молекулы аминокислоты через мембрану цикл превращений повторяется. Для транспорта одной аминокислоты используется 3 молекулы АТФ.

Все ферменты γ -глутаминильного цикла обнаружены в высоких концентрациях в разных тканях – почках, эпителии ворсинок тонкого кишечника, слюнных железах, желчном протоке и др. После всасывания в кишечнике аминокислоты через воротную вену поступают в печень, а затем разносятся кровью во все ткани организма.

Всасывание интактных белков и пептидов: в течение короткого периода после рождения в кишечнике могут всасываться интактные пептиды и белки путем эндоцитоза или пиноцитоза. Этот механизм важен для переноса иммуноглобулинов матери в организм ребенка. У взрослых

всасывание интактных белков и пептидов не происходит. Тем не менее, у некоторых людей наблюдается этот процесс, что вызывает образование антител и развитие пищевой аллергии.

11.2. Аминокислотный фонд организма

В организме взрослого человека присутствует около 100 г свободных аминокислот, которые составляют аминокислотный фонд (пул). Глутамат и глутамин составляют 50% аминокислот, эссенциальные (незаменимые) аминокислоты – около 10%. Концентрация *внутриклеточных* аминокислот всегда выше, чем *внеклеточных*. Аминокислотный фонд определяется поступлением аминокислот и метаболическими путями их утилизации.

Обмен белков организма, поступление белков с пищей и синтез незаменимых аминокислот составляют источники аминокислот в организме.

Протеолиз тканевых белков животных. Осуществляется с помощью протеолитических (лизосомальных) ферментов - катепсинов. По строению активного центра выделяют цистеиновые (SH-группа цистеина), сериновые (ОН-группа серина), карбоксильные (COOH-группа асп или глу) и металлопротеиновые катепсины. Роль катепсинов: 1) создание биологически активных пептидов путем ограниченного протеолиза белковых предшественников; 2) разрушение "состарившихся" и аномальных белков; 3) участие в фагоцитозе и делении клеток; 4) участие в автолизе (при ишемии или вне организма в стерильных условиях); 5) участие в патогенезе заболеваний, связанных с изменением функции лизосом. Действие катепсинов ограничивают их ингибиторы - экзогенные и эндогенные вещества преимущественно полипептидной природы.

В то же время следует учитывать, что функциональные белки клетки должны быть защищены от преждевременного протеолиза. Для этого внутриклеточные протеолитические ферменты представлены в двух видах: 1) иммобилизованные в лизосомах и функционирующие при pH 5,0; 2) связанные с протеасомами (молекулярная масса 2000 кДа). Протеасомы содержат бочковидное ядро из 28 субъединиц и имеют коэффициент седиментации 20S. Протеолитическая активность локализована во внутреннем 20S-ядре. С торцов бочки запираются контролирующими доступ в ядро 19S-частицами. В протеасомы направляются белки, содержащие ошибки транскрипции или состарившиеся молекулы. Обязательным условием является мечение «неправильного» белка путем ковалентного связывания с небольшим белком *убиквитином*. Меченые убиквитином молекулы распознаются 19S-частицами с потреблением АТФ и переносятся в ядро, где и происходит их протеолитическое разрушение. А молекулы убиквитина могут вновь активироваться и использоваться для мечения аномальных белков.

Протеиназы высших растений. Протеиназы, выделенные из растительных клеток, в большинстве случаев относятся к сульфгидрильному типу, активируются цистеином, глутатионом и другими восстановителями. Оптимальная зона их действия находится при слабокислом, нейтральном и слабощелочном значениях pH и во многом зависит от природы субстрата. Типичный представитель – папаин из сока плодов дынного дерева (*Carica papaya*). Папаин проявляет широкую субстратную

специфичность – катализирует гидролиз пептидов, амидов, эфиров и тиоэфиров. Значительно реже встречаются растительные протеиназы, не активируемые восстановителями. Протеиназы насекомоядных растений, например, росянки, имеют резко кислый оптимум pH.

Протеиназы микроорганизмов. Из бактериальных источников было выделено большое количество различных протеолитических ферментов. Среди них встречаются как эндопептидазы, так и экзопептидазы. Все эти ферменты характеризуются поразительно широкой специфичностью или даже полным отсутствием какой бы то ни было специфичности. Некоторые бактериальные протеиназы расщепляют до 80% всех пептидных связей в белках. Широкой субстратной специфичностью обладают также протеиназы актиномицетов, гидролизующие как глобулярные, так и фибриллярные белки. Препараты протеиназы из *Str. griseus* в связи с универсальностью их действия и высокой активностью используют в промышленности, лабораторной биохимической практике и выпускаются под названием *проназа* или *протелин*. Широко используют в лабораторной практике и промышленности щелочные протеиназы *Bac. subtilis* – субтилизины, поскольку они гидролизуют белки глубже и с большей скоростью чем многие другие протеиназы, в том числе, животного происхождения.

Основные пути расходования аминокислот: 1) синтез пептидов и белков (основной путь); 2) синтез небелковых азотсодержащих соединений (пуринов, пиримидинов, НАД, фолиевой кислоты, КоА и др.), тканевых биорегуляторов (гистамин, серотонин), медиаторов (норадреналин, ацетилхолин); 3) синтез углеводов (глюконеогенез) с использованием углеродных скелетов аминокислот; 4) синтез липидов с использованием ацетильных остатков углеродных скелетов аминокислот; 5) окисление до конечных продуктов с выделением энергии (рис. 14.1).

11.3. Типичные реакции обмена аминокислот

Аминокислоты, не использованные для биосинтетических процессов, подвергаются катаболизму, а из углеродных цепей аминокислот синтезируются вещества, способные резервировать энергию – глюкоза (гликоген) и липиды. α -Аминокислоты являются бифункциональными соединениями, содержащими аминную и карбоксильную группы. Реакции по этим группам являются общими для различных аминокислот: 1) по аминной группе - реакции трансаминирования и дезаминирования; 2) по карбоксильной группе - реакции декарбоксилирования, образования аминокислотных амидов; 3) реакции по радикалу являются специфичными для каждой аминокислоты.

Для освобождения аммиака аминокислоты подвергаются реакциям **трансаминирования** с последующим **дезаминированием**. Аминогруппы аминокислот утилизируются для синтеза **мочевины**, которая экскретируется как конечный продукт метаболизма белков. Углеродный скелет аминокислот сначала превращается в кетокислоты, которые используются для получения энергии, синтеза глюкозы, кетонных тел и незаменимых аминокислот (рис. 11.1).

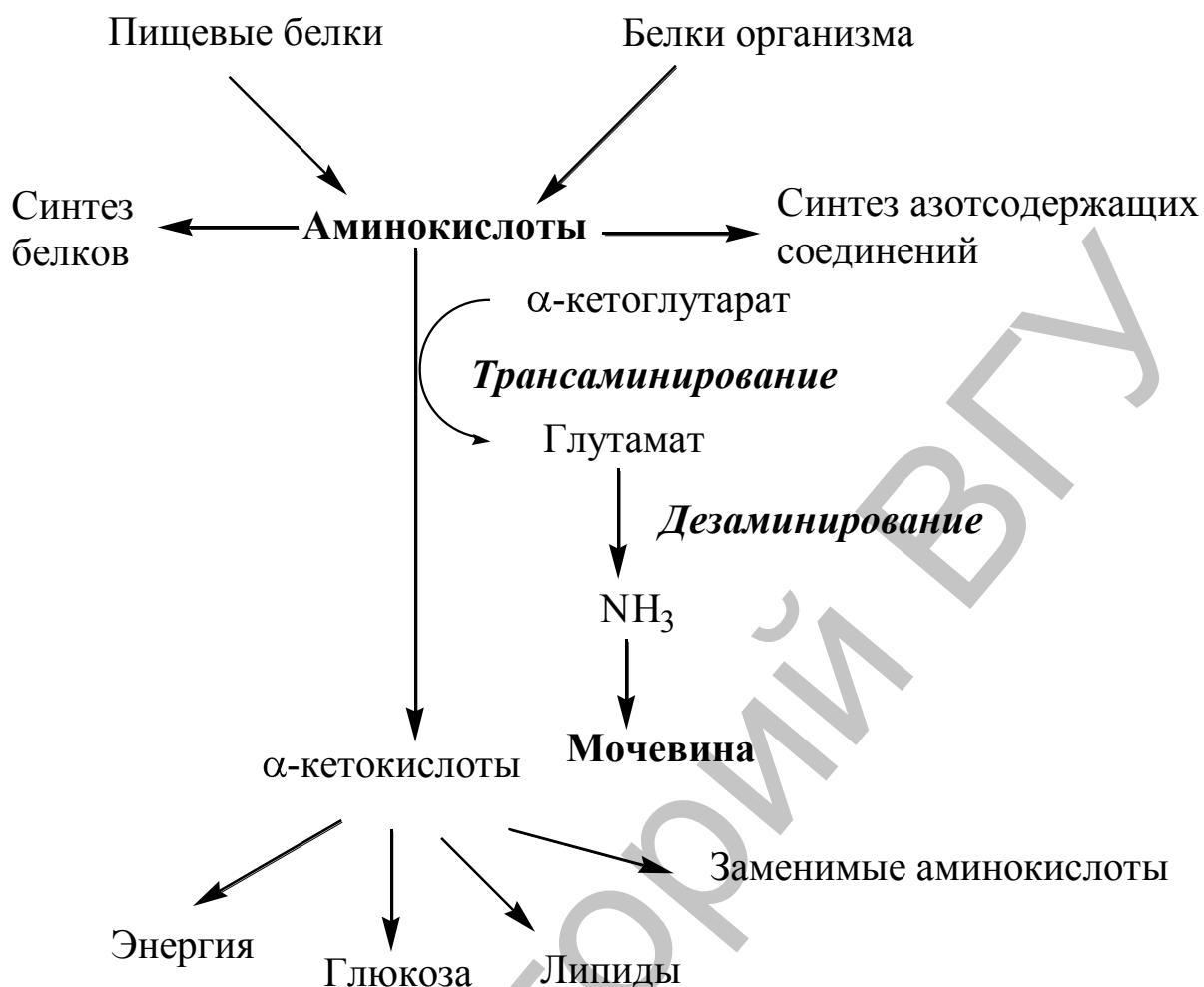
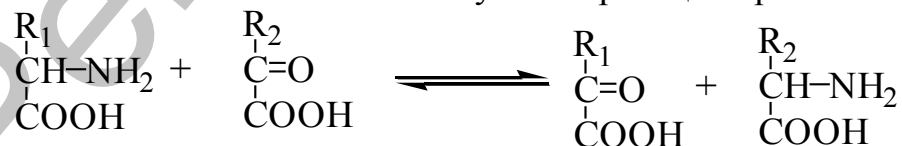


Рис. 11.1. Пути превращения аминокислот

11.4. Трансаминирование

Трансаминирование является основным путем метаболизма аминокислот. Трансаминирование (переаминирование) – реакции межмолекулярного переноса аминогруппы от аминокислоты на α-кетокислоту без промежуточного образования аммиака. Этот процесс открыт в 1937 году Е. А. Браунштейном и М. Г. Крицман. По меньшей мере 11 аминокислот способны вступать в реакции трансаминирования.



1. Реакции трансаминирования являются универсальными у всех живых организмов. Трансаминирование катализируют ферменты *аминотрансферазы* (трансаминазы). Для каждой пары аминокислоты и кетокислоты существует свой фермент. Аспаратаминотрансфераза (АсАТ) и аланинаминотрансфераза (АлАТ) являются основными трансаминазами.

2. Коферментом трансаминаз является пиридоксальфосфат – производное витамина В₆ (пиридоксол, пиридоксин).

3. Ферменты содержатся в цитозоле и *митохондриях* клеток.

4. Реакции трансаминирования *обратимы*.

5. Основными *кетокислотами*, принимающими участие в трансаминировании, являются *пируват, ЦУК* и α-кетоглутарат.

6. Трансаминирование происходит при катаболизме и анаболизме аминокислот и является пунктами "переключения" метаболических превращений. В процессе трансаминирования происходит перераспределение аминогрупп и синтез *заменяемых аминокислот*.

7. Происходит накопление α-аминогрупп в форме *одной аминокислоты* - *глутаминовой кислоты*, которая затем подвергается дезаминированию.

1) α-АК + α-кетоглутарат ↔ α-кетокислота + *ГЛУТАМАТ*

2) α-АК + ЦУК ↔ α-кетокислота + аспартат
аспартат + α-кетоглутарат ↔ ЦУК + *ГЛУТАМАТ* (АсАТ)

3) α-АК + пируват ↔ α-кетокислота + аланин
аланин + α-кетоглутарат ↔ пируват + *ГЛУТАМАТ* (АлАТ)

8. Для лабораторной практики особое значение имеет определение активности АлАТ и АсАТ. Их активность в клетках превышает активность в сыворотке крови. Эти ферменты появляются в сыворотке крови при повреждениях тканей. При поражении сердца преимущественно повышается активность сывороточной АсАТ, а при повреждениях гепатоцитов - АлАТ.

Механизм трансаминирования

1. Аминогруппа аминокислоты переносится на пиридоксальфосфат, который превращаясь в пиридоксаминфосфат.

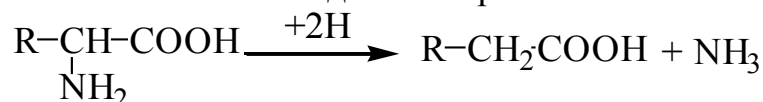
2. Пиридоксаминфосфат переносит аминогруппу на кетокислоту с образованием новой аминокислоты.

11.5. Дезаминирование аминокислот

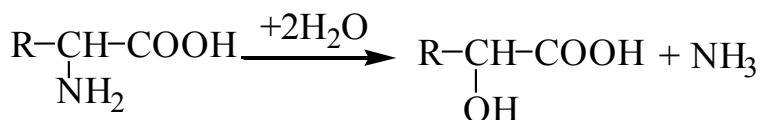
Дезаминирование – процесс удаления *аминогруппы* из *аминокислот* и выделение ее в виде *аммиака*. Углеродный скелет аминокислоты превращается в кетокислоту. Трансаминирование и дезаминирование протекает в клетке одновременно и часто ключевой молекулой является глутамат.

В природе известны четыре основных типа дезаминирования.

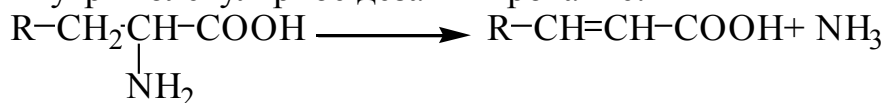
Восстановительное дезаминирование:



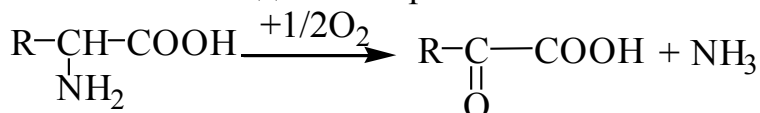
Гидролитическое дезаминирование:



Внутримолекулярное дезаминирование:



Окислительное дезаминирование:



Первые три типа дезаминирования характерны для ряда микроорганизмов, иногда встречаются у растений. Для животных, растений и большинства аэробных микроорганизмов преобладающим типом реакции является окислительное дезаминирование аминокислот.

Окислительное дезаминирование

Значение окислительного дезаминирования состоит в выделении аммиака, который используется для синтеза мочевины, и образования α -кетокислот для различных метаболических процессов: глюконеогенеза, синтеза жирных кислот, заменимых аминокислот и окисления до углекислоты и воды с образованием энергии.

1. У животных и человека процесс локализован в *пероксисомах* клеток, главным образом, *печени* и *почек*.

2. Реакции дезаминирования катализируются ферментами *L*- и *D*-оксидазами.

3. *L*- и *D*-оксидазы являются флавопротеинами с простетическими группами *ФМН* и *ФАД*, соответственно.

4. Оксидазы *L*-аминокислот активны *при pH = 10* и *при физиологических значениях pH (7,4)* их активность в десять раз ниже (рис. 14.2). Поэтому прямого окислительного дезаминирования *L*-аминокислот в пероксисомах практически не происходит (за исключением *L*-лизина).

5. В тканях при физиологических значениях pH активны оксидазы *D*-аминокислот. Но в клетках млекопитающих нет *D*-аминокислот. Роль оксидаз *D*-аминокислот не понятна. Предполагают, что эти ферменты необходимы: 1) для обезвреживания *D*-аминокислот, случайно проникших во внутреннюю среду организма с микроорганизмами; 2) при развитии опухолей возможно появление *D*-аминокислот в тканях, а, следовательно, появление аномальных белков после включения *D*-аминокислот в первичную структуру синтезируемых белков.

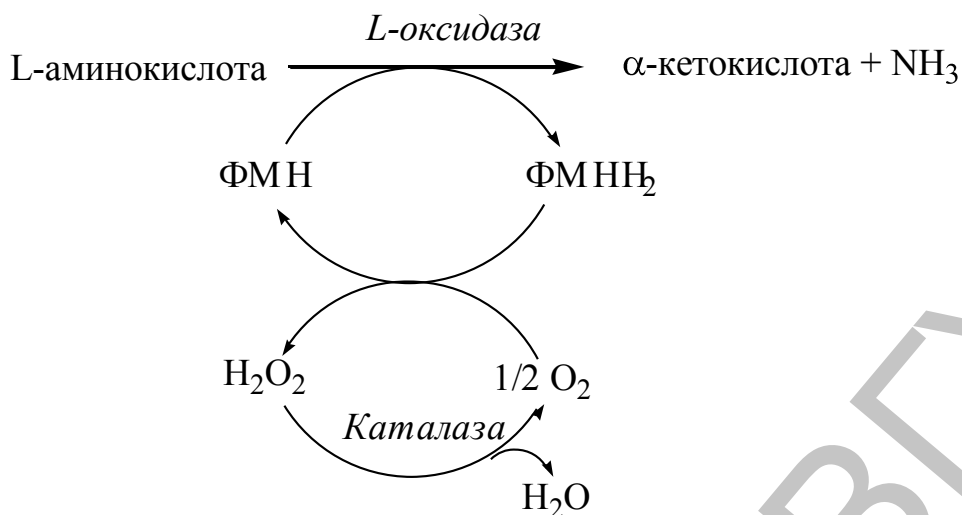
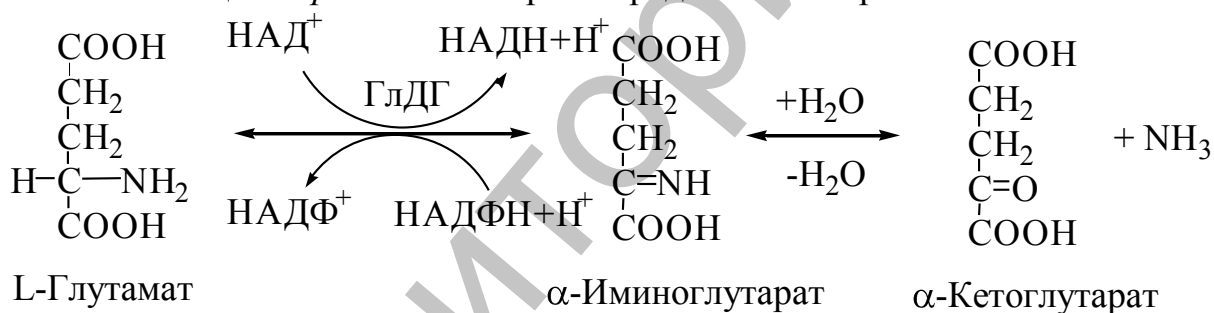


Рис. 11.2. Оксидаза L-аминокислот

В митохондриях клеток обнаружена высокоактивная оксидаза L-глутаминовой кислоты. Она имеет специальное наименование – *глутаматдегидрогеназа* (ГлДГ).

1. Коферментами этого фермента являются НАД^+ и НАДФ^+ .
2. Реакция *обратима* и широко представлена в различных клетках.



3. Фермент ГлДГ играет *ключевую роль во взаимосвязи метаболизма* аминокислот и общего пути катаболизма. Это олигомерный фермент с мол. Массой 312000 Да, состоящий из 6 субъединиц по 52000 Да каждая. Фермент активен в виде мультимера.

4. Активаторы – *АДФ, ГДФ*; ингибиторы – *АТФ, ГТФ, НАДФ* *восстановленный, тироксин, эстрогены*. В присутствии ингибиторов фермент подвергается химической модификации, т.е. диссоциирует на субъединицы и теряет основную активность (хотя может катализировать дезаминирование других аминокислот, например, аланина).

Процесс синтеза L-глутамата из α-кетоглутарата и аммиака называется *восстановительным аминированием* (кофермент чаще НАДФН).

Непрямое дезаминирование аминокислот открыто А.Е.Браунштейном и Т.Эйлером (другое название процесса - *трансдезаминирование*). Процесс идет в два этапа: 1) в результате реакций трансаминирования аминные группы собираются в составе глутаминовой

кислоты; 2) глутамат поступает в митохондрии, где подвергается прямому дезаминированию в глутаматдегидрогеназной реакции:

Обратная последовательность реакций, при которой происходит синтез аминокислот из α -кетокислот (α -кетоглутарата) и аммиака был назван *трансреаминированием*.

11.6. Источники и пути обезвреживания аммиака в организме

В процессе эволюции сформировались различные типы азотистого обмена, которые классифицируются по основному конечному продукту: 1) *аммонотелический* тип, главный конечный продукт - аммиак (рыбы); 2) *урикотелический* тип, главный конечный продукт - мочевая кислота (рептилии, птицы); 3) *уреотелический* тип, главный конечный продукт - мочевина (млекопитающие).

Подсчитано, что в состоянии азотистого равновесия организм здорового взрослого человека потребляет и выделяет около 15 г азота в сутки. Из экскретируемого с мочой количества азота на долю мочевины приходится 85%, креатинина 5%, аммонийных солей 3-6%, мочевой кислоты 1% и другие формы 3-6%. В образовании мочевины и аммонийных солей главную роль играет аммиак.

Основные источники аммиака

- 1) поступление аммиака из кишечника в портальную вену;
- 2) трансдезаминирование аминокислот;
- 3) дезаминирование биогенных аминов, пуриновых и пиримидиновых оснований;
- 4) дезамидирование глутамина и аспарагина;
- 5) окислительное дезаминирование аминокислот.

Функции аммиака: аммиак вовлекается (непосредственно или через глутамин) в синтез многих компонентов организма: заменимые аминокислоты, пурины, пиримидины, аминоксахара и т.д.

Токсичность аммиака. Несмотря на постоянную продукцию NH_3 в различных тканях, его концентрация в кровотоке низкая (100-200 мкг/л). Это связано с тем, что в организме существуют эффективные механизмы транспорта и обезвреживания аммиака.

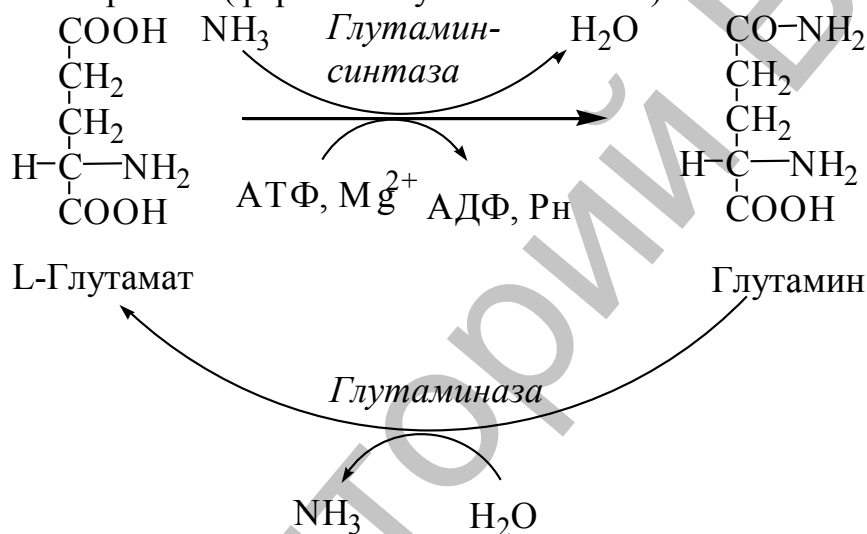
Аммиак токсичен. Он всасывается из кишечника в портальную венозную кровь, где уровень его намного выше, чем в общем кровотоке. В норме печень быстро захватывает аммиак из портальной крови и кровь, покидающая печень, практически свободна от аммиака. Одной из главных причин токсичности аммиака на молекулярном уровне является его способность восстановительно аминировать α -кетоглутарат в глутамат. В результате α -кетоглутаровая кислота отвлекается из цикла трикарбоновых кислот. Это может привести: 1) к замедлению регенерации ЩУК и, как следствие, к накоплению ацетил-КоА и через него к кетонемии и ацидозу; 2) к ослаблению потока протонов и электронов в митохондриальные

дыхательные цепи и снижению продукции АТФ. Поэтому в организме есть системы обезвреживания аммиака, в результате функционирования которых в крови поддерживается низкая концентрация аммиака (около 0,05 ммоль/л, что в тысячу раз меньше концентрации глюкозы). Условно выделяют местные (временное связывание) и общие (конечное обезвреживание) механизмы обезвреживания аммиака.

Местное обезвреживание аммиака

Осуществляется в тканях (мозг, сетчатка, мышцы, печень, почки и др.), продуцирующих аммиак, тремя путями:

1) Основной путь - это связывание аммиака с глутаминовой и реже аспарагиновой кислотами с образованием соответствующих амидов - глутамина и аспарагина (фермент глутаминсинтаза).



2) Амидирование остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот в составе белков.

3) Восстановительное аминирование α -кетоглутарата в глутамат. Глутамат в реакциях трансаминирования с пируватом образует аланин (особенно в мышцах). Глутамин и аланин являются резервными и транспортными формами аммиака. Итак, общая схема местного обезвреживания аммиака (рис. 11.3):

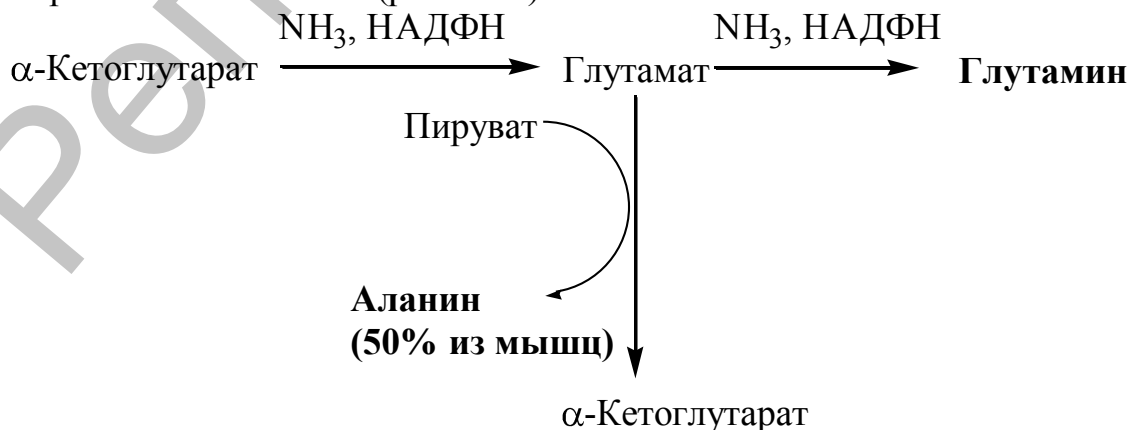


Рис. 11.3. Транспортные формы аммиака

Следовые количества аммиака присутствуют в сыворотке крови в виде ионов аммония. Транспортные формы аммиака - глутамин и аланин - выполняют две основные функции. *Глутамин* является донором амидной группы для биосинтезов пуриновых азотистых оснований, карбамоилфосфата, глюкозамина, триптофана и др. соединений в тканях с выраженной пролиферативной активностью (кишечник, опухоли и др.), а также является основным источником амидной группы для конечного обезвреживания аммиака в почках в виде аммонийных солей. *Аланин* транспортирует аммиак в виде аминной группы в печень, где используется для синтеза мочевины, а оставшийся углеродный скелет служит для образования глюкозы в реакциях глюконеогенеза. Описан глюкозо-аланиновый цикл в системе мышца-печень (в мышцах освобождается около 50% от общего пула свободных аминокислот, а печень выделяет около 85% от выводимого азота в виде мочевины). На схеме представлены глюкозо-лактатный и глюкозо-аланиновый циклы (рис. 11.4).



Рис. 11.4. Глюкозо-лактатный и глюкозо-аланиновый циклы

Общее (конечное) обезвреживание аммиака включает два процесса: образование *аммонийных солей в почках и мочевины в печени*.

Образование и выведение аммонийных солей

В тканях, преимущественно в почках, есть фермент *глутаминаза*, который катализирует освобождение аммиака из глутамина. Фермент активируется в присутствии протонов. $\text{Глутамин} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Глутамат} + \text{NH}_3$. Аммиак удаляется с мочой в виде *ионов аммония*: $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$; соединение с анионами щавелевой, фосфорной, мочевой и др. кислот ведет к образованию солей - оксалатов, фосфатов, уратов и т.п. В сутки с мочой выделяется около 1,2 г аммонийных солей. Это позволяет выводить из организма не только аммиак, но и протоны, образующиеся в метаболизме. Поэтому выведение солей аммония является важным механизмом регуляции кислотно-основного равновесия, при котором нейтрализация

неорганических и органических анионов катионами аммония сберегает важные для организма катионы калия, натрия, магния и др.

Биосинтез мочевины

Основным механизмом обезвреживания аммиака является синтез мочевины в печени. Из исследований школы И.П.Павлова следует, что мочевина синтезируется в печени, т.к. при выключении печени из кровотока (фистула Экка-Павлова) в крови растет фонд свободных аминокислот, аммиака и резко уменьшается содержание мочевины. М.В.Ненцкий и С.С.Салазкин доказали, что в печени происходит образование мочевины из аммиака и углекислоты. Г.Кребс и К.Гензелейт (1932) показали, что инкубация срезов печени с различными аминокислотами дает малый выход мочевины. Однако, если добавить одну из трех аминокислот - орнитин, цитруллин и аргинин - выход мочевины резко возрастает. При этом другие аминокислоты также становятся предшественниками мочевины. На основании этих данных Г.Кребс создал первый в биохимии метаболический цикл мочевинообразования. Г.Коеи и С. Ратнер выяснили, что начальной реакцией этого цикла является синтез карбамоилфосфата.

Из мышц и других тканей аммиак доставляется в печень в виде *аланина* и *глутамин*. Из кишечника по воротной вене поступает всосавшийся аммиак. В митохондриях гепатоцитов в реакциях трансдезаминирования освобождается аммиак. Аммиак включается в метаболизм двумя путями.

1. В *цитозоле гепатоцитов* и других клеток имеется глутаминзависимая карбамоилфосфатсинтетаза (КФ 6.3.5.5.): $L\text{-Глн-NH}_2 + \text{CO}_2 + \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{карбамоилфосфат} + L\text{-Глу} + \text{АДФ}$. Этот карбамоилфосфат используется при синтезе *пиримидиновых азотистых оснований*.

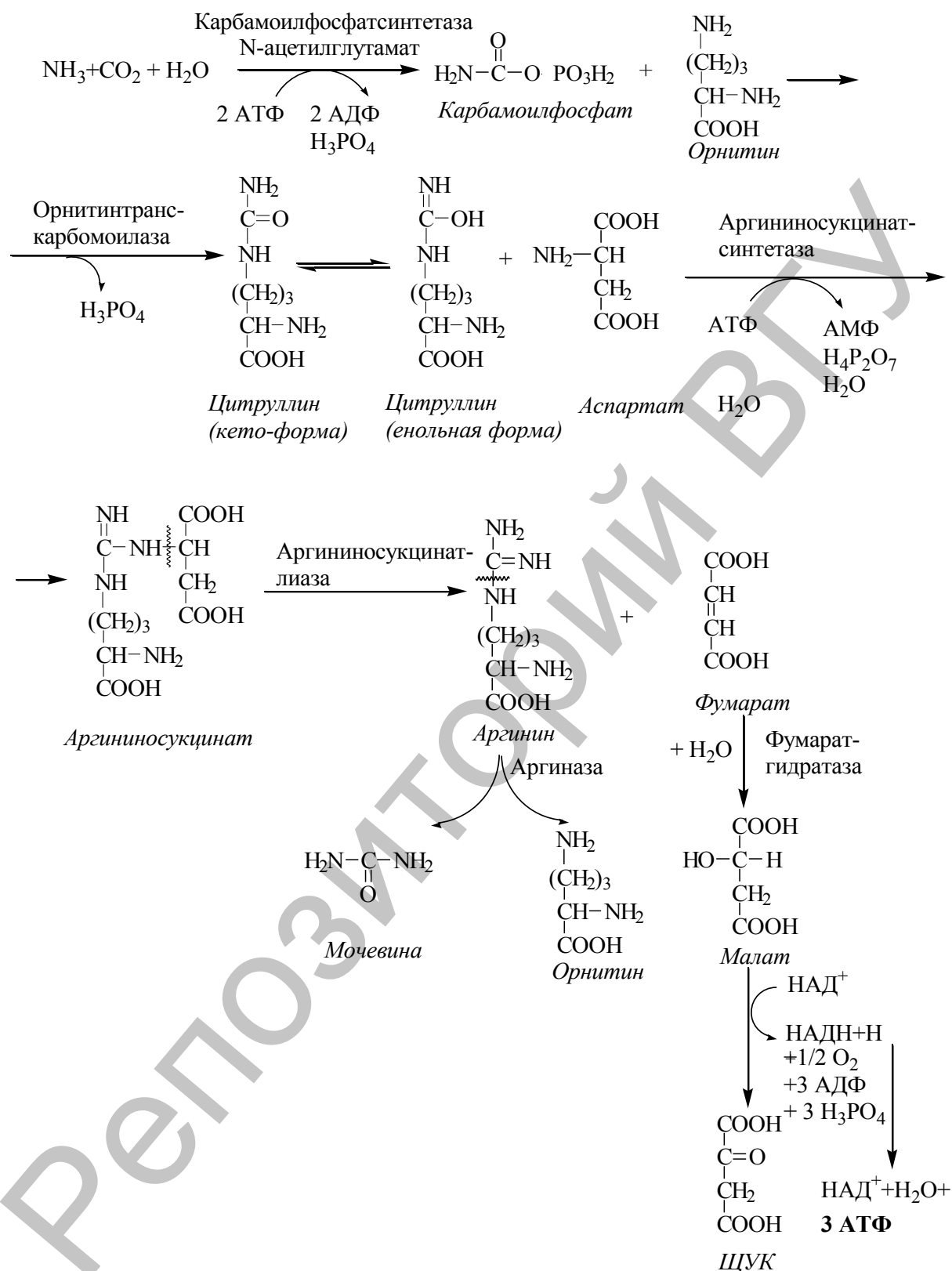
2. В *митохондриях гепатоцитов* аммиак конденсируется с углекислотой, также образуя карбамоилфосфат, фермент - аммиакзависимая *карбамоилфосфатсинтетаза* (КФ 6.3.4.16.). При этом расходуется две молекулы АТФ и требуется специфический активатор - N-ацетилглутамат: $\text{NH}_2 + \text{CO}_2 + 2\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{карбамоилфосфат} + 2 \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$. Это первая реакция синтеза мочевины.

3. Карбамоилфосфат взаимодействует с орнитином (фермент *орнитинтранскарбамоилаза*) с образованием цитруллина.

4. Енольная форма цитруллина при участии *аргининсукцинатсинтетазы* (третий фермент цикла) взаимодействует с аспарагиновой кислотой; процесс требует затраты одной молекулы АТФ.

5. *Аргининсукцинатлиаза* (четвертый фермент) катализирует распад аргининянтарной кислоты на аргинин и фумарат:

6. *Аргиназа* (пятый фермент) расщепляет аргинин на мочевину и орнитин. Аргиназа обнаружена только в печени, в то время как остальные ферменты присутствуют в других тканях. Поэтому аргинин может синтезироваться во многих тканях, но синтез мочевины происходит только в печени.



Регуляция синтеза мочевины: карбамоилфосфатсинтетаза является ключевым ферментом и определяет скорость всего процесса. Аллостерически активируется *N*-ацетилглутаматом, который синтезируется из глутамата и ацетил-КоА. Скорость синтеза мочевины коррелирует с концентрацией *N*-ацетилглутамата. Высокое содержание

белков в пище повышает уровень N-ацетилглутамата в печени и ускоряет синтез мочевины.

Мочевина простой диффузией по градиенту концентрации выходит из клеток в кровь и выделяется с *мочой* (около 30 г в сутки). Небольшое количество мочевины поступает в кишечник, где распадается до CO_2 и H_2O под действием фермента *уреазы*.

Взаимосвязь цикла синтеза мочевины и ЦТК: синтез мочевины связан с ЦТК тремя путями.

1. *Фумарат* является общим метаболитом цикла мочевины и цикла трикарбоновых кислот. При превращениях в цикле трикарбоновых кислот фумарат превращается в малат и затем в оксалоацетат (ЩУК). ЩУК подвергается трансаминированию с образованием аспартата, который вступает в цикл синтеза мочевины. ЩУК является важным метаболитом, участвующим в ЦТК и глюконеогенезе.

2. При окислении малата до ЩУК образуется 3 молекулы АТФ, которые используются для синтеза мочевины.

3. CO_2 , образующийся в ЦТК используется для синтеза мочевины

Происхождение атомов азота в молекуле мочевины: один атом азота поступает из кишечника или периферических тканей и включается через карбамоилфосфат; второй атом азота поступает в цикл мочевины в составе аспартата, а аспартат, в свою очередь, получает атом азота при трансаминировании глутамата с ЩУК. Как известно, атом азота аминогруппы глутамата происходит из аминогрупп аминокислот печени. Поэтому второй атом азота мочевины поступает из фонда аминокислот печени.

В клинко-лабораторной практике оценивают содержание небелковых азотсодержащих компонентов, называемых *остаточным азотом*. В норме остаточный азот составляет 15-25 ммоль/л и включает азот мочевины (50%), аминокислот (25%), мочевой кислоты (4%), креатина (5%), креатинина (0,5%), аммиака и индикана (0,5%).

11.7. Биологическая фиксация молекулярного азота

Важное место в биосинтезе азотсодержащих органических соединений занимают процессы, приводящие к включению к их состав азота. Первичным источником органических соединений служит атмосферный азот, составляющий по объему 78% атмосферы. Метаболизм азота в биосфере начинается с восстановления его до аммиака, т.е. с биологической фиксации азота.

Способностью к восстановлению атмосферного азота обладают азотфиксирующие бактерии. К числу таких организмов относятся некоторые виды гетеротрофных бактерий как аэробных рода *Azotobacter*, так и анаэробных рода *Clostridium*, фотосинтезирующие бактерии рода *Rhodospirillum*, некоторые водоросли и, наконец, симбиотические системы, состоящие из бактерий рода *Rhizobium* и некоторых растений, в основном представителей семейства бобовых. В последнем случае ни бактерии, обитающие в корневых клубеньках растения, ни само растение не обладают способностью фиксировать азот, и только их симбиоз приводит к

возникновению весьма эффективной и важной «кооперативной» системы фиксации азота.

Первый этап – фиксация атмосферного азота азотфиксирующими организмами является первым этапом цикла азота в природе.

Второй этап – нитрификация аммиака, осуществляемая почвенными микроорганизмами, которые способны использовать NH_3 в качестве источника энергии, окисляя его до NO_2^- до NO_3^- . Важную роль как форма хранения азота в почве играет NO_3^- .

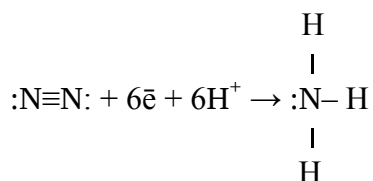
Третий этап – восстановлении нитратов растениями и многими микроорганизмами вновь до аммиака при помощи фермента нитроредуктазы.

Четвертый этап – использование аммиака растениями, животными для синтеза аминокислот и построения своих белков.

Аминокислоты, выделяющиеся при распаде белков, возвращаются в почву, а нитрофицирующие бактерии вновь превращают их в NO_2^- и NO_3^- . Другие виды микроорганизмов осуществляют процесс денитрификации, превращая NO_2^- в молекулярный азот, который возвращается в атмосферу.

Молекулярные механизмы фиксации азота

Энергия связи $\text{N}\equiv\text{N}$ составляет 940 кДж/моль, т.е. она весьма устойчива к химическим воздействиям, недаром азот в переводе означает безжизненный. Ферментативная система, катализирующая реакцию фиксации N_2 , называется нитрогеназой:



Таким образом, для фиксации N_2 необходимы сильные восстановители (поток электронов), а также АТФ и Mg^{2+} . Природа доноров электронов различная у разных микроорганизмов. У аэробных бактерий (*Azotobacter*, *Rhizobium*) необходимые для фиксации N_2 восстановители и АТФ образуются в ходе углеводного обмена в реакциях с участием НАДФ. Фотосинтетические бактерии и сине-зеленые водоросли способны к фотохимическому образованию сильных восстановителей.

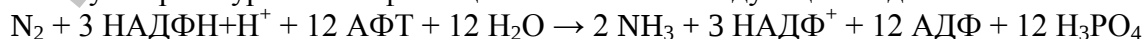
Нитрогеназный комплекс состоит из белковых компонентов двух типов.

1. Молибдоферредоксин (Мо-Fe-протеин), или собственно нитрогеназа, содержащая четыре идентичные субъединицы, в каждую из которых входит два атома молибдена, негеминовое железо, лабильный сульфид; молекулярная масса тетрамера ~200 кДа;

2. Редуктазный компонент (Fe-белок), или азоферредоксин, имеет молекулярную массу от 50 до 70 кДа, димер также содержит негеминовое железо и лабильный дисульфид.

Таким образом, оба компонента представляют собой железопротеины (Fe-S-белки), в которых железо связано с атомом серы остатка цистеина и неорганическим сульфидом.

Суммарное уравнение фиксации азота имеет следующий вид:



Как было отмечено выше, для превращения $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$ под действием нитрогеназного комплекса необходимы мощные восстановители (первичный донор электронов $\text{НАДФН} + \text{H}^+$) и АТФ. У большинства азотфиксирующих организмов непосредственно источником электронов с высоким потенциалом для этой шестиэлектронной реакции служит ферредоксин (железопротеин типа $\text{Fe}_4\text{-S}_4$,

молекулярная масса ~10 кДа), который восстанавливается НАДФН и переносит свои электроны на азоферредоксин (редуктазный компонент). Реакция катализируется флавоδοксином (ФМН-содержащий фермент).

Ниже приведена возможная последовательность реакций фиксации молекулярного азота.

1. Восстановленный ферредоксин передает электроны редуктазному комплексу (компонент 2). Катализатором этой реакции является флаводоксин.

2. АТФ связывается с редуктазой, происходит изменение ее конформации, приводящее к увеличению восстановительной способности (окислительно-восстановительный потенциал снижается с -0,29 до 0,40 В), что делает редуктазу способной перенести электроны на нитрогеназный комплекс.

3. Происходит перенос электронов на компонент I, происходит гидролиз АТФ до АДФ и H_3PO_4 , и редуктаза отделяется от нитрогеназного компонента. Наконец, N_2 связывается с нитрогеназным компонентом и восстанавливается до NH_4^+ . Энергия, необходимая для этого процесса, обеспечивается гидролизом АТФ (рис. 11.5).



Рис. 11.5. Нитрогеназа

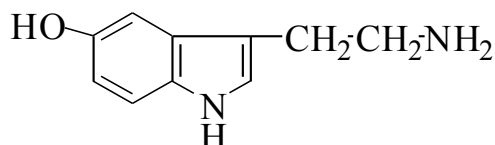
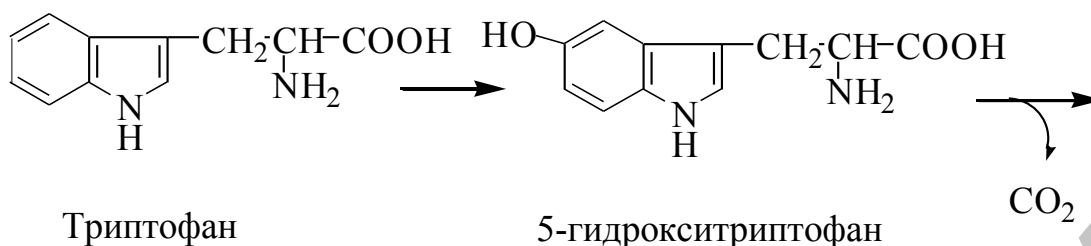
Следует отметить важную функцию молибдена в процессе азотфиксации. Он способствует формированию функционально активной конформации нитрогеназы, участвует в передаче электронов и связывании азота. Известно также, что молибден индуцирует синтез этого комплекса.

Ведутся поиски биологических методов, с помощью которых можно было бы сделать азот атмосферы более доступным для практических нужд. Большую часть биологически значимого азота дают клубеньковые бактерии – ризобии в симбиозе с бобовыми растениями. Методами генной инженерии можно интенсифицировать азотфиксацию этих бактерий с целью создания более эффективных симбиотических азотфиксаторов.

11.8. Декарбоксилирование аминокислот

Отщепление карбоксильной группы аминокислот в виде CO_2 катализируется *декарбоксилазами*, кофактором которых является *пиридоксальфосфат*. Декарбоксилирование широко представлено в живой природе. Среди различных типов декарбоксилирования аминокислот для организма человека и животных наибольшее значение имеет α -декарбоксилирование, т.е. отщепление карбоксильной группы при α -углеродном атоме. В результате декарбоксилирования образуются *биогенные амины*. Специфичность фермента зависит от апофермента.

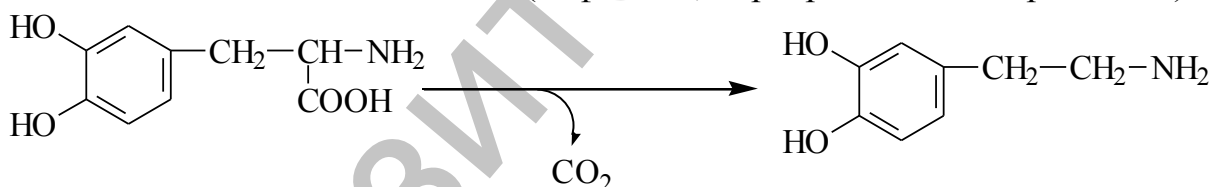
Биогенные амины обладают разнообразной биологической и фармакологической активностью.



Серотонин

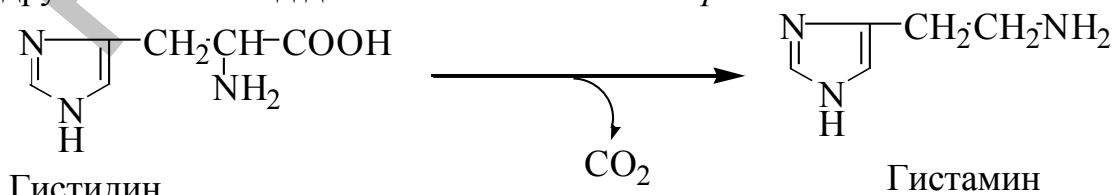
1. Не обладающая строгой субстратной специфичностью *декарбоксилаза ароматических аминокислот* катализирует декарбоксилирование L-изомеров триптофана, 5-гидрокситриптофана и 3,4-диоксифенилаланина. 5-Гидрокситриптамин, или *серотонин* обладает сосудосуживающим действием, регулирует ряд центральных вегетативных функций (температура тела, артериальное давление, дыхание), является медиатором ЦНС (часто тормозного типа), повышает неспецифическую резистентность организма. Накопление серотонина в центральной нервной системе обеспечивает зимнюю спячку ряда животных и определяет биохимический фон резистентности организма при беременности.

2. *Синтез катехоламинов* (дофамина, норадреналина и адреналина)



Дофамин является предшественником медиатора симпатической нервной системы *норадреналина* и гормона мозгового вещества надпочечников - *адреналина*, т.е. катехоламинов, обеспечивающих регуляцию функций сердечнососудистой системы, быструю реакцию метаболизма на действие стрессорных агентов. При недостатке дофамина в центральной нервной системе нарушается координация движений.

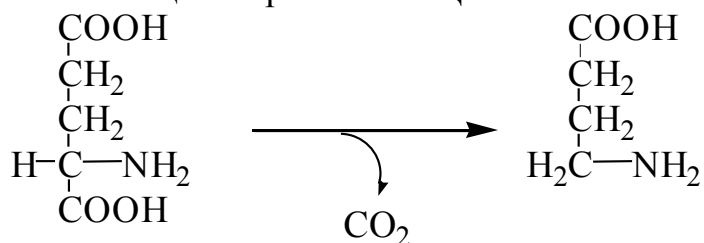
3. *Гистамин* образуется из гистидина в коже, слизистых и некоторых других тканях под действием *гистидиндекарбоксилазы*.



Гистамин – единственный биогенный амин, который в физиологических концентрациях расширяет кровеносные сосуды, обладает

провоспалительным действием, стимулирует секрецию HCl в желудке, участвует в иммунологических реакциях, является медиатором боли.

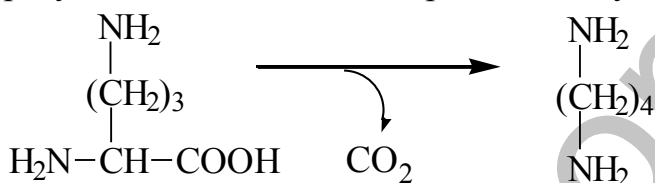
4. Высокоспецифичная *глутаматдекарбоксилаза* катализирует образование γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) из глутаминовой кислоты в сером веществе коры головного мозга. ГАМК является медиатором, вызывающим торможение ЦНС.



L-Глутамат

γ -Аминомасляная кислота

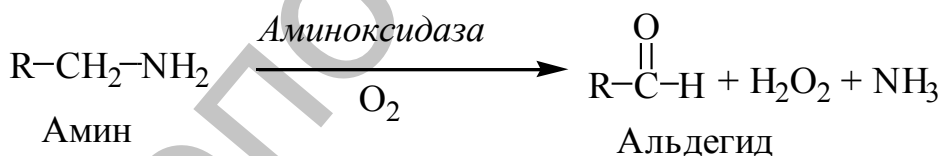
5. *Орнитиндекарбоксилаза* катализирует декарбоксилирование орнитина с образованием *путресцина*: орнитин $\rightarrow$ 1,4-тетраметилдиамин (путресцин) $\rightarrow$ спермидин $\rightarrow$ спермин. Полиамины (спермидин и спермин), а также путресцин участвуют в пролиферации клеток на уровне регуляции синтеза полимерных молекул (нуклеиновые кислоты, белки).



Орнитин

Путресцин

Обезвреживание биогенных аминов необходимо, поскольку в высоких дозах большинство из них обладают токсичным действием. Поэтому в тканях имеются ферментативные системы их обезвреживания путем окислительного дезаминирования с образованием альдегидов и аммиака.



Выделяют ФАД-содержащие аминоксидазы, или *моноаминоксидазы* - MAO и медьсодержащие аминоксидазы, или *диаминоксидазы* - DAO. Дезаминирование тирамина, норадреналина, адреналина, алифатических моноаминов катализируют MAO; окисление гистамина и алифатических диаминов с короткой цепью углеродных атомов (путресцин, кадаверин) катализируют DAO.

11.9. Превращение углеродного скелета аминокислот

В состав белков входят 20 аминокислот, которые различаются по строению радикалов. Во второй стадии катаболизма существует, как

минимум, двадцать наборов ферментов, катализирующих превращение этих радикалов. Из общего количества энергии, потребляемом организмом, на долю этих превращений приходится не более 10%.

Азот аминокислот, отщепляемый, как правило, на ранних стадиях катаболизма, включается в общий метаболический пул. В зависимости от потребностей организма он может реутилизироваться в анаболических процессах или включаться в конечный продукт обмена азота – мочевину и экскретироваться из организма.

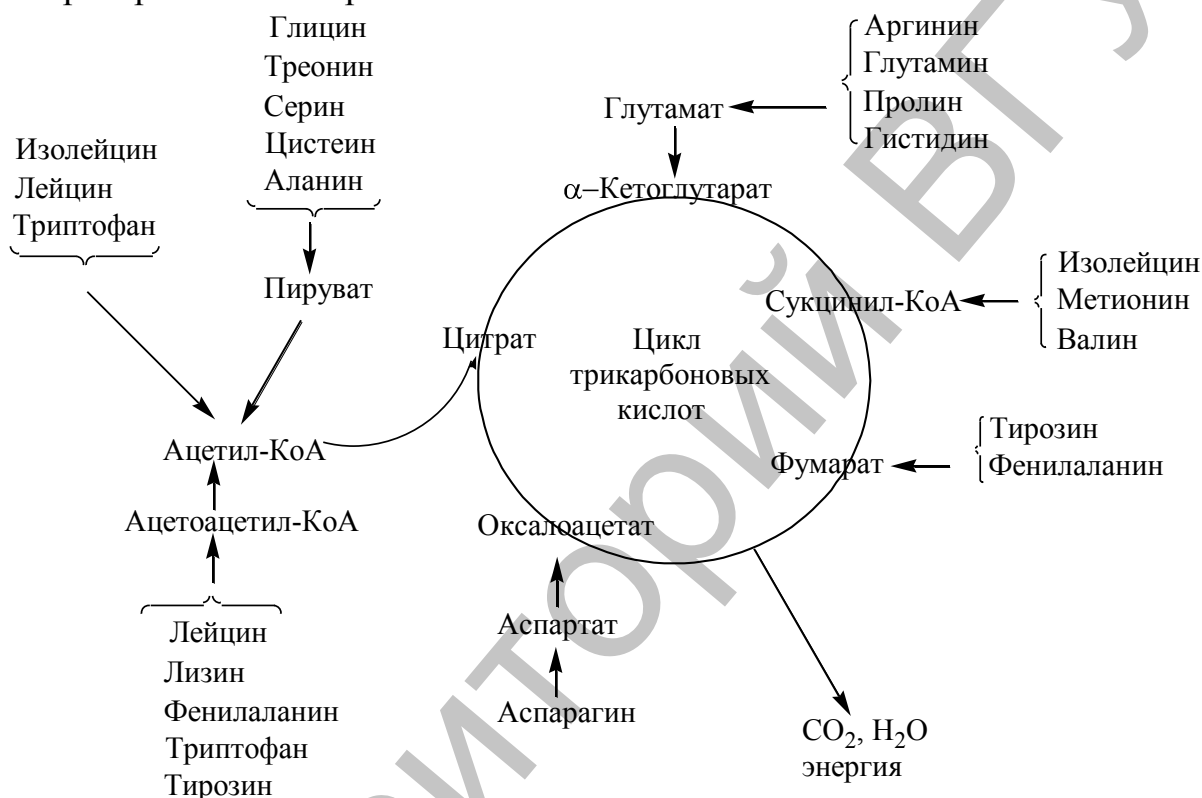


Рис. 11.6. Аминокислоты и общий путь катаболизма

Безазотистые углеродные остатки аминокислот образуют кислоты, чаще всего кетокислоты, которые далее деградируют по общим путям катаболизма других окисленных углеводов. Метаболиты, образующиеся из углеродных скелетов аминокислот, либо непосредственно включаются в цикл трикарбоновых кислот, либо превращаются в пируват и через ацетил-КоА деградируют до образования конечных продуктов – CO_2 и H_2O . В зависимости от потребностей организма безазотистые метаболиты могут включаться в синтез глюкозы (гликогенные аминокислоты) либо в синтез высших жирных кислот (кетогенные аминокислоты). К гликогенным относятся те аминокислоты, при катаболизме которых образуются непосредственные предшественники глюкозы, вовлекаемые в процесс глюконеогенеза – пируват, оксалоацетат, фосфоенолпируват (14 аминокислот), либо в жиры (аминокислота лейцин), либо и в жиры и углеводы (гликогенные и кетогенные, 5 аминокислот).

Таким образом, классификация аминокислот по признаку кетогенности или гликогенности достаточно условна, поскольку интермедиаты некоторых из них могут включаться как в синтез углеводов, так и жиров (рис. 11.6).

11.10. Метилирование и трансметилирование

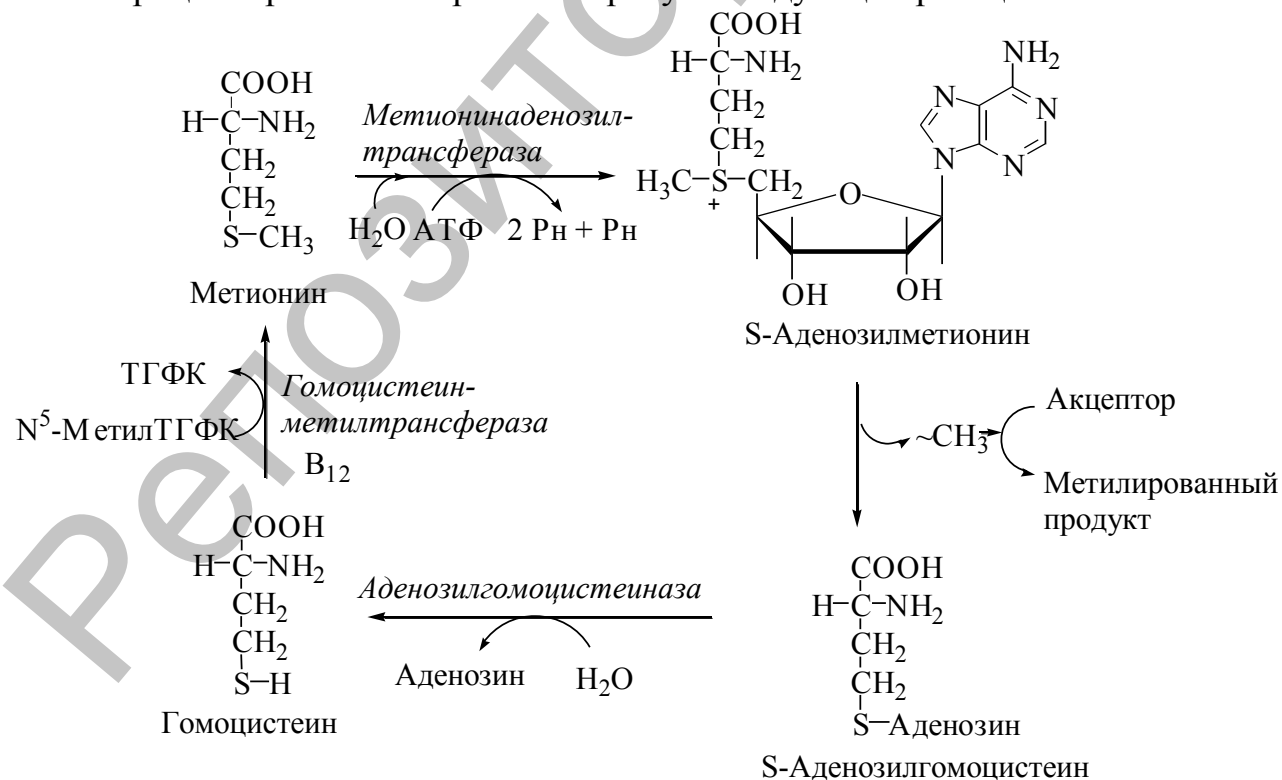
Введение метильной группы в молекулу называется метилированием. Перенос метильной группы с активного метионина на акцептор называется трансметилированием.

Значение метилирования

1. Синтез некоторых низкомолекулярных соединений (холин, адреналин, креатин, тимидиловые нуклеотиды и др.).
2. Инактивация биологически активных веществ (например, катехоламинов).
3. Созревание ДНК, всех видов РНК, ряда белков и предотвращение разрушения некоторых веществ в организме, например, белков.

Ферменты, участвующие в реакциях трансметилирования называются *метилтрансферазами*. Универсальным донором метильной группы является *S*-аденозилметионин. Переносчиком метильных групп является метилтетрагидрофолиевая кислота. Источниками метильной группы являются *холин* и *бетаин*.

Процесс трансметилирования требует следующих реакций.



1. *Активация метионина.* Синтез S-аденозилметионина происходит путем переноса аденозильной группы с АТФ на атом серы метионина. Реакция катализируется *метионин-S-аденозилтрансферазой*. Своеобразие данной реакции заключается в том, что CH_3 -группа метионина активируется под действием соседнего атома серы и поэтому S-аденозилметионин является высокореакционной молекулой из-за наличия положительного заряда.

2. *Метилирование субстрата.* S-аденозилметионин переносит метильную группу на акцептор и сам превращается в S-аденозилгомоцистеин. Выделение свободной энергии в этой реакции делает ее необратимой.

3. *Распад S-аденозилгомоцистеина на аденозин и гомоцистеин.*

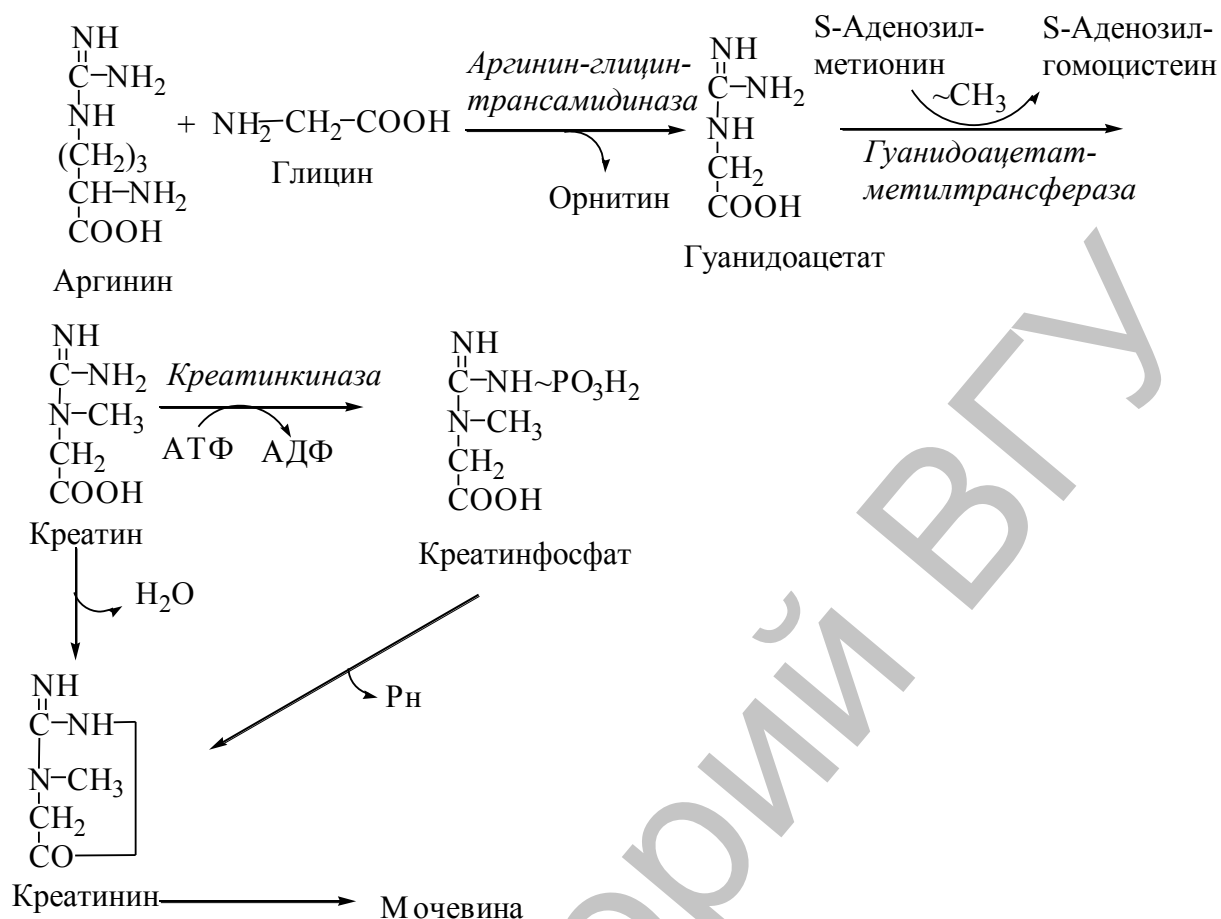
4. Гомоцистеин может быть метилирован в метионин с использованием N^5 -метилтетрагидрофолиевой кислоты и с участием метилкобаламина (B_{12}). Таким образом, метионин может быть регенерирован для повторного использования. Необходимо отметить, что это не синтез метионина в организме, т.к. метионин является незаменимой аминокислотой.

Наиболее важные реакции метилирования

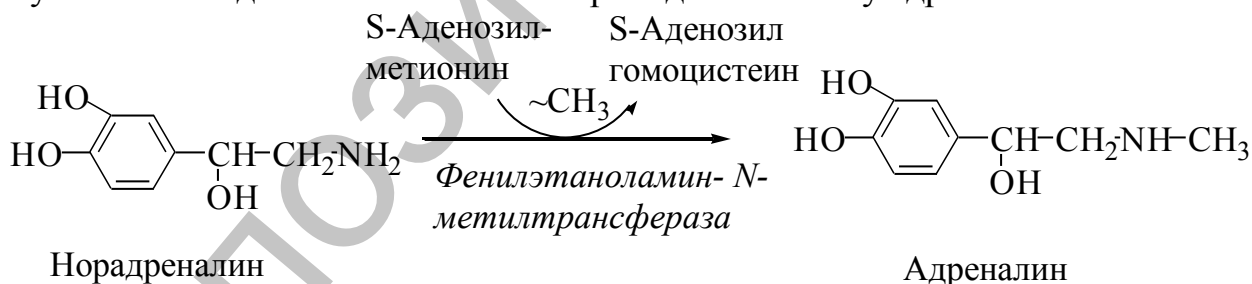
1. *Синтез креатина и креатинина.*

Креатин присутствует в тканях (мышцы, мозг, кровь и т.д.) в виде высоко энергетического вещества – креатинфосфата или свободного креатина. Для синтеза креатина необходимы три аминокислоты – глицин, аргинин и метионин.

Первая реакция происходит в почках и поджелудочной железе и включает перенос гуанидиновой группы аргинина на глицин. Фермент – *аргинин-глицин трансамидиназа*. Образуется гуанидоацетат. S-аденозилметионин является донором метильной группы и образуется креатин. В печени и поджелудочной железе креатин обратимо фосфорилируется в креатинфосфат ферментом *креатинкиназой*. Креатинин является ангидридом креатина. Образуется путем спонтанной циклизации креатина или креатинфосфата. Креатинин выводится с мочой. Оценка уровня креатинина сыворотки вместе с мочевиной является тестом на функцию почек.



2. Синтез адреналина. Происходит в мозговом веществе надпочечников из фенилаланина и тирозина. Метилирование норадреналина с участием S-аденозилметионина приводит к синтезу адреналина.



3. Синтез фосфатидилхолина.



4. Метилирование нуклеиновых кислот. В клетках печени и других органов есть фермент полунуклеотидметилтрансфераза, который

катализирует метилирование оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. Метилированные основания служат маркерами специфических участков полинуклеотидных цепей и защищает ДНК от воздействия ферментов.

5. *Метилирование чужеродных соединений.* В тканях человека, особенно в печени, происходит метилирование чужеродных и лекарственных соединений с образованием N-,O- и S-метиловых конъюгатов. При этом изменяется биологическая активность.

11.11. Метаболизм фенилаланина и тирозина

Фенилаланин и тирозин являются ароматическими аминокислотами. Фенилаланин является незаменимой аминокислотой, поскольку ткани животных не обладают способностью синтеза его бензольного кольца. Тирозин полностью заменим при достаточном поступлении фенилаланина с пищей.

Основное количество фенилаланина метаболизируется через тирозин. Тирозин используется для биосинтеза белков и необходим для образования биологически активных веществ – *адреналина, норадреналина, дофамина, тиреоидных гормонов и пигмента меланина*. В процессе метаболизма фенилаланин и тирозин превращаются в метаболиты, которые являются предшественниками для синтеза глюкозы и жиров. Таким образом, эти аминокислоты относятся к кетогенным и гликогенным.

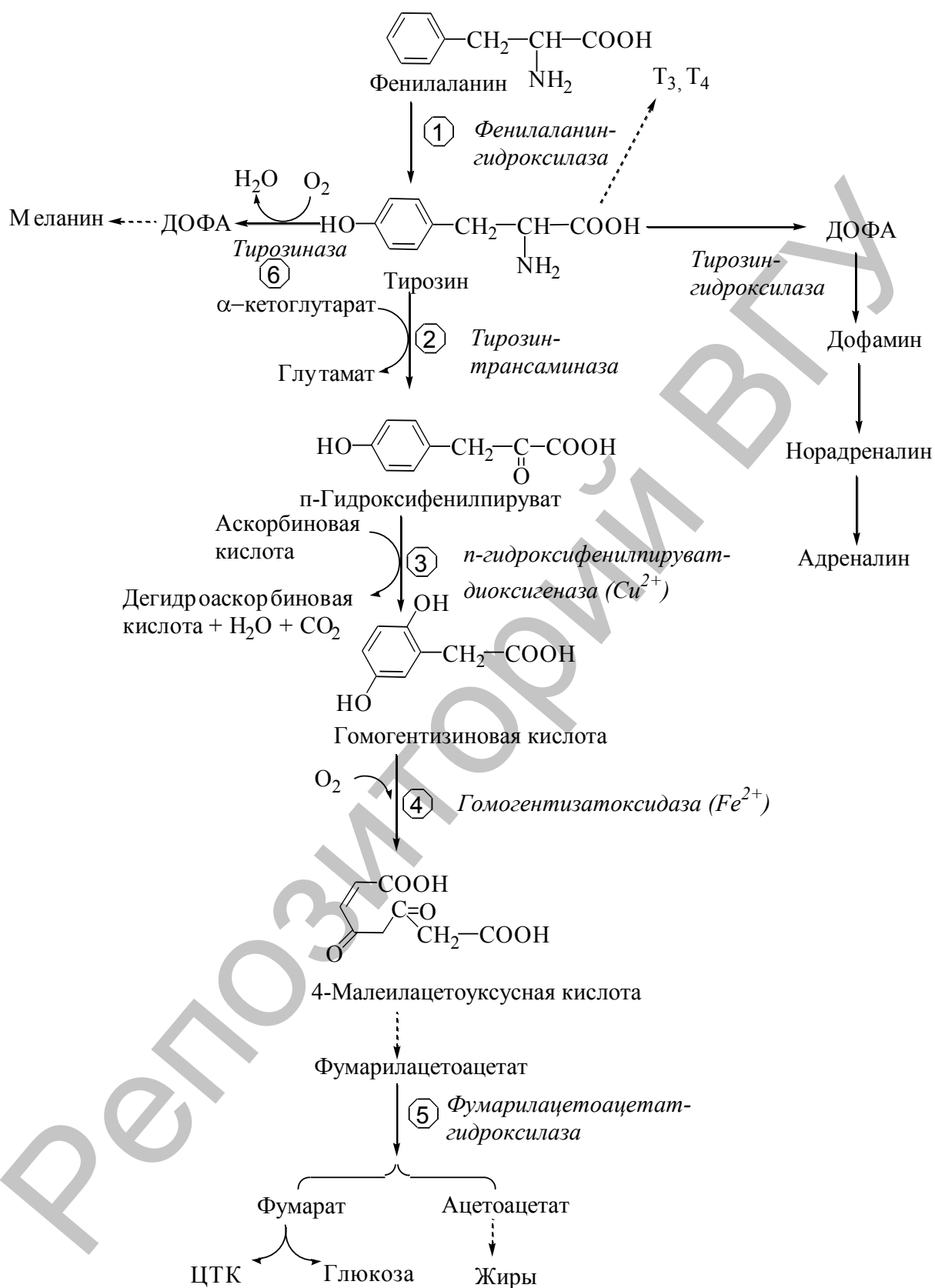
Изучение метаболизма этих аминокислот важно по 2-м причинам: 1) в процессе метаболизма происходит синтез биологически активных веществ и 2) в результате дефектов ферментов обмена этих аминокислот развиваются метаболические нарушения.

У здорового человека почти весь фенилаланин, который не был использован для синтеза белков превращается в печени в тирозин. Фенилаланин гидроксилируется в пара-положении ферментом *фенилаланин гидроксилазой*, который является микросомальной оксигеназой со смешанной функцией и включает один атом молекулярного кислорода в пара-положение фенилаланина, а второй атом кислорода восстанавливается в воду.

Далее метаболизм фенилаланина и тирозина происходит вместе.

1. Тирозин подвергается трансаминированию с образованием *p*-гидроксифенилпирувата. Реакция катализируется *тирозинтрансаминазой*.

2. *p*-Гидроксифенилаланинпируват гидроксилаза (диоксигеназа) является медь-содержащим ферментом и катализирует декарбоксилирование и гидроксилирование фенильного кольца *p*-гидроксифенилпирувата с образованием гомогентизата. Эта стадия требует аскорбиновой кислоты.



3. *Гомогентизатоксидаза* (Fe-содержащий фермент) расщепляет гомогентизат и через ряд промежуточных стадий образуется фумарат и ацетоацетат. Фумарат является промежуточным продуктом ЦТК и может

использоваться как предшественник глюконеогенеза. Ацетоацетат является кетоновым телом.

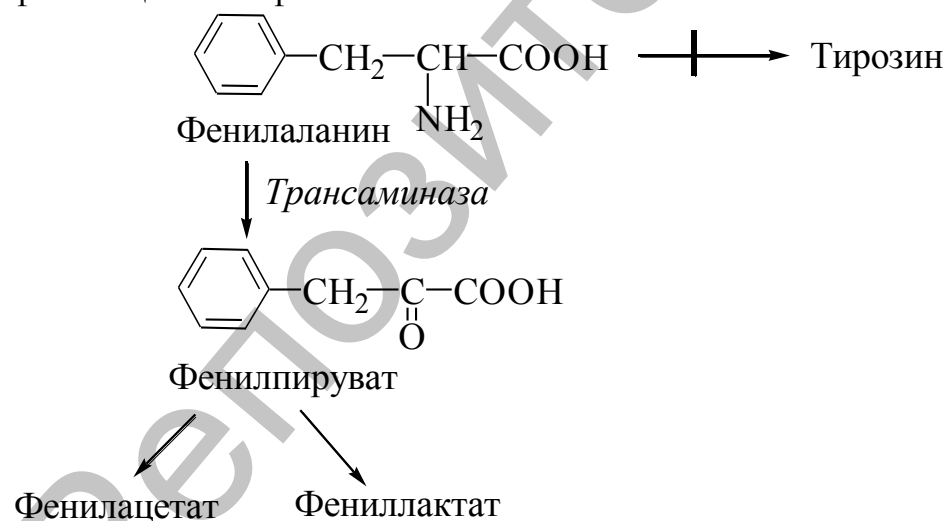
4. *Синтез меланина* происходит в меланосомах, которые присутствуют в меланоцитах – пигмент-продуцирующих клетках кожи, радужки глаза, волосах. Тирозиназа (Cu-содержащая оксигеназа) гидроксилирует тирозин с образованием 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА). ДОФА через несколько промежуточных стадий превращается в меланин. Цвет кожи определяется соотношением черного и красного меланина. Это зависит от многих факторов, в частности, генетических и окружающей среды.

5. *Биосинтез тироидных гормонов*. Тироидные гормоны – тироксин и трийодтиронин – синтезируются из тирозиновых остатков белка тироглобулина и процесс активируется йодом.

6. *Биосинтез катехоламинов*. Тирозин гидроксилируется в п-гидроксифенилаланин (ДОФА) ферментом тирозингидроксилазой. ДОФА подвергается декарбоксилированию с образованием норадреналина. Метилирование норадреналина с участием S-аденозилметионина приводит к синтезу адреналина.

Нарушение обмена фенилаланина (тирозина)

1. Дефект гена фенилаланин гидроксилазы, встречается 1:10000 новорожденных. В результате фенилаланин превращается по альтернативному пути, который приводит к накоплению фенилпирувата, фенилацетата и фениллактата.



Все метаболиты экскретируются с мочой в большом количестве. Заболевание называют *фенилпировиноградная олигофрения*. Нелеченные больные характеризуются умственной отсталостью. Половина больных умирает до 20 лет. При выявлении дефекта назначается диета с низким содержанием фенилаланина. Ранняя диагностика и диета в первые 4-5 лет жизни предотвращает повреждение мозга.

2. *Алкантонурия*. Аутосомно-рецессивное заболевание с частотой 1:25000. Дефективным ферментом является *гомогентизатоксидаза*.

Гомогентизат накапливается в тканях и крови и экскретируется с мочой. Гомогентизат окисляется оксидазой до бензохинона ацетата, который подвергается полимеризации с образованием темного пигмента алкаптона. Алкаптон накапливается в соединительной ткани, костях и различных органах, приводя к охронозу. Изменяется цвет мочи на коричневый или черный. Моча дает положительный тест с хлоридом железа и нитратом серебра. Заболевание не является опасным для жизни заболеванием и поэтому не требует специального лечения.

3. *Альбинизм* развивается в результате нарушения синтеза пигмента меланина. Аутосомно-рецессивное заболевание с частотой 1:20000. Причиной альбинизма является дефект *тирозины*. Наиболее важной функцией меланина является защита кожи от солнечной радиации. Потеря меланина у альбиносов делает их кожу чувствительной к солнечным лучам, что повышает риск развития рака кожи. Фотофобия (боязнь солнечного света) обусловлена отсутствием пигмента в сетчатке, хотя это не нарушает зрения у альбиносов.

4. При дефекте *пара-гидроксифенилпируват-гидроксилазы* накапливается тирозин. Заболевание называется тирозиноз. У детей обнаруживается отставание в развитии.

Белковая недостаточность. Развивается при полном и частичном голодании и при приеме однообразного белкового питания. При преобладании белков растительного происхождения, биологическая ценность которых ниже, развивается отрицательный азотистый баланс, нарушение коллоидно-осмотического и водно-солевого баланса. При тяжелых формах пищевых дистрофий, например, при квашиоркоре наблюдаются тяжелые поражения печени, остановка роста, снижение неспецифической резистентности организма.

11.12. Обмен нуклеотидов

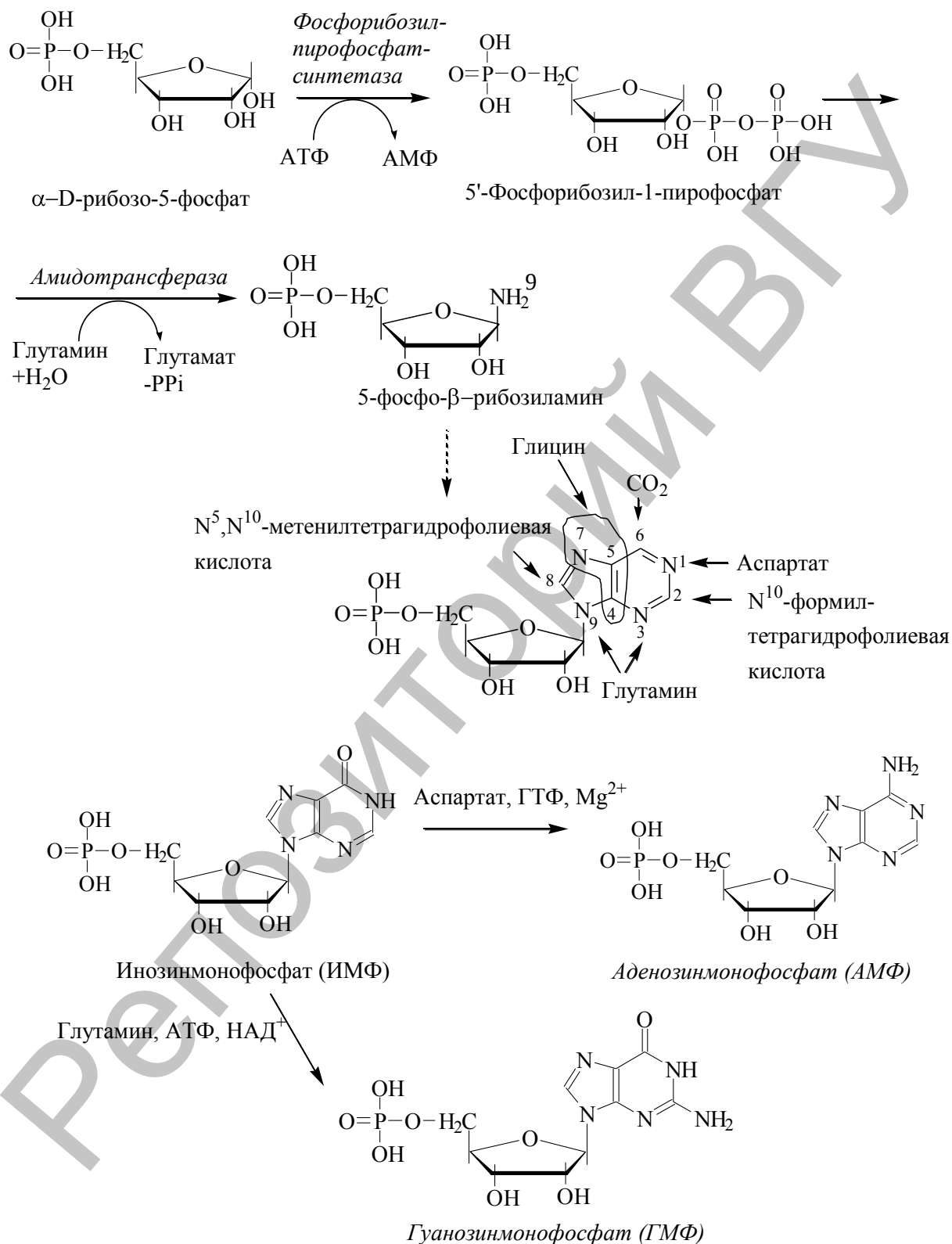
Пуриновые азотистые основания, образующиеся в процессе переваривания нуклеиновых кислот в кишечнике, в дальнейшем *практически не используются*. Поэтому их синтез осуществляется *de novo* из *низкомолекулярных предшественников*, продуктов обмена углеводов и белков.

1. Для биосинтеза пуринового кольца необходимы следующие предшественники: N_1 образуется из *аспартата*; C_2 – из углерода N^{10} -*формил-ТГФК*; N_3 и N_9 происходят из амидной группы *глутамина*; C_4 , C_5 и N_7 – из *глицина*; C_6 – из CO_2 ; C_8 – N^5, N^{10} -*метенил-ТГФК*.

2. Основное место синтеза – *печень*. В *эритроцитах, лейкоцитах и мозгу* синтез не происходит.

3. Синтез пуриновых нуклеотидов начинается с промежуточного продукта пентозофосфатного пути – *рибозо-5-фосфата*, на который

переносится пирогосфатная группа АТФ (схема). Фермент – фосфорибозилпирогосфатсинтетаза.



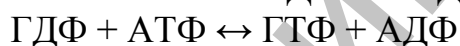
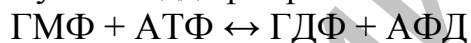
4. Образовавшийся 5-фосфорибозил-1-пирогосфат (ФРПФ) под действием **амидотрансферазы** взаимодействует с **глутамином**, который является донором NH₂-группы и образуется **β -5-фосфорибозиламин**. При

этой реакции происходит освобождение пироглутамата, глутаминовой кислоты и изменение конфигурации из α - в β -. Эта стадия является *ключевой* в синтезе пуринов.

5. Через ряд промежуточных соединений происходит синтез всего пуринового скелета и образуется первый нуклеотид – *инозинмонофосфат* (инозиновая кислота, ИМФ), которая является предшественником пуриновых нуклеотидов.

6. Синтез АМФ и ГМФ осуществляется из ИМФ. Для синтеза ГМФ необходимы НАД^+ , АТФ, *глутамин* и ферменты – ИМФ-дегидрогеназа и ГМФ-синтетаза. В ферментативном синтезе АМФ из ИМФ принимает участие *аспарагиновая кислота*, являющаяся донором NH_2 -группы, ГТФ в качестве источника энергии и ферменты аденилосукцинатсинтетаза и аденилосукцинатлиаза.

Превращение АМФ и ГМФ в соответствующие нуклеозидди- и трифосфаты протекает в две стадии при участии специфических нуклеозидмонофосфат – и нуклеозиддифосфаткиназ:



Регуляция осуществляется по механизму обратной связи:

1. Синтез пуриновых нуклеотидов тормозится *конечными продуктами* по принципу обратной связи путем ингибирования амидотрансферазной реакции.

2. Избыток ГМФ в клетках *аллостерически* тормозит синтез ГМФ и не влияет на синтез АМФ и, наоборот, накопление АМФ ингибирует синтез АМФ и не ингибирует синтез ГМФ.

Ингибиторы синтеза пуриновых нуклеотидов: фолиевая кислота необходима для синтеза пуриновых нуклеотидов. *Сульфаниламидные препараты* являются структурными аналогами парааминобензойной кислоты и ингибируют ее синтез у микроорганизмов. Сульфаниламиды не действуют на организм человека, поскольку фолиевая кислота не синтезируется у человека, а поступает с пищей.

Особенностью синтеза ***пиримидиновых нуклеотидов*** является то, что вначале происходит синтез *пиримидинового основания*, а затем остаток рибозы присоединяется к уже сформировавшемуся пиримидиновому кольцу.

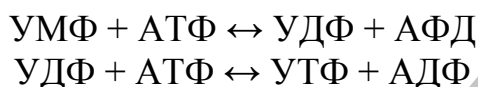
1. Из глутамина, CO_2 и АТФ под действием фермента *карбамоилфосфатсинтетазы* в цитозоле клеток синтезируется карбамоилфосфат (схема).

2. Карбамоилфосфат взаимодействует с аспартатом и образуется *N-карбамоиласпарагиновая кислота*. Фермент – *аспартаттранскарбамоилаза*.

3. N-карбамоиласпарагиновая кислота подвергается циклизации с отщеплением молекулы воды и дегидрированию. Синтезируется *оротовая кислота*.

4. Оротовая кислота реагирует с ФРПФ с образованием оротидин-5'-фосфата (ОМФ). Декарбоксилирование последнего приводит к образованию пиримидинового нуклеотида – УМФ.

5. Превращение УМФ в УДФ и УТФ осуществляется, как и в случае пуриновых нуклеотидов, путем фосфорилирования:



6. Предшественником цитидиловых нуклеотидов является УТФ, который превращается в ЦТФ с участием фермента ЦТФ-синтетаза, АФТ, Mg^{2+} и глутамина.

7. Тимидиловые нуклеотиды входят в ДНК и содержат дезоксирибозу. Поэтому вначале происходит восстановление рибонуклеотидов у 2'-го атома углерода с использованием в качестве источника атомов водорода восстановленного термостабильного белка тиоредоксина, содержащего 2 свободные SH-группы.

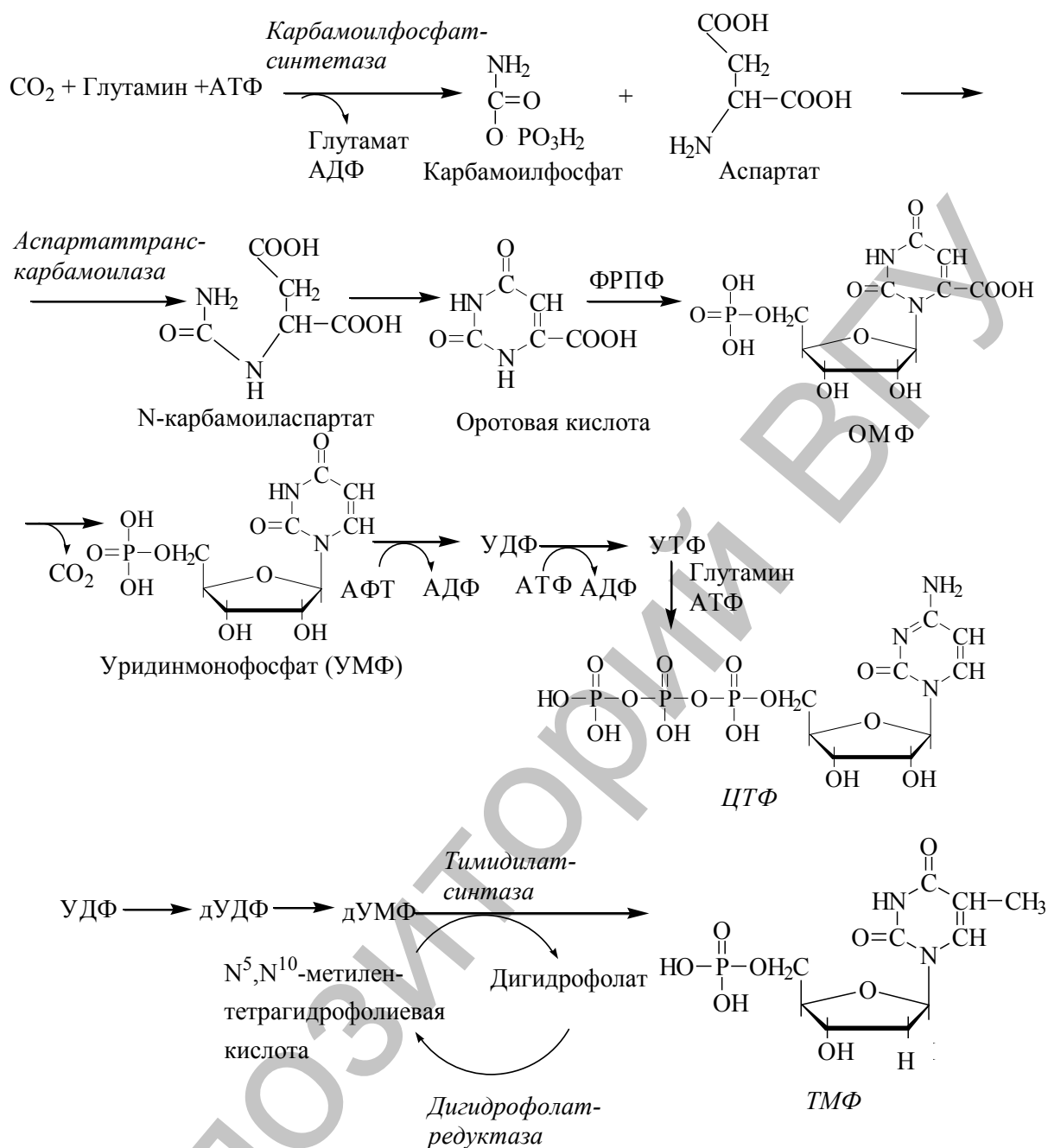
8. Для синтеза тимидиловых нуклеотидов требуется также метилированное производное урацила – тимин. В клетках имеется фермент – тимидилатсинтаза, который катализирует метилирование дезоксиУМФ. Донором метильной группы в тимидилатсинтазной реакции является $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилен-ТГФК, которая превращается в дигидрофолиевую кислоту (ДГФК). Последняя восстанавливается до ТГФК под действием НАДФН₂-зависимой дигидрофолатредуктазы. Ингибитор дигидрофолатредуктазы – метотрексат – используется как противоопухолевый препарат. Из образовавшегося ТМФ путем фосфотрансферных реакций образуются dТДФ и dТТФ.

Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов

1. Карбамоилфосфатсинтетаза ингибируется УТФ и УДФ и активируется фосфорибозилпирофосфатом и АТФ.

2. Аспартаттранскарбамоилаза аллостерически ингибируется УТФ и ЦТФ.

3. Скорость биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов коррелирует со скоростью синтеза пуриновых нуклеотидов через фермент фосфорибозилпирофосфатсинтетаза, который ингибируется по принципу обратной связи пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами.



Распад пуриновых нуклеотидов

1. Нуклеотидмонофосфаты превращаются в соответствующие нуклеозиды под действием нуклеозидаз, которые подвергаются ферментативному распаду в организме животных до образования конечного продукта – мочевой кислоты, которая выводится из организма с мочой. Мочевая кислота является антиоксидантом.

2. Аминогруппа из аденозина удаляется под действием дезаминазы и образуется инозин.

3. Инозин и гуанозин превращаются в гипоксантин и гуанин, соответственно.

4. Гуанин подвергается дезаминированию под действием *гуаназы* до ксантина.

5. *Ксантиноксидаза* превращает гипоксантин в ксантин и ксантин в мочевую кислоту.

При накоплении мочевой кислоты развивается *подагра*, характеризующаяся появлением кристаллов мочевой кислоты в суставах и мочевыводящих путях. Для лечения этого заболевания используют аллопуринол – аналог гипоксантина, который ингибирует ксантиноксидазу и препятствует образованию мочевой кислоты.

Конечными продуктами *распада* *пиримидиновых* нуклеотидов является водорастворимые продукты: CO_2 , NH_3 , β -аланин и β -аминоизомасляная кислота. Образующиеся продукты водорастворимы и включаются в метаболизм.

Глава 12. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеопротеины – сложные белки, которые состоят из белковой части и небелковой части – простетической группы, которая представлена *нуклеиновыми кислотами*. Существует 2 типа нуклеопротеинов, которые отличаются по *составу, размеру и физико-химическим* свойствам: *дезоксирибонуклеопротеины* (ДНК) и *рибонуклеопротеины* (простетическая группа РНК). Дезоксирибонуклеопротеины преимущественно локализованы в ядре клеток и в митохондриях. Рибонуклеопротеины – в цитоплазме, ядре и ядрышках.

Функция ДНК состоит в хранении генетической информации, РНК – передаче наследственной информации.

Белковая часть нуклеопротеинов представлена *гистонами* и *негистоновыми* белками. Различают 5 классов гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4), которые различаются по размерам, аминокислотному составу и заряду. Гистоновые белки имеют положительный заряд, который обусловлен наличием положительно заряженных аминокислот – аргинина и лизина. Негистоновые белки представлены сложными белками-ферментами, а также регуляторными белками и являются кислыми, т.е. имеют отрицательный заряд.

Нуклеиновые кислоты – полимеры, мономерами которых являются *нуклеотиды*.

12.1. Структура нуклеиновых кислот

При гидролизе нуклеиновых кислот образуются *пуриновые* (*аденин, гуанин*) и *пиримидиновые* (*тимин, цитозин, урацил*) основания, углевод (*рибоза* или *дезоксирибоза*) и *фосфорная кислота*. Отличиями в строении ДНК и РНК являются: в ДНК углевод дезоксирибоза, в РНК – рибоза; в ДНК содержится тимин, в РНК – урацил. В составе ДНК и РНК открыты

так называемые минорные азотистые основания, на долю которых приходится до 10% всех нуклеотидов.

Азотистое основание соединено с углеводным компонентом *гликозидной связью*. В образовании гликозидной связи в пуриновых нуклеотидах принимает участие N-9 пурина и C-1' пентозы, а в пиримидиновых нуклеотидах – N-1 пиримидина и C-1' пентозы.

Для того, чтобы отличить углеродные атомы рибозы или дезоксирибозы от углеродных атомов, входящих в состав пуриновых или пиримидиновых оснований, первые принято обозначать символом «штрих».

К 5'-углеродному атому углевода присоединяется остаток фосфорной кислоты (от 1 до 3) и образуются нуклеотиды.

Нуклеозид состоит из азотистого основания и углеводного компонента. Нуклеотид – нуклеозид + фосфорная кислота.

Основные функции ДНК по А. Ленинджеру: 1) хранение запаса генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и всех РНК каждого вида организма; 2) регуляция во времени и пространстве биосинтеза компонентов клеток и тканей; 3) определение деятельности организма в течение его жизненного цикла; 4) обеспечение индивидуальности данного организма.

Различают следующие основные виды ДНК: 1) ядерные (хромосомные) ДНК; 2) ДНК плазмид; 3) ДНК хлоропластов; 4) ДНК митохондрий; 5) ДНК вирусов.

Ядерная ДНК локализована в ядре эукариотической клетки. Аналогом ядерной ДНК у бактерий служит *генофор*, или *нуклеоид*, который представляет собой кольцевидно замкнутую ДНК, не отделенную от цитоплазмы мембраной. Нередко генофор называют *бактериальной хромосомой*.

Молекулы ядерных ДНК содержат основной объем информации обо всех наследственных признаках организма. Их функция – хранение этой информации, обеспечение ее экспрессии и рекомбинации, а также воспроизводство при делении клетки и передача последующим поколениям организма.

ДНК плазмид – это обычно кольцевидно замкнутые молекулы ДНК небольшого размера, находящиеся в цитоплазме. Несмотря на небольшой объем содержащейся в них наследственной информации, ДНК плазмид играют важную роль в явлениях наследственности и изменчивости организмов, прежде всего бактерий и грибов. Плазмидные ДНК – это относительно *автономные* структуры: они способны реплицироваться независимо от ядерной ДНК, а также переходить из одной клетки в другую в процессе их контактов. Эту способность плазмидных ДНК широко используют инженеры-генетики для переноса наследственной информации из одних организмов в другие.

ДНК хлоропластов находятся в пластидах растений. Они несут информацию о белках и РНК, необходимых для нормальной работы фотосинтетического аппарата растительной клетки. Поскольку хлоропласты растений обладают автономным аппаратом для синтеза белка, то роль этих ДНК отчасти аналогична функциям ядерной ДНК.

ДНК митохондрий, подобно ДНК хлоропластов, обеспечивают автономный синтез белка, который протекает в митохондриях. Несмотря на известную автономность, функционирование ДНК хлоропластов и ДНК митохондрий четко координировано с деятельностью ядерной ДНК. *Эти виды ДНК в совокупности образуют единый наследственный аппарат эукариотической клетки*

ДНК вирусов. Значительная часть вирусов бактерий (бактериофагов), животных и человека принадлежит к ДНК-содержащим вирусам. Например, возбудители оспы человека, герпеса, гепатита В – ДНК-содержащие вирусы. Гораздо меньше их (не более 3%) среди вирусов растений и грибов.

Вирусные ДНК несут относительно небольшой объем наследственной информации (от 10 до 150 генов), обеспечивающей циркуляцию этих паразитов в природе, в частности инфицирование клетки-хозяина.

Подобно плазмидным ДНК, вирусные ДНК обладают способностью «путешествовать» между клетками и встраиваться (интегрироваться) в их ДНК. Поэтому ДНК-содержащие вирусы находят применение в качестве носителей наследственной информации в генно-инженерных разработках.

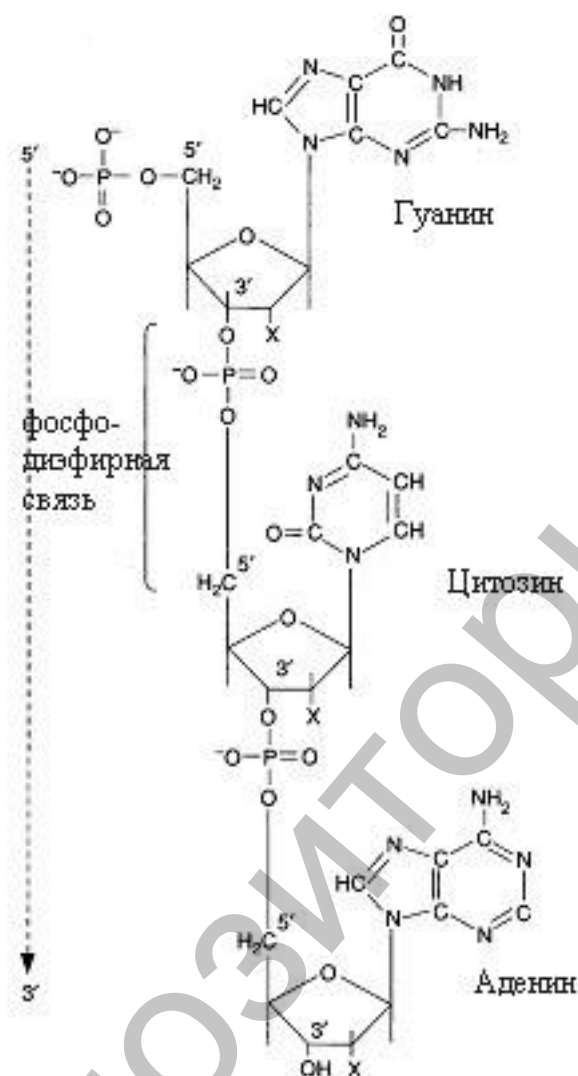
Нуклеотиды в нуклеиновых кислотах связаны 3',5'-фосфодиэфирными связями, которая возникает между 3'-ОН группой углевода одного нуклеотида и 5'-ОН группой углевода другого нуклеотида.

РНК – одноцепочечная молекула. Однако при наличии в цепи РНК участков с комплементарной последовательностью единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием так называемых «шпилек», структур, имеющих двуспиральные характеристики.

Для понимания ряда особенностей первичной структуры ДНК важное значение имеют закономерности количественного содержания азотистых оснований, установленные впервые Э.Чаргаффом в 1949 году и названные правилами Чаргаффа:

1. Количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых оснований.
2. Количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и Тимина.
3. Количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина.

4. Коэффициент специфичности, который отражает $\frac{\Gamma + \text{Ц}}{\text{А} + \text{Т}}$; для эукариот этот коэффициент ниже единицы (0,54 – 0,94), для прокариот – выше единицы.



В соответствии с моделью Дж. Вторичная структура ДНК

Уотсона и Ф.Крика, предложенной в 1953 г. на основании ряда аналитических данных, а также рентгеноструктурного анализа, молекула ДНК состоит из 2-х цепей, образуя *правовращающую спираль*, в которой обе полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной и той же оси. Удерживаются полинуклеотидные цепи *водородными* связями, образующимися между комплементарными азотистыми основаниями: между *А* и *Т* – две водородные связи, *Ц* и *Г* – три водородные связи. Азотистые основания расположены внутри спирали, а фосфорные остатки и углеводные компоненты – снаружи. Кроме водородных связей в стабилизации молекулы ДНК принимают участие силы *гидрофобного*

(«стэкинг») взаимодействия, образующегося между плоскостями оснований внутри данной цепи (рис. 12.1).

Обе цепи в молекуле ДНК имеют *противоположную полярность* (антипараллельны). Это означает, что одна цепь имеет направление $5' \rightarrow 3'$, а другая $3' \rightarrow 5'$. Подобная направленность цепей имеет важное биологическое значение при репликации и транскрипции молекулы ДНК.

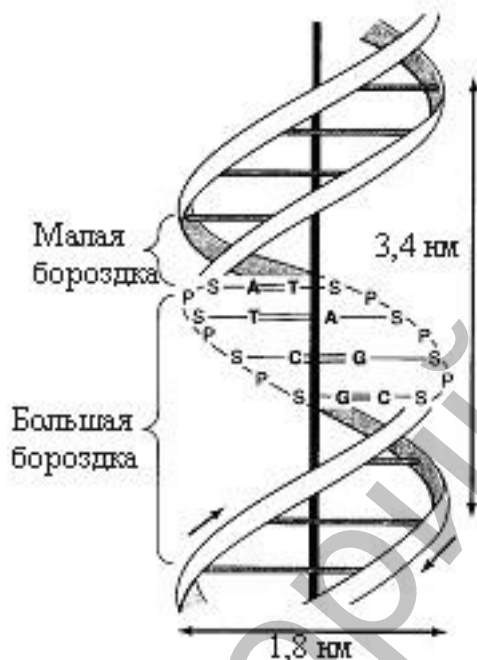


Рис. 12.1. Двойная спираль ДНК

Конфигурация двойной спирали ДНК меняется в зависимости от количественного содержания в ней воды и ионной силы окружающей среды. В настоящее время известно шесть форм ДНК (от А до Е и Z-форма). При физиологических условиях доминирующим структурным типом ДНК является *В-форма*. Расстояние между витками спирали (или шаг спирали) равно 3,4 нм. На этом участке укладывается 10 нуклеотидных остатков, размер одного нуклеотида составляет 0,34 нм, диаметр биспиральной молекулы 1,8 нм. В структуре ДНК различают *большую* и *малую* бороздки, закрученные вокруг оси молекулы параллельно фосфодиэфирному остову. В этих бороздках белки могут специфически взаимодействовать с определенными атомами нуклеиновых оснований.

Среди разнообразных конформаций ДНК различают линейную ДНК и кольцевидно замкнутую ДНК. Кольцевидная структура ДНК характерна для бактерий и некоторых вирусов.

ДНК в клетке имеет длину 1,74 м, поэтому понятно, что в ядре происходит упаковка ДНК. Третичная структура ДНК прокариот может образовываться в результате дополнительного скручивания в пространстве двуспиральной молекулы с образованием *суперспирали* или *суперкольца*. У высших организмов ДНК находится в *хромосомах*, которые при митозе

видны в световой микроскоп. В каждой хромосоме находится молекула ДНК, которая составляет основу хроматина. *Хроматин* – комплекс ДНК с РНК и белками (ДНК 30-45%, гистоны 30-50%, негистоновые белки 4-30%, РНК до 10%). Структурная организация хроматина такова, что позволяет использовать одну и ту же генетическую информацию ДНК по-разному в специализированных клетках. При этом основная часть хроматина не активна. Активный хроматин составляет в разных клетках от 2 до 11%. Различают несколько уровней укладки (компактизации) ДНК.

1) *Нуклеосомы*. В электронном микроскопе изображение хроматина напоминает бусы: шаровидные утолщения размером около 10 нм, разделенные перемычками. Каждая нуклеосома содержит отрезок двуспиральной ДНК, равный по протяженности примерно 145-150 парам оснований, обернутый в 1,5 оборота вокруг ядра, состоящего из гистонов (2Н1, 2Н2, 2Н3 и 2Н4). Свободные от контакта с белками участки ДНК называют линкерными (или связующими). Их длина варьирует в зависимости от типа клеток (от 15 до 100 нм). Линкерные участки ДНК либо свободны, либо контактируют с гистонами Н1. Степень компактизации в 5 раз. Примерно 90% ДНК входит в состав нуклеосом, 10% содержится в перемычках между нуклеосомами. Считают, что нуклеосомы содержат фрагменты «молчащего» хроматина, а перемычки – активного. При разворачивании весь хроматин активный. *Межнуклеосомный разрыв ДНК* – способ запрограммированной гибели клеток – *апоптоз*. Из нуклеосом образуются фибриллы (рис. 12.2).

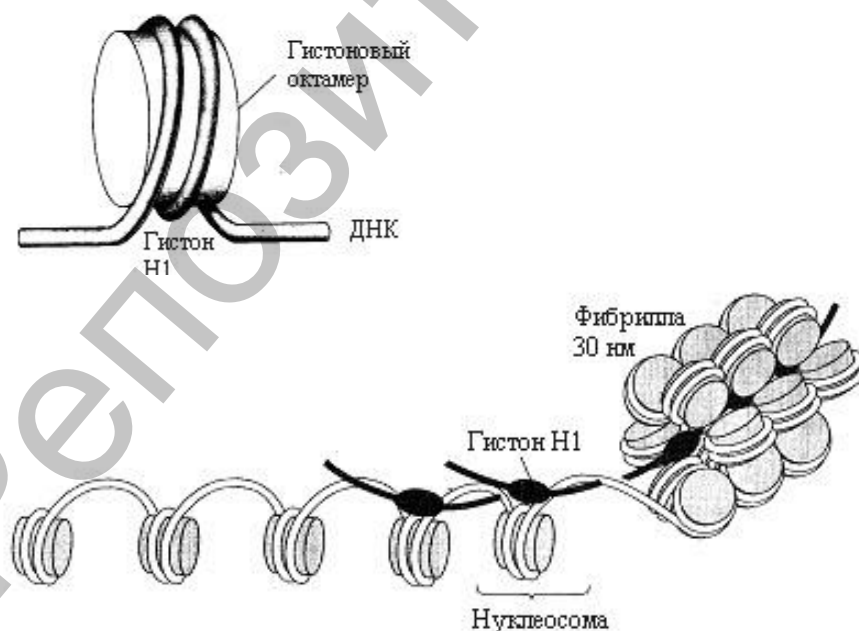


Рис. 12.2. Нуклеосомы

2) *Фибриллы* толщиной 10 нм состоят из ряда нуклеосом, касающихся друг друга своими краями и ориентированных плоскими

поверхностями вдоль оси фибриллы. Эта структура называется *соленоид*. Компактизация в 40 раз.

3) Фибриллы скручиваются в спираль, на виток которых приходится 6-7 нуклеосом. В результате образуется *хроматиновое волокно* диаметром 30 нм.

4) Для того, чтобы образовалась митотическая хромосома нормального размера, волокно диаметром 30 нм должно подвергнуться дополнительной компактизации с результирующим уменьшением длины еще в 100 раз.

Транскрипционно-неактивный хроматин (*гетерохроматин*) плотно упакован и поэтому соответствующие области интенсивно окрашиваются. Участки транскрипционно-активного хроматина (*эухроматина*) имеют более слабую окраску.

Двухцепочечные структуры ДНК при нагревании, при экстремальных значениях pH, обработке мочевиной и др. могут переходить в форму неупорядоченных клубков - *денатурация* ДНК. Молекулы нуклеиновых кислот максимально поглощают ультрафиолет при 260 нм за счет поглощения азотистых оснований. Раствор нативной ДНК имеет при 260 нм оптическую плотность на 40% ниже оптической плотности смеси нуклеотидов. Это явление называют *гиперхромным эффектом*. О денатурации ДНК судят по увеличению поглощения ультрафиолета при 260 нм. При нагревании поглощение при 260 нм возрастает в узком диапазоне температур - *точка плавления* (80-85 °C): $E_{260} \text{ ДНК} < E_{260} \text{ смеси нуклеотидов}$ на 40%. Денатурация обратима, если остались спирализованные участки ДНК. Восстановление структуры ДНК после удаления денатурирующего фактора (за счет комплементарного спаривания оснований нуклеотидов) называется ренативацией ДНК (отжиг ДНК). На явлении денатурации-ренативации основан метод гибридизации. Известны гибридные двухцепочечные молекулы: - ДНК-РНК, образуются как промежуточные формы при действии обратной транскриптазы; - ДНК-РНК на короткое время в процессе транскрипции ДНК. В процессе трансляции и транскрипции происходит разделение цепей ДНК.

12.2. Виды и функции РНК

Все типы РНК предназначены для снятия информации о структуре белка с ДНК и обеспечения биосинтеза белка в соответствии с этой информацией. РНК является одиночной полинуклеотидной цепью, построенной из четырех основных типов рибонуклеотидов - АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Для РНК характерны минорные нуклеотиды с необычными азотистыми основаниями - дигидроурацил, 3-метилурацил, 1-метилгуанин и др. (до 50 типов). Особенно их много в аминоксил-т-РНК (до 10% от всех нуклеотидов). В РНК содержание аденина и гуанина не соответствует содержанию урацила и цитозина.

Различают следующие типы РНК:

Информационная, или матричная РНК (м- или и-РНК), м.м. 25000-1000000 Да, состоит из 75-300 нуклеотидов, синтезируется в ядре из пре-м-РНК; составляет 5-7% от всей клеточной РНК. Период полужизни несколько минут. На 5'-конце всех эукариотических мРНК имеется особая структура, называемая *кэпом*. Кэп представляет собой 7-метилгуанозинтрифосфат. Образование кэпа происходит ферментативным путем в ядре еще до завершения транскрипции. Считается, что кэп, с одной стороны, предохраняет 5'-конец мРНК от ее расщепления 5'-экзонуклеазами, с другой стороны, используется для специфического узнавания в системе трансляции. За кэпом следует *нетранслируемый участок*, в котором (от 3-15 нуклеотидов до иницирующего кодона) располагается последовательность нуклеотидов, комплементарная последовательности рРНК. Ее роль – обеспечение правильного взаимодействия 5'-конца с рибосомой. Завершается транслируемый участок *терминирующим кодоном*, за которым часто следует гексануклеотид ААУААА. У большинства мРНК 3'-конец содержит полиаденилатную цепочку из 20-250 адениловых нуклеотидов, не являющуюся результатом транскрипции, а присоединяющуюся к мРНК в ходе созревания в ядре ферментативным путем. Предполагается, что полиаденилатная последовательность отвечает за поддержание внутриклеточной стабильности мРНК, определяет ее время существования. *Кодовым элементом является триплет нуклеотидов (кодон), кодирующий аминокислоту*. Показано, что в линейной молекуле мРНК формируется несколько двухспиральных шпилек, на концах которых располагаются «знаки» инициации и терминации транскрипции. Во вторичной структуре – изогнутая цепь; по некоторым данным в третичной структуре полинуклеотидная цепь связана (намотана) с транспортным белком информофером.

Транспортные РНК (тРНК) – около 15%. Транспортные РНК обладают небольшой молекулярной массой (~ 25 000) и содержатся в растворимой фракции цитоплазмы, выполняя функцию переноса аминокислот к месту синтеза белка – рибосоме. Содержат около 75 нуклеотидов. В клетке содержится не менее 20 видов молекул тРНК. Каждый или несколько видов тРНК соответствуют одной из 20 аминокислот, необходимых для биосинтеза белка. Вторичная структура всех тРНК напоминает «клеверный лист» (рис. 12.3) и имеет 4 основных участка. 1) *Акцепторный участок* имеет на 3' конце последовательность нуклеотидов ЦЦА. К 3'-гидроксильной группе аденозильного остатка происходит присоединение карбоксильной группы аминокислоты. Транспортные тРНК, соединенные с аминокислотами, называют *аминоацил-тРНК* (аатРНК). Они выполняют *адаптерную функцию* при переводе трехбуквенного кода нуклеиновых кислот в 20-буквенную

последовательность аминокислот в полипептидной цепи. 2) *Антикодонавая петля* необходима для присоединения к триплету или кодону мРНК. 3) *Псевдоуридиловая петля* (Т Ψ С) состоит из 7 нуклеотидов и содержит остаток псевдоуридина; служит для связывания тРНК с рибосомой; 4) *Дигидроуридиновая петля* (D) состоит из 8-12 нуклеотидных остатков. Необходима для связывания с аминоацил-тРНК-синтетазой, которая участвует в узнавании аминокислотой своей тРНК. Третичная структура представлена пространственной структурой в виде локтевого сгиба (L-форма).

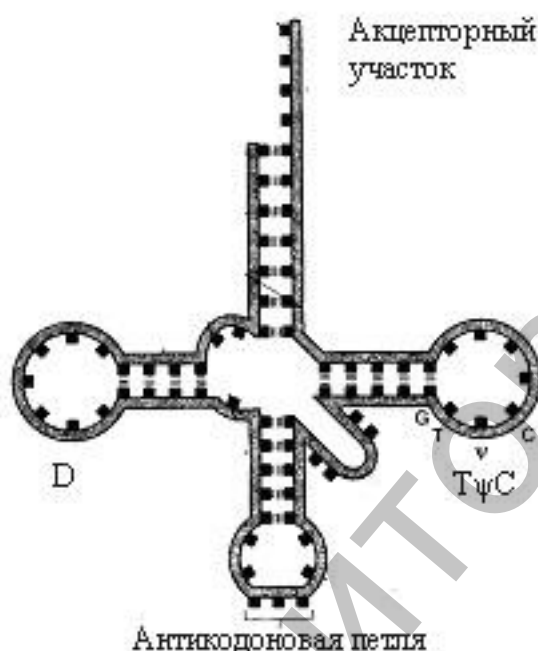


Рис. 12.3. Строение тРНК

Рибосомные РНК (рРНК) – 80-85%, имеют разную и значительно большую молекулярную массу (35000-1000000, что соответствует 100-3100 нуклеотидам), являются структурными компонентами рибосом.

Рибосомы обеспечивают специфический контакт мРНК и тРНК, в результате которого и происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определенного гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка. Рибосомы млекопитающих состоят из 2-х нуклеопротеиновых субъединиц – большой с константой седиментации 60S и малой – 40S (у прокариот – соответственно 50S и 30S). 60S-субъединица содержит 5S-рибосомную РНК (рРНК), 5,8S-рРНК и 28S-рРНК. Малая, 40S-субъединица включает единственную 18S-рРНК и около 30 полипептидных цепей. Все рибосомные РНК, за исключением 5S-РНК, имеют общего предшественника – 45S-РНК, локализованную в ядрышке. В ядрышке происходит упаковка высокометилированных рибосомных РНК с рибосомными белками.

Прокариотические рибосомы и рибосомы митохондрий и пластид содержат меньше компонентов, но структурно и функционально очень сходны с эукариотическими. Вторичная структура рРНК образуется за счет коротких двуспиральных участков молекулы – шпилек. Около 2/3 рРНК организовано в шпильки, 1/3 – представлена однотяжевыми участками, богатыми пуриновыми нуклеотидами, с которыми преимущественно связываются белки. Белки рибосом, подобно гистонам, обладают основным характером, выполняют как структурную, так и ферментативную роль.

Гетерогенные ядерные РНК (предшественник цитоплазматической мРНК), которые являются первичными транскриптами, образуются в эукариотических клетках, подвергаются процессингу в ядре. В результате образуются зрелые мРНК, которые поступают в цитоплазму и служат матрицей для биосинтеза белка. Молекулярная масса 10^7 .

Малые ядерные РНК (мя) РНК, которые непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК, в частности на этапе вырезания неинформационных участков премРНК.

Глава 13. МАТРИЧНЫЕ СИНТЕЗЫ

Существует 3 вида передачи наследственной информации: 1) ДНК → ДНК – репликация; 2) ДНК → РНК – транскрипция и 3) РНК → белок – трансляция.

ДНК является макромолекулой, которая переносит генетическую информацию от поколения к поколению. Одна клетка млекопитающих содержит только несколько пикограмм (10^{-12} г) ДНК.

13.1. Репликация

Репликация - процесс передачи генетической информации от ДНК к ДНК. Протекает в *S-фазу* клеточного цикла.

Репликация происходит *полуконсервативным* способом. Полуконсервативный способ означает, что цепи материнской молекулы ДНК расходятся и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной последовательности. Две образовавшиеся двуспиральные молекулы ДНК, каждая из которых состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной комплементарной цепи, распределяются между двумя дочерними клетками. Таким образом, каждая из дочерних клеток получают информацию, идентичную той, которой обладала родительская клетка.

Полуконсервативный механизм репликации у бактерий *E.coli* был однозначно продемонстрирован в классическом эксперименте *М.Мезельсона и Ф.Сталя в 1957 г.* с применением тяжелого изотопа азота в

сочетании с равновесным центрифугированием. *E.coli* выращивали в течение ряда поколений на среде, содержащей в качестве источника азота хлористый аммоний (NH_4Cl) с "тяжелым" изотопом ^{15}N . Вследствие этого все азотсодержащие соединения, в том числе и основания ДНК, включали этот изотоп в свой состав. Затем *E.coli* переносили на среду, в которой находился NH_4Cl с изотопом ^{14}N . После первого деления обе молекулы ДНК содержали одну "легкую" и одну "тяжелую" цепи. После второго удвоения образовались две молекулы "легкой" ДНК и две гибридные (одна "легкая" и одна "тяжелая" цепи).

Механизм репликации. Механизм репликации у прокариот изучен лучше, чем у эукариот. Основные условия и компоненты репликации ДНК одинаковы у прокариот, таких как *E.coli*, и эукариот, включая человека. Основное функциональное значение процесса репликации ДНК заключается в снабжении потомства генетической информацией. Для обеспечения генетической стабильности организма и вида ДНК должна реплицироваться полностью и с очень высокой точностью.

Условия, необходимые для репликации

1. **Матрица**, которой является неспаренная цепь ДНК.
2. **Субстраты синтеза**, которыми являются дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ). Синтез идет по схеме: $d(\text{НМФ})_n + d\text{НТФ} = d(\text{НМФ})_{n+1} + \text{PP}_n$, где $d(\text{НМФ})_n$ – ДНК до удлинения, $d(\text{НМФ})_{n+1}$ – ДНК после удлинения, $d\text{НТФ}$ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, PP_n – пирогосфат. Нуклеозидтрифосфаты необходимы в качестве источника энергии, т.к. при расщеплении пирогосфата выделяется энергия для образования фосфодиэфирных связей.

3. Ферменты и белковые факторы, участвующие в синтезе ДНК:

- 1) **ДНК-полимеразы I и III** (у прокариот), которые участвуют в образовании 3',5'-фосфодиэфирных связей и обладают 3'→5' и 5'→3' экзонуклеазными активностями; ДНК-полимераза II является минорной ДНК-полимеразой, которая может участвовать в процессе репарации у эукариот найдено пять типов ДНК-полимераз: α , ϵ , β , γ и δ ;

- 2) **гер-белок (хеликаза)** – расплетает двойную спираль ДНК;

- 3) **ДНК-связывающий белок** – стабилизирует расплетенные одноцепочечные участки ДНК и повышает активность хеликазы

- 4) **ДНК-гираза** (топоизомераза II) вводит отрицательные супервитки в ДНК, выполняя функцию шарнира при продвижении репликационных вилок;

- 5) **праймаза** (ДНК-зависимая РНК-полимераза) синтезирует РНК-затравку (праймер);

- 6) **dnaB-белок**, определяющий возможность праймазе инициировать синтез фрагмента РНК – праймера;

- 7) **ДНК-лигаза** - соединяет концы фрагментов ДНК.

Все ферменты и белковые факторы, участвующие в репликации, образуют макромолекулярный комплекс, называемый *реплисомой*.

Различают 3 стадии репликации: *инициации*, *элонгации* и *терминации*.

Стадия инициации

1. Репликация ДНК начинается одновременно во многих точках (их число может превышать тысячу), которые называются *точками инициации*.

2. К точкам инициации присоединяются ферменты *хеликазы* (*helix* - спираль), которые расплетают короткие участки ДНК. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ.

3. Как только небольшой участок ДНК оказывается расплетенным, к каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул *ДНК-связывающего белка* (SSB белок – single strand binding), которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному восстановлению цепей.

4. У прокариот хеликазе помогает фермент *ДНК-гираза* (семейство топоизомераз). Гираза выполняет функцию шарнира: он обеспечивает кратковременный разрыв одной из цепи ДНК, быстро восстанавливаемый с высокой точностью после одного или нескольких оборотов вокруг второй цепи. Этот фермент не только позволяет ДНК вращаться, но и активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетению цепей матрицы. В результате расплетения молекулы ДНК образуются репликационные пузыри, каждый из которых состоит из 2 репликативных вилок. Процесс репликации происходит в обеих репликативных вилках, но имеет противоположное направление, что обусловлено антипараллельностью молекулы ДНК.

5. В каждой репликативной вилке выделяют 3' и 5' концы. Синтез дочерних нитей ДНК происходит всегда в направлении 5'→3'. Стадия инициации завершается синтезом *праймера* - короткого фрагмента РНК, состоящего из 10 рибонуклеотидов, комплементарных одной из цепи матричной ДНК. Синтез праймера осуществляется ферментом ДНК-зависимой-РНК-полимеразой или праймазой. Синтез праймера необходим для фермента ДНК-полимеразы III, который не может начать синтез дочерней нити ДНК на "пустом" месте. 3'-ОН группа концевого рибонуклеотида праймера служит затравкой для синтеза ДНК под действием ДНК-полимеразы III.

Стадия элонгации

1. К 3'-ОН группе праймера присоединяется ДНК-полимераза III которая по *принципу комплементарности* синтезирует дочернюю цепь ДНК в направлении 5'→3'. Точность синтеза определяется тем, что фермент ДНК-полимераза III катализирует образование фосфодиэфирной

связи только в том случае, если основание предыдущего нуклеотида комплементарно соответствующему основанию матрицы. Если не произошло образование водородных связей между присоединенным нуклеотидом и матрицей, фермент возвращается, вырезает неправильный нуклеотид с 3'-конца цепи за счет экзонуклеазной активности, после чего ДНК-полимераза продолжает присоединять правильные нуклеотиды в направлении $5' \rightarrow 3'$. В результате достигается высокая точность матричного синтеза (не более одной ошибки на 1-10 миллиардов нуклеотидных остатков). Если направление синтеза дочерней цепи ДНК и направление движения репликативной вилки совпадают, то цепь синтезируется непрерывно и называется *лидирующей*.

2. Если направление синтеза ДНК и движение репликативной вилки не совпадают – цепь синтезируется фрагментами и называется *запаздывающей*. Фрагменты, синтезированные в запаздывающей цепи, называются фрагментами Рейджи Оказаки и состоят из 1000-2000 нуклеотидов у прокариот и 100-200 нуклеотидов у эукариот.

3. После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка (праймер) удаляется нуклеотид за нуклеотидом с помощью $5' \rightarrow 3'$ экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой *ДНК-полимеразой I* (при этом в качестве затравки используется 3'-конец предыдущего фрагмента Оказаки). Новый фрагмент Оказаки присоединяется к отстающей цепи ДНК с помощью фермента *ДНК-лигазы*. Источником энергии для этой реакции у эукариот служит АТФ. ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. Цепи ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы ДНК.

Терминация синтеза ДНК наступает вследствие истощения матрицы. Репликационные пузыри сливаются, молекулы дочерней цепи ДНК сшиваются ДНК-лигазой и на каждой матрице образуется дочерняя цепь ДНК.

Репликация у эукариот. Общие механизмы репликации у эукариот аналогичны таковым у прокариот. Как и у прокариот, репликация у эукариот происходит одновременно на обеих цепях. Единицей репликации у эукариот является *репликон*, размеры которых колеблются от 50 до 120 мкм. В клетках млекопитающих содержится от 10 000 до 100 000 репликонов.

Основным ферментом синтеза ДНК у эукариот является ДНК-полимераза δ . Функции ДНК-полимеразы β подобны таковым для ДНК-полимеразы I прокариот. ДНК-полимераза γ катализирует процессы полимеризации нуклеотидов в митохондриях.

Для репликации генома человека необходимо около 8 ч. Скорость репликации у *E.coli* составляет 1000 пар оснований в секунду. Репликация у эукариот происходит в 10 раз медленнее, чем у прокариот и составляет 100 пар оснований в секунду. Каждый репликон синтезируется приблизительно 1 час. Низкая скорость репликации у эукариот обусловлена, вероятно, формированием нуклеосом и наличием хромосомных белков. Гетерохроматин реплицируется медленнее, чем эухроматин. Кроме того, ДНК-полимеразы эукариот менее активны по сравнению с прокариотическими ферментами.

В отличие от прокариот, эукариотическая ДНК линейная. Как указано выше, репликация происходит в двух направлениях от одной точки инициации (хромосома эукариот имеет много таких точек). 5'-концевая область лидирующей цепи реплицируется полностью. Но этого не происходит при синтезе запаздывающей цепи, потому что участвующий в образовании фрагментов Оказаки РНК-праймер расположен у 3'-конца матричной цепи. После удаления праймера эти концы оказываются нереплицированными и не существуют механизма, позволяющего восполнить их, используя ДНК-синтезирующий комплекс, описанный выше. Для восполнения теряемых частей требуются РНК-праймер, но матриц, с которых их можно было бы образовывать, нет. Это означает, что с каждым клеточным делением хромосомы будут последовательно укорачиваться. Решение проблемы состоит в том, что на концах хромосом эукариот находятся специальные повторяющиеся последовательности ДНК, которую называют *теломерной ДНК* (содержащие ее концы хромосом – *теломеры*).

Теломеры млекопитающих представляют собой короткую последовательность нуклеотидов ТТАГГГ. Число теломерных последовательностей различно в клетках разных тканей. Специфическая ДНК полимераза (*ДНК-теломераза*) добавляет эти последовательности (одну за другой) к 3'-концу предшествующей теломерной ДНК и таким образом удлиняет ее. Теломераза имеет две особенности: (1) использует РНК в качестве матрицы для синтеза ДНК – это обратная транскриптаза и (2) матрица включена в структуру фермента. У человека РНК имеет последовательность, включающую 1,5 повтора, комплементарных ТТАГГГ. Матрица РНК гибридизируется с концом теломерной ДНК, затем постепенно (по одному нуклеотиду) добавляется еще один фрагмент. После этого фермент перемещается и связывается с концом нового, только что образованного фрагмента. Таким образом теломер непрерывно достраивается. На удлиненном теломере одной цепи затем формируется комплементарная цепь, так что теломер имеет двухцепочечную структуру. Однако пока не ясно как это происходит. По-видимому, в этом процессе участвует ДНК-полимераза.

При исследовании процессов **повреждения ДНК** в живой клетке следует учитывать, что ДНК в них связана с белками, в эукариотических клетках организована в виде нуклеосом с последующими уровнями компактизации до стадии хромосом. При нормальных значениях pH, температуры и давления в клетке возможны несколько типов повреждения ДНК.

1. Возможно гидролитическое отщепление аминогрупп от цитозина, аденина и гуанина с образованием урацила, гипоксантина и ксантина, соответственно. Наиболее часто происходит дезаминирование цитозина с образованием урацила: примерно 1000 на животную клетку в сутки (дезаминирование пуринов происходит в 50-100 раз реже). Дезаминирование цитозина выше на два порядка в одноцепочечной ДНК. Гидролиз N-гликозидных связей ведет к образованию свободных от оснований сайтов за счет отщепления пуриновых и пиримидиновых оснований. Пурины менее устойчивы к гидролизу – возможно до 10000 депуринизаций на животную клетку в сутки

(депиримидинация в 20 раз реже). Апуриновые и апиримидиновые сайты не участвуют в матричных синтезах.

2. Оксидативные повреждения связаны с действием свободно-радикальных форм кислорода, синглетного кислорода и пероксидов. Основные пути образования свободно-радикальных форм кислорода локализованы в митохондриях и осуществляются в окислительном фосфорилировании, а также при синтезе оксида азота, образовании пероксидов в процессе фагоцитарной активности лейкоцитов. Ультрафиолет, ионизирующее излучение и ряд ксенобиотиков активируют пакции свободно-радикального окисления. Их действие выявляется, когда интенсивность воздействующего фактора превышает возможности защитных и репаративных систем клетки. Оксидативные повреждения могут приводить к разрыву полинуклеотидной цепи за счет повреждения дезоксирибозы, разрыв конечных 3'5'-фосфодифирных связей, что нарушает присоединение следующего нуклеотида ДНК-полимеразой III. В настоящее время описано 40-60 различных типов повреждений азотистых оснований (насыщение двойных связей в циклических структурах, разрывы колец, присоединение новых групп к кольцам оснований и т.п. Особенно мутагенным является 8-оксогуанин. Все эти изменения могут привести к серьезным нарушениям информационной роли полинуклеотидных цепей ДНК.

3. Метилирование ДНК в клетке происходит ферментативным и неферментативным путями. Малые молекулы (пептиды, полиамины и S-аденозилметионин способны к неферментативному метилированию с образованием 7-метилгуанина и 3-метиладенина. Если 7-метилгуанин нетоксичен, то 3-метиладенин способен блокировать репликацию. Считают, что в сутки может образовываться 600 остатков 3-метиладенина на человеческую клетку. Бактериальные и животные ферменты – метилтрансферазы обеспечивают метилирование цитозина с образованием 5-метилцитозина. Это основание в полинуклеотидной цепи является одним из маркеров для действия рестриктаз.

ДНК является мишенью для действия многих неблагоприятных факторов внешней среды.

1. Действие ультрафиолетовых лучей. Солнечный ультрафиолет подразделяют на три вида по длинам волн: УФ-А (длинноволновой), УФ-В (средневолновой) и УФ-С (коротковолновой). УФ-С поглощается в стратосфере озоновым слоем. У человека УФ-В может вызывать рак кожи. При действии ультрафиолета возможно образование тиминовых димеров (УФ-С или при хроническом действии УФ-В).

2. Ионизирующее излучение повреждает ДНК посредством образования свободных радикалов. Ионизирующее излучение способно вызывать «летальные» разрывы обеих цепей ДНК. Особенно опасны трансурановые элементы, альфа-частицы которых при тесном контакте с молекулами ДНК способны повреждать различные химические связи полинуклеотидных цепочек. Отметим, что максимальное влияние трансурановых элементов, загрязнивших территории после аварии на ЧАЭС, предсказывается через 25-40 лет.

3. ДНК является мишенью для эндогенных химических веществ и ксенобиотиков. К таким веществам относятся вещества, определяющие неферментативные превращения метаболитов «реактивные» молекулы, чаще всего обеспечивающие электрофильную атаку нуклеофильных центров в дуплексах ДНК. К неферментативным повреждающим ДНК веществам относят алкилирующие агенты (например метил-метановые сульфаты). В результате их действия возникают фосфотриэфиры и весьма мутагенное соединение O^6 -метилгуанин. Бифункциональные алкилирующие агенты имеют две реактивные группы, способные создавать перекрестные связи в дуплексе ДНК через остатки гуанина. Положительный эффект

этого используется в действии противоопухолевого препарата *cis*-диаминодихлорплатиума. Другим примером метаболической активации ДНК являются повреждения бензапиреном, который является ароматическим углеводородом, поступающим в организм при курении и употреблении в пищу копченостей. В организме он гидроксилируется микросомальной монооксигеназной системой (цитохром Р-450 и превращается в продукт, повреждающий ДНК.

Итак, множество химических и физических агентов (ионизирующая радиация, УФО, алкилирующие агенты) вызывают в ДНК повреждения 4 основных типов.

1. Затрагивающие единичные нуклеотиды: депуринизация; дезаминирование цитозина до урацила; дезаминирование аденина до гипоксантина; алкилирование оснований; вставка или делеция нуклеотида; включение основания-аналога.

2. Затрагивающие пару нуклеотидов: УФ-индуцируемое образование тиминовых димеров; поперечные сшивки бифункциональным алкилирующим агентом.

3. Разрывы цепей: ионизирующая радиация; радиоактивная дезинтеграция каркаса ДНК.

4. Поперечные сшивки: между основаниями одной цепи или разных цепей; между ДНК и молекулами белка (например, гистонами).

Поврежденные участки могут быть подвергнуты репарации, замещены путем рекомбинации или остаться без изменений. В последнем случае возникают мутации, потенциально ведущие к гибели клетки.

Основной путь **репарации ДНК** включает 3 этапа:

1. Измененный участок ДНК распознается и удаляется при помощи ферментов ДНК-репарирующих эндонуклеаз.

2. ДНК-полимераза I связывается с 3'-концом поврежденной цепи ДНК и заполняет брешь, присоединяя нуклеотиды друг за другом комплементарно неповрежденной цепи ДНК.

3. ДНК-лигаза сшивает фрагменты ДНК и, тем самым, завершает восстановление структуры ДНК.

13.2. Транскрипция

Синтез РНК на матрице ДНК называется *транскрипцией*. Последовательность рибонуклеотидов в молекуле РНК *комплементарна последовательности дезоксирибонуклеотидов* одной из цепи ДНК. Та из двух цепей ДНК, по которой непосредственно идет транскрипция РНК-молекул, называется *кодирующей цепью*. Другую цепь называют некодирующей цепью соответствующего гена. Единицей транскрипции является *оперон* (у прокариот) и *транскриптон* (у эукариот). По функциональному признаку в опероне выделяют регуляторные и структурные области:

1) *промотор* - место инициации транскрипции, к которому присоединяется фермент РНК-полимераза;

2) *ген-оператор* (или акцепторная зона у эукариот) - место связывания регуляторных белков, например, белка-репрессора;

3) *структурные гены*, включающие информативные участки - экзоны и неинформативные участки - интроны;

4) *терминатор* - последовательность нуклеотидов, сигнализирующая о завершении транскрипции.

1. В области промотора у прокариот находятся богатые *АТ-парами* последовательности (ТАТА-бокс Прибнова). По всей видимости процесс расплетения двойной спирали ДНК в этой области облегчен.

2. У эукариот функциональная организация промотора намного сложнее за счет добавления регуляторных блоков: блок регуляции скорости транскрипции - *энхансерные* участки (enhance - усиливать), *сайленсерные* участки (silence - заставить молчать, заглушать). Регуляторные гены могут располагаться перед транскрибируемым геном, за ним, внутри него или в другой хромосоме.

3. Терминацию синтеза РНК вызывают длинные блоки АТ-последовательностей нуклеотидов в ДНК - терминатор (стоп-сигнал); у ряда прокариот обнаружен белок, называемый ρ -фактором, который в участке терминации освобождает РНК от матрицы ДНК.

Факторы, необходимые для транскрипции

1. *Матрица*, которой является неспаренная цепь ДНК.

2. *Субстраты*. Для синтеза РНК необходимы четыре типа рибонуклеозидтрифосфатов: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Разрыв макроэргической связи между α и β -остатками фосфорной кислоты обеспечивает процесс синтеза энергией.

3. Транскрипция происходит с участием фермента *ДНК-зависимой РНК-полимеразы*, которая состоит из 5 субъединиц (*холофермент*): двух идентичных α субъединиц, близких по размеру, но не идентичных β и β' -субъединиц и σ -субъединицы. Установлено, что β -субъединица участвует в связывании рибонуклеозидтрифосфатов, β' -субъединица – в связывании фермента с ДНК-матрицей, α -субъединица участвует в инициации транскрипции. Структура фермента без σ -фактора называется *кор-ферментом*. Этот фактор находит строго определенные последовательности нуклеотидов в промоторе, способствует более прочному связыванию полимеразы со специфической промоторной последовательностью ДНК и участвует в раскрывании двойной спирали ДНК, так чтобы одна из цепей могла служить матрицей.

В эукариотических клетках присутствуют 3 ядерные РНК-полимеразы – I, II, III. РНК полимеразы I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе рРНК; РНК-полимераза II – осуществляет синтез мРНК, а РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5S-рРНК.

Механизм транскрипции

Синтез РНК включает 3 стадии: *инициации*, *элонгации* и *терминации*.

1. На стадии *инициации* РНК-полимераза с помощью σ -субъединицы через серию случайных актов ассоциации-диссоциации находит промотор и происходит присоединение всей молекулы РНК-полимеразы. После синтеза цепочки РНК примерно из 8 рибонуклеотидов σ -субъединица отделяется от холофермента и присоединяется к другой молекуле РНК-полимеразы. Синтезируемые цепи РНК имеют на 5'-конце обычно остаток ГТФ или АТФ (pppA, либо pppG). В отличие от синтеза ДНК *затравка* в этом случае *не нужна*. Следовательно, новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН-группу на 3'-конце.

2. На стадии *элонгации* РНК полимераза синтезирует цепь РНК в направлении 5'→3' антипараллельно матричной цепи ДНК. В ходе транскрипции новосинтезированная цепь РНК временно образует короткие отрезки гибридной спирали ДНК-РНК. По мере того, как расплетается очередной участок ДНК, транскрибированный участок восстанавливает свою двуспиральную конформацию. Максимальная скорость элонгации составляет примерно 50 нуклеотидов в секунду. В отличие от ДНК-полимеразы РНК-полимераза не проверяет правильности новообразованной полинуклеотидной цепи. В связи с этим надежность транскрипции значительно ниже, чем надежность репликации. Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^4 - 10^5 нуклеотидов, что в 10^5 раз выше, чем при синтезе ДНК. Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.

3. *Сигнал терминации* синтеза молекулы РНК представляет собой определенную последовательность нуклеотидов, расположенную в рамках кодирующей цепи ДНК. Этот сигнал распознается терминирующим белком - *ρ -фактором*. После терминации синтеза данной цепи РНК кор-фермент отделяется от ДНК-матрицы и, связавшись с новой молекулой σ -фактора, может узнавать соответствующие промоторные участки и приступать к синтезу новой молекулы РНК. Одну и ту же кодирующую цепь могут одновременно считывать несколько молекул РНК-полимеразы, но процесс отрегулирован таким образом, что в каждый данный момент каждая молекула транскрибирует различные участки ДНК.

В результате транскрипции образуются *три типа предшественников* РНК (*первичные транскрипты*): предшественник мРНК, или гетерогенная ядерная РНК (пре-мРНК или гяРНК), предшественники рРНК (прерРНК), содержащие 5,8S РНК, 18S РНК и 28S РНК у эукариот и, соответственно 5S, 16S РНК и 23S РНК у прокариот, предшественники тРНК (пре-тРНК). Они *представляют собой копию оперона* и содержат *информативные и неинформативные последовательности*. Образование функционально

активных молекул РНК называется *процессингом* и продолжается после завершения транскрипции.

Процессинг включает в себя: вырезание неинформативных участков, сшивание информативных участков (*сплайсинг*) и модификацию 5' и 3'-концов РНК.

1. Вырезание неинформативных участков пре-мРНК происходит с помощью *рибонуклеаз* и/или рибозимов. При вырезании интронов важную роль играют *малые ядерные РНК* (мяРНК), нуклеотидные последовательности которых комплементарны последовательностям на концах каждого из интронов. В результате спаривания оснований, содержащихся в мяРНК и на концах свернутого в петлю интрона, два экзона сближаются, интроны вырезаются, а экзоны сшиваются *лигазой*. Таким образом, молекулы мяРНК играют роль временных матриц, удерживающих близко друг от друга концы двух экзонов для того, чтобы сплайсинг произошел в правильном месте.

2. Далее в ядре происходит *модификация 5' и 3'-концов мРНК*. К 5'-концу мРНК присоединяется олигонуклеотид, называемый «кэпом» или колпачком, состоящий из 2-3 метилированных нуклеотидов, причем концевым является 7-метилгуанозин. Эти «колпачки» способствуют стабилизации мРНК, защищая 5'-концы от разрушения фосфатазами и нуклеазами. Кроме того, «колпачки» повышают эффективность трансляции мРНК у эукариот. К 3'-концу фермент поли-А-полимераза присоединяет полиадениловую последовательность (поли-А), состоящую из 200 нуклеотидов. Функция полиаденолового «хвоста» мРНК неизвестна. Затем мРНК связывается с белком *информофером* и транспортируется в цитоплазму к рибосомам.

3. В клетках млекопитающих молекулы *рРНК* транскрибируются в виде большого *общего первичного транскрипта*. Процессинг рибосомальных РНК происходит в *ядрышке*, где и локализованы гены рибосомных РНК. Синтезированная пре-рРНК (45S) подвергается ферментативной модификации и расщеплению и дает зрелые 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК. Вначале примерно 100 нуклеотидов метилируется по 2'-гидроксильной группе рибозных остатков, более 100 остатков уридина изомеризуются в остатки псевдоуридина. *Метилирование* идет только на участках, *формирующих в дальнейшем зрелые молекулы рРНК*. Затем 45S-предшественник подвергается нуклеолитическому процессингу. В ходе процессинга РНК в ядрышках происходит дальнейшее метилирование. 5,8S-рРНК и 28S-рРНК, связываясь с рибосомными белками в ядрышках, формирует большую 60S-субъединицу рибосомы. Молекула 18S-рРНК в комплексе с соответствующими полипептидами образует малую субъединицу рибосомы. 5S РНК синтезируется отдельно.

4. Молекулы *тРНК* первоначально транскрибируются в виде больших предшественников, которые часто содержат более одной

молекулы тРНК, подвергающихся нуклеолитическому процессингу при действии специфических рибонуклеаз. Дальнейшие модификации молекул тРНК включают *алкилирование нуклеотидов* и *присоединение характерного ЦЦА-триплета* к 3'-концу молекулы (акцепторный участок), к которому присоединяется соответствующая аминокислота. Метилирование предшественников тРНК млекопитающих происходит, вероятно, в ядре, в расщепление и присоединение ЦЦА-триплета – в цитоплазме.

Обратная транскрипция

Некоторые онкогенные РНК-содержащие вирусы животных, такие, как *вирус саркомы Рауса*, имеют Zn^{2+} -содержащий фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу, часто называемой *обратной транскриптазой* или *ревертазой*. Существование обратных транскриптаз в РНК-содержащих онкогенных вирусах было предсказано еще в 1962 году Говардом Теминым и Дэвидом Балтимором. Обратной транскриптазе приписывают 3 вида ферментативной активности: 1) *РНК-зависимой ДНК-полимеразной* (строит по матрице РНК дочернюю цепь ДНК); 2) *рибонуклеазной* (обеспечивает удаление цепи РНК); 3) *ДНК-зависимой ДНК-полимеразной* (строит на матрице комплементарной ДНК вторую цепь ДНК).

После того как такой вирус попадает в клетку-хозяина, этот фермент способен катализировать синтез так называемой *комплементарной ДНК* (кДНК), для которой вирусная РНК играет при этом роль матрицы. В результате образуется гибридная молекула. На втором этапе происходит разрушение исходной вирусной РНК из комплекса гибридной молекулы под действием обратной транскриптазы. Наконец, на третьем этапе на матрице цепи ДНК комплементарно синтезируются новые цепи ДНК. В результате образуется ДНК, которые содержат гены, обуславливающие рак; эта ДНК часто встраивается в геном эукариотической клетки хозяина, где она может в течение многих поколений оставаться в скрытом, т.е. неэкспрессируемом состоянии. При определенных условиях такие бездействующие вирусные гены (онкогены) могут активироваться и вызывать репликацию вируса; при других же условиях они могут способствовать превращению такой клетки в раковую.

Итак, согласно современной трактовке основного постулата молекулярной биологии (ДНК → РНК → БЕЛОК) потоки информации могут обеспечить синтез ДНК на матрице ДНК (репликация), синтез РНК на матрице ДНК (транскрипция), синтез белка на матрице РНК (трансляция), синтез РНК на матрице РНК у некоторых вирусов (репликация РНК) и синтез ДНК на матрице РНК - обратная транскрипция.

13.3. Биосинтез белка (трансляция)

Генетическая информация, хранящаяся в ДНК, передается на РНК. Биосинтез белка или полипептида на матрице РНК называется *трансляцией*.

Строение рибосом

Внутриклеточный компонент, в котором сходятся и взаимодействуют все элементы механизма трансляции белка, называется рибосомой. Множество рибосом могут одновременно транслировать одну и ту же цепь мРНК, образуя *полисомы* (полирибосомы). Шероховатый эндоплазматический ретикулум – это компартмент клетки, в котором мембраносвязанные полисомы продуцируют как мембранные белки, так и белки, подлежащие экскреции и транспорту. Рибосомы эукариот в 2 раза больше рибосом прокариот.

Химически рибосомы представляют собой нуклеопротейны, состоящие из РНК и белков в соотношении 1:1 у 80S рибосом эукариот и 2:1 у 70S рибосом прокариот. Рибосомные РНК синтезируются в ядрышке, белки образуются в цитоплазме и переносятся в ядрышко. Здесь спонтанно образуются рибосомные субчастицы путем объединения белков с соответствующими РНК. Рибосомы состоят из 2-х субъединиц. Большая (50S у прокариот и 60S у эукариот) и малая (30S у прокариот и 40S у эукариот) субъединицы рибосом через поры ядерной оболочки переносятся в цитозоль. Большая субъединица рибосом эукариотической клетки содержит 41 белок, 5S, 5,8S и 28S рРНК, малая субъединица – 30 белков и 18S рРНК. Согласно представлениям Дж. Уотсона существует «рибосомный цикл»: в начале синтеза полипептидной цепи субъединицы рибосом объединяются в функционирующую рибосому на мРНК для осуществления трансляции, а в конце синтеза диссоциируют.

Генетический код

Информация о последовательности аминокислот в полипептидной цепи записана на мРНК в виде трехбуквенного нуклеотидного кода.

Свойства генетического кода: *триплетность* – каждая аминокислота кодируется 3 нуклеотидами (кодоном); *вырожденность (избыточность)* – каждая аминокислота кодируется несколькими триплетами; последовательность первых двух нуклеотидов определяет в основном специфичность каждого кодона, третий нуклеотид имеет меньшее значение (данное свойство повышает устойчивость генетической информации к воздействию неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды); *специфичность* – каждому кодону соответствует только 1 аминокислота; *неперекрываемость* – нуклеотид, входящий в состав одного триплета не может входить в состав соседнего; *однаправленность* – считывание информации идет в направлении 5'→3'; *коллинеарность* – соответствие последовательности аминокислот в

белке последовательности триплетов в мРНК; *универсальность* – соответствие аминокислот триплетному коду у всех живых организмов.

Среди 64 триплетов мРНК выделяют 3 типа: 1) *инициирующие* – АУГ и ГУГ (кодируют включение формилметионина у прокариот или метионина у эукариот, если стоят вначале мРНК; если находятся в середине – то являются смысловыми), определяют стадию начала (инициации) синтеза белковой молекулы; 2) *смысловые кодоны* – кодируют включение аминокислот в синтезируемую полипептидную цепь; 3) *терминирующие кодоны* не кодируют включение аминокислот, это нонсенс-кодона, которые определяют завершение (терминацию) синтеза полипептидной цепи.

Процесс биосинтеза белка протекает в 5 основных этапов, каждый из которых требует ряда компонентов.

I этап: активация аминокислот

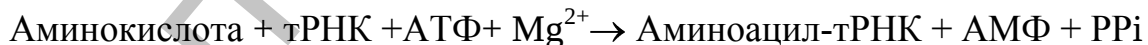
На этом этапе, который протекает в *цитозоле*, а не в рибосоме, каждая из 20 аминокислот ковалентно присоединяется к определенной тРНК, используя для этого энергию АТФ. Значение этапа: 1) активация СООН-группы аминокислот, которая может участвовать в образовании пептидной связи; 2) аминокислоты сами не могут узнавать кодоны мРНК, а переносятся к рибосомам специфическими тРНК, которые и узнают кодоны мРНК и выполняют, таким образом, роль адапторных молекул.

Необходимые компоненты:

1) *20 аминокислот*; 10 аминокислот являются незаменимыми и должны поступать с пищей; если отсутствует хотя бы одна аминокислота, процесс биосинтеза белка прекращается; 2) *ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы*; 3) *тРНК*; 4) *АТФ*; 5) Mg^{2+} .

Активация аминокислот и их присоединение к тРНК осуществляется специфическими *аминоацил-тРНК-синтетазами*, которые называют активизирующими ферментами.

Общий вид катализируемой реакции может быть выражен уравнением:



1. На первой стадии в активном центре фермента в результате взаимодействия АТФ и аминокислоты образуется связанное с ферментом промежуточное соединение *аминоациладенилат*.

2. На второй стадии аминоацильный остаток переносится с *аминоациладенилата*, связанного с ферментом, на *3'-гидроксильную* группу концевой остатка аденина в молекуле тРНК.

3. Образующийся в процессе активации неорганический пиррофосфат гидролизруется пиррофосфатазой до 2-х молекул ортофосфата. Таким образом, на активацию каждой аминокислоты затрачиваются в конечном счете *две высокоэнергетические фосфатные связи* (одна на образование эфирной связи аминоацил-тРНК, другая сдвигает равновесие реакции в

сторону образования продукта), что делает суммарную реакцию активации аминокислот практически необратимой.

Фермент амино-ацил-тРНК-синтетаза обладает специфичностью к аминокислоте и к тРНК. Фермент имеет 4 центра связывания: 1) для тРНК; 2) для АТФ; 3) для аминокислоты; 4) для воды. Гидролитическая активность фермента обеспечивает правильность присоединения аминокислоты к тРНК.

II этап: инициация полипептидной цепи

Необходимые компоненты:

1) мРНК; 2) иницирующая аминоацил-тРНК (формилметионил-тРНК); 3) 30S и 50S субъединицы рибосом; 4) ГТФ; 5) Mg^{2+} ; 6) факторы инициации (IF-1, IF-2, IF-3).

На стадии инициации требуется разместить рибосому на 5'-конце мРНК и с иницирующим кодоном ее (АУГ) связать антикодоном формилметионин-тРНК.

1. 30S субъединица рибосомы связывается с фактором инициации-3 (IF-3), который препятствует объединению 30S и 50S субъединиц рибосом с образованием непродуктивного 70S-комплекса без мРНК и способствует присоединению иницирующего кодона мРНК к определенному участку 30S субъединицы рибосом.

2. Одновременно иницирующая формилметионил-тРНК связывается с ГТФ и IF-2.

3. Затем оба комплекса взаимодействуют и образуется инициаторный комплекс, который с помощью фактора IF-1 связывается с мРНК.

4. Белковый фактор IF-2 способствует соединению малой и большой субъединиц рибосом. После присоединения большой субъединицы рибосом происходит гидролиз ГТФ и высвобождение всех факторов инициации.

5. Полностью собранная рибосома содержит 2 функциональных участка, образованных благодаря специфическому сочетанию областей 30S и 50S субъединиц рибосом, для взаимодействия с молекулами тРНК. Пептидильный участок (Р-участок) имеет сродство к пептидам и содержит в процессе синтеза растущую полипептидную цепь. Аминоацильный участок (А-участок) содержит аминоацил-тРНК, соединенную с соответствующим кодоном мРНК. В конце данного этапа в Р-участке находится иницирующая аминоацил-тРНК, а А-участок свободен.

Для процесса трансляции важно правильное положение иницирующего кодона мРНК, т.к. от этого зависит его попадание в Р-участок полной рибосомы. Оказалось, что у 5'-конца мРНК имеется специальная последовательность нуклеотидов, комплементарная участку 16S, входящему в малую рибосомную субъединицу.

III этап – элонгация полипептидной цепи

Необходимые компоненты для элонгации:

1) *полный набор аминоацил-тРНК*; 2) Mg^{2+} ; 3) факторы элонгации $EF-T_u$, $EF-T_s$ и $EF-G$; 4) *пептидилтрансфераза*.

Цикл элонгации включает 3 этапа: 1) связывание аминоацил-тРНК; 2) образование пептидной связи; 3) траслокация.

1. Фактор элонгации $EF-T_u$ образует комплекс с ГТФ, который связывается со всеми аминоацил-тРНК в цитоплазме. Тройной комплекс, содержащий аминоацил-тРНК, связывается антикодоном с кодоном мРНК в *А-участке* рибосомы по принципу комплементарности. Фактор элонгации $EF-T_u$ обладает ГТФ-азной активностью и гидролизует ГТФ. После этого $EF-T_u$, ГДФ и Рн удаляются из рибосомы и исходный комплекс регенерирует при помощи T_s и ГТФ.

2. С участием фермента *пептидилтрансферазы* (составная часть 50S субъединицы рибосомы) происходит образование пептидной связи между находящимися рядом формилметионином и аминокислотой в *А-участке* за счет энергии макроэргической связи аминоацил-тРНК.

3. После образования связи ненагруженная тРНК занимает *Р-участок*, а дипептидил-тРНК занимает *А-участок*.

4. При участии фактора $EF-G$ и за счет энергии ГТФ происходит процесс *транслокации* – рибосома перемещается на один кодон мРНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ и пептидил-тРНК перемещается в *Р-участок*.

5. В результате транслокации в *А-участок* рибосомы приходит следующий новый кодон мРНК. К нему методом случайного подбора присоединяется комплементарная аминоацил-тРНК. Между дипептидом *Р-участка* и аминокислотным остатком в *А-участке* замыкается пептидная связь. Возникший трипептид транслируется в *Р-участок*, а в *А-участок* приходит следующий новый кодон мРНК и т.д. Таким образом, процесс повторяется пока в *Р-участок* не придет один из терминирующих кодонов.

IV этап – терминация

Необходимые компоненты этапа:

1) *АТФ*; 2) *терминирующий (нонсенс-кодон)*; 3) факторы *терминации* – $RF-1$ и $RF-2$; 4) *пептидилтрансфераза*; 5) фактор RRF (*ribosome release factor*).

1. После многих циклов элонгации, в результате которых синтезируется полипептидная цепь белка, в *А-участке* появляется *терминирующий или нонсенс-кодон*.

2. В норме отсутствуют молекулы тРНК, способные узнавать нонсенс-кодона. Факторы терминации узнают данные кодона: $RF-1$ узнает кодона UAA и UAG , $RF-2$ – UAA и UGA .

3. Связывание релизинг-фактора с терминирующим кодоном в *А-участке* активирует пептидилэстеразу, которая гидролизует связь между полипептидом и тРНК в *Р-участке*. После гидролиза и высвобождения

синтезированного полипептида и тРНК рибосома диссоциирует на малую и большую субъединицы, готовых к синтезу новой полипептидной цепи.

Посттрансляционная модификация полипептидной цепи

Многие полипептиды, образующиеся при трансляции мРНК подвергаются модификации различными способами и включают следующие процессы:

1) Модификация N-конца и C-конца. Удаление формильной группы на N-конце бактериальных белков катализируется *деформилазами*. Под действием аминопептидазы может произойти отщепление одного или нескольких N-концевых остатков. У прокариот и эукариот концевой метионин иногда отщепляется в то время, когда синтез остальной полипептидной цепи еще продолжается.

2) Удаление сигнальных последовательностей. Некоторые белки содержат на N-конце дополнительную полипептидную последовательность, которая направляет этот белок к месту его назначения в клетке. Такие сигнальные последовательности удаляются с помощью особых пептидаз.

3) Образование дисульфидных мостиков, которые помогают уберечь нативную конформацию от денатурации.

4) Модификация боковых цепей аминокислот.

- гидроксирование остатков пролина и лизина в коллагене;
- фосфорилирование гидроксильных групп серина, треонина и тирозина (увеличение отрицательного заряда, например, в казеине молока для связывания с ионами кальция или для активации некоторых ферментов, например, гликоген-фосфоорилазы);
- карбоксилирование (белок свертывания крови протромбин, содержит в своей N-концевой области несколько остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты, которые включаются в белок при помощи фермента, зависящего от витамина К.
- метилирование групп (мышечные белки и цитохромы).
- присоединение боковых углеводных цепей (протеоглики).

5) Присоединение простетических групп (например, молекула биотина, ковалентно связанная с ацетил-КоА-карбоксилазой).

6) Частичный протеолиз (например, при превращении проколлагена в коллаген и проинсулина в инсулин).

Согласно обобщениям Я. Кольман и К.-Г. Рем (2000), трансляция мРНК всегда начинается с помощью рибосом в цитозоле. Определенная последовательность из 15-60 аминокислотных остатков с N-конца цепи называется *сигнальный пептид*. Если образующийся на рибосоме полипептид начинается с сигнального пептида, ориентирующего полипептид на шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР), с ним связывается РНК-содержащая сигнал-узнающая частица SRP и трансляция временно прерывается. SRP связывает рибосому посредством *SRP-рецептора* с мембраной ШЭР. Как только рибосома закрепится на мембране SRP-частица диссоциирует от сигнального пептида и от *SRP-рецептора* (при этом гидролизует

ГТФ до ГДФ), и на рибосоме вновь начинается процесс трансляции. Полипептидная цепь на рибосоме растет и, еще не свернувшись, проходит через мембрану по каналу, называемому *транслоконом*, в просвет ШЭР. В просвете ШЭР соответствующая пептидаза отщепляет сигнальный пептид. Путем окисления радикалов цистеина образуются дисульфидные мостики, правильность положения которых контролируется *протеиндисульфид-изомеразой*. *Пептидилпролил-изомераза контролирует цис-транс-изомеризацию X-Pro-связей* в синтезируемом пептиде. *Трансгликозидазы* переносят олигосахариды в блоке с *долихолом* (длинноцепочечным изопреноидом) на определенные остатки аспарагиновой кислоты в белке, осуществляя N-гликозилирование белка. Специальные *гликозидазы* отщепляют избыточные остатки глюкозы и маннозы. Затем происходит формирование третичной структуры (фолдинг) с помощью *шаперонов*. В аппарате Гольджи происходит фосфорилирование белков, перегруппировки остатков моносахаридов и олигосахаридов с помощью *гликозилтрансфераз*. В секреторных пузырьках возможно отщепление специальных пептидов, что обеспечивает формирование функционально активного белка (например, отщепление С-пептида от проинсулина ведет к образованию молекулы инсулина).

13.4. Регуляция биосинтеза белка

Живые клетки имеют точно запрограммированные механизмы, регулирующие синтез различных белков таким образом, что в любой клетке присутствует определенное количество молекул каждого белка, позволяющее ей осуществлять свои метаболические процессы плавно и с максимальной эффективностью.

Процесс биосинтеза белка может регулироваться на уровне транскрипции и трансляции. У прокариот эта регуляция осуществляется преимущественно на уровне транскрипции.

Согласно теории Ф.Жакоба и Ж.Моно в биосинтезе белков у бактерий участвуют структурные гены, ген-оператор и ген-регулятор. Структурные гены определяют первичную структуру белков. Функционирование структурных генов контролируется геном-оператором. Процесс транскрипции начинается с промотора. Деятельность оперона находится под контролирующим влиянием другого участка ДНК, получившего название гена-регулятора. Структурные гены и ген-регулятор связаны специфическим белком – *репрессором*. Образование репрессора происходит в рибосомах на матрице специфической мРНК, синтезированной на гене-регуляторе. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо соединяется с ним в комплекс. Если репрессор связан с геном-оператором, то РНК-полимераза не может синтезировать мРНК и, следовательно, белки. Если ген-оператор свободен, процесс транскрипции возможен и информация структурных генов используется для синтеза белков. Освобождение репрессора от гена-оператора происходит при его связывании с определенными низкомолекулярными веществами, называемыми *индукторами*, или эффекторами. В качестве индукторов часто выступают субстраты реакций.

В некоторых случаях молекулы репрессора не обладают способностью подавлять деятельность гена-оператора, но приобретают такую способность после образования комплекса с конечным или одним из конечных продуктов биосинтетического процесса. Конечный продукт выступает в качестве *корепрессора*.

Оценим характеристики биосинтеза белков в клетках кишечной палочки (*E. coli*). Для удвоения числа клеток за 40 мин при 37 °С требуется синтез примерно 1000 полипептидов со средней молекулярной массой 40 кДа за секунду. Эти полипептиды локализируются в минимальном объеме цитоплазмы менее, чем 1мкм³. Общая концентрация макромолекул в цитозоле клеток *E. coli* достигает 340 г/л (напомним, что в сыворотке крови человека концентрация общего белка не превышает 85 г/л). Таким образом, синтезированная полипептидная цепь оказывается в пространстве, заполненном белками и другими макромолекулами при наличии протеолитических ферментов, способных ее гидролизовать. Возможны три негативных варианта судьбы полипептидной цепи: 1) протеолитическая деградация; 2) преципитация со снижением растворимости белка и 3) неправильное складывание полипептидной цепи. Все вышесказанное позволяет утверждать, что в процессе эволюции должны были отобраться механизмы, способные 1) сформировать правильную третичную (нативную) структуру белковой молекулы и 2) гидролизовать белки с неправильной конформацией полипептидной цепи. Для реализации таких механизмов используются белки *шапероны*, которые относятся к белкам теплового шока (hsp60, hsp70, hsp90, hsp100). Свое название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры и других формах стресса. Параллельно они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. Шапероны участвуют в трех процессах: 1) hsp60, hsp70, hsp90 определяют зависимое от АТФ правильное формирование третичной структуры белковой молекулы; 2) hsp70 и hsp100 определяют процессы агрегации-деагрегации полипептидных цепей и 3) hsp70 обеспечивает разрушение неправильных полипептидов после мечения их *убиквитином* в протеасомах (Consalvi V., Chiaraluce R., 2002).

Регуляция синтеза белков в клетках эукариот намного сложнее: не характерна прямая субстратная регуляция, т.к. опероны (транскриптоны) у эукариот имеют обширные регуляторные зоны; у эукариот структурные гены разбросаны по геному; в ядрах дифференцированных клеток эукариот большинство генов находится в репрессированном состоянии.

Выявлена оптимальная последовательность нуклеотидов (последовательность Kozak) для инициации трансляции: ЦЦ(А/Г)ЦЦААУГГ у высших эукариот: между пуриновыми нуклеотидными остатками А/Г и иницирующим кодоном АУГ необходимы три нуклеотидных остатка ЦЦА, а после иницирующего кодона – обязательно должен быть Г (гуаниловый нуклеотидный остаток). Завершение трансляции более эффективно, если за терминирующими кодонами будут следовать остатки пуриновых нуклеотидов.

Препараты, влияющие на синтез белка, широко используются в практике. *Индукторы* применяются с целью стимуляции синтеза белка в поврежденных или ослабленных длительным бездействием (атрофичных) органах. *Ингибиторы* синтеза белка применяются в противоположных целях: для подавления деления и роста клеток.

Препараты, усиливающие биосинтез белков, относятся к так называемым *анаболическим средствам*. Анаболические средства бывают гормональные и негормональные. Наиболее выраженной способностью к индукции синтеза белка из гормонов обладают анаболические стероиды (производные мужских половых

гормонов), которые используются для стимуляции биосинтеза белков и нуклеиновых кислот в организме. Анаболической активностью обладает инсулин, который активирует синтез белка на уровне трансляции.

К негормональным анаболическим средствам относятся предшественники нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Например, оротат калия (стимуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов), инозин. Данные препараты используются в качестве структурного материала и служат индуктором синтеза белка.

Ингибиторы синтеза белка делятся на ингибиторы: 1) транскрипции; 2) процессинга и транспорта РНК и 3) трансляции.

Ингибиторы транскрипции по механизму делятся на три группы: 1) ингибиторы РНК-полимераз; 2) вещества, связывающиеся с матрицей ДНК и нарушающие работу РНК-полимеразы и 3) структурные аналоги нуклеотидов, включающиеся в мРНК. Препаратом 1-й группы является α -аманитин (яд бледной поганки), избирательно ингибирующий РНК-полимеразу III (ответственную за транскрипцию мРНК); рифампицин, ингибирующий ядрышковую РНК-полимеразу I (отвечает за транскрипцию рРНК) и обратную транскриптазу.

Ко второй группе относятся актиномицин D (используется в биохимических исследованиях), антибиотики оливомицин, дактиномицин и растительные алкалоиды винбластин и винкристин, которые применяются в медицине как противоопухолевые препараты.

К третьей группе относится, например, 5-фторурацил, включающийся в мРНК вместо природного нуклеотида и приводящий в негодность синтезируемую матрицу РНК.

Ингибиторы процессинга и транспорта РНК. К ним относятся ингибиторы внутриядерных РНКаз, РНК-лигаз, осуществляющих различные фазы созревания РНК. Препятствует присоединению полиаденилового фрагмента к мРНК кордицепин.

Ингибиторы трансляции. К ним относятся антибиотики, применяемые как антибактериальные препараты.

Хлорамфеникол действует на 70S рибосомы и рибосомы митохондрий и хлоропластов эукариот. Хлорамфеникол связывается с 50S субчастицей рибосом и блокирует пептидилтрансферазную реакцию, вызывая преждевременный обрыв синтезируемой полипептидной цепи.

Линкомицин действует на 80S рибосомы.

Эритромицин (и другие макролиды) ингибирует транслокацию пептидил-тРНК из участка А в Р-участок 50S субъединицы бактериальных рибосом.

Тетрациклины блокируют связывание мРНК и аминоацил-тРНК с малой субъединицей рибосом, т.е. фазу инициации и элонгации синтеза белка в рибосомах.

Стрептомицин влияет на 70S рибосомы бактерий и не оказывает действия на 80S рибосомы. Специфически связывается с белком малой субъединицы и нарушает правильное считывание мРНК.

13.5. Генная инженерия: технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

Вводные понятия

Важнейшей проблемой генной инженерии является анализ естественных путей передачи генов между живыми организмами. Согласно А.В. Кузнецову и И.В. Кузнецовой (1998) к настоящему времени известно:

1. Обмен генами между клетками реализуется у прокариот.
2. Существует возможность переноса генов между симбиотическими организмами. Наиболее вероятен обмен генов между длительно контактирующими симбионтами или паразитами и хозяевами.

3. Перенос генов от бактерий к эукариотам постоянно происходит при передаче Ti-плазмиды от *Agrobacterium tumefaciens* в клетки растений-хозяев. Сегмент ДНК из Ti-плазмиды включается в геном растения, что вызывает изменение роста и дифференцировки клеток последнего.

4. У эукариот латеральный (горизонтальный) перенос генов, насколько сейчас известно, не происходит, хотя нельзя утверждать, что это правило абсолютно. Например, онкогенные вирусы, интегрированные в хромосому эукариотической клетки и оказавшиеся рядом с онкогеном, при выходе из этой клетки и повторном инфицировании способны захватить данный онкоген с собой и перенести в другой организм.

Считается, что в естественных условиях между видами животных (и растений) не происходит передачи генов, которые они приобрели в ходе эволюции, так как необходимые рекомбинации и мутации в обычных условиях происходят с низкой частотой. С развитием генной инженерии возможность включения чужеродной ДНК в геном реципиентных клеток доказана в многочисленных опытах по их трансформации (трансфекции, трансгенезу). Тот факт, что интродуцированная в клетку молекула ДНК может эффективно включаться в работу генома, по всей видимости, является общебиологическим феноменом (Kumar, 1996), на основе которого строится здание современной биотехнологии.

Сведения о латеральном переносе генов в природных сообществах прокариот немногочисленны. *Гены могут переноситься в виде свободной ДНК, нехромосомных структур ДНК – плазмид и с помощью вирусов.*

Прокариоты не способны осуществлять посттрансляционные модификации белка, свойственные эукариотам, поэтому их используют для синтеза простых белков. Дрожжи являются наиболее примитивными одноклеточными эукариотами, которые могут использоваться для направленного переноса генов и синтеза сложных белков.

Для точного расщепления ДНК используют бактериальные рестрицирующие эндонуклеазы типа II (*рестриктазы*). Например, одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз II типа была выделена из бактерии *E. coli* и получила название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую *палиндромную последовательность* (перевертыш типа «кок», «шалаш») G-A-A-T-T-C, и катализирует разрыв между остатками гуанина (G) и аденина (A) в каждой цепи. Происходит расщепление связи между атомом кислорода при 3'-атоме углерода дезоксирибозного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому дезоксирибозы соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (*липкие концы*). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. К настоящему времени получены сотни рестриктаз; их номенклатура: род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид – двумя строчными, штамм обычно не указывается; римские цифры – порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма (см. выше *EcoRI*). Палиндромные последовательности, которые атакуют рестриктазы называют сайтами узнавания. Рестриктазы существуют двух типов: 1) катализируют косое расщепление двойной спирали ДНК с образованием «липких концов» и 2) катализируют

перпендикулярный разрыв с образованием «тупых концов».

Рестриктазы используют для 1) изучения последовательности нуклеотидов в ДНК и 2) в генной инженерии. В последнем случае рекомбинантные ДНК получают, когда два разных образца ДНК обрабатывают *одной и той же рестриктазой* с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы. Благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов ДНК могут образовываться новые комбинации генов.

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержащие от 1 до 500 т.п.н. Плазмиды встречаются практически у всех бактерий. Их делят на высококопийные (в клетке 10–100 копий) и низкокопийные (в клетке 1–4 копии). На долю плазмидной ДНК приходится 0,1–5,0% суммарной клеточной ДНК.

Для целей генной инженерии требуются плазмиды, обладающие тремя важными свойствами:

- небольшой размер (менее 15 т.п.н.), необходимый для эффективного переноса;
- наличие уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка;
- наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Природные (не модифицированные) плазмиды обычно лишены одного или нескольких свойств, необходимых для эффективного переноса, поэтому качественные плазмидные векторы приходится также создавать методами генетической инженерии.

В технологии рекомбинантных ДНК классическим является плазмидный вектор pBR322. Номенклатура: p – от английского plasmid, следующие буквы имеют отношение к описанию вектора или истории его создания (для данного вектора буквы BR указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса); цифра 322 – номер из исследовательского протокола. Размер плазмиды pBR322 – 4361 п.н. Плазмидный вектор несет два гена устойчивости к антибиотикам – ампициллину и тетрациклину, а также уникальные сайты узнавания ферментами рестрикции для *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I в гене Tet', один *Pst*I-сайт в гене Amp', один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в бактериальных клетках кишечной палочки.

Введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина называется *трансформацией*. Положительный результат получается примерно в одной клетке из тысячи (введение в клетку плазмиды со встроенным фрагментом чужеродной ДНК – гибридная плазида). Однако, проникновение в клетку экзогенной ДНК еще не означает, что она будет поддерживаться в клетке-хозяине. Для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине в первоначальном виде необходимо отсутствие генов, кодирующих синтез рестриктаз, разрушающих ДНК.

Следующий этап – это *идентификация клеток*, содержащих рекомбинантную ДНК. Для этого используют введение переносимого гена в один из генов устойчивости к антибиотикам плазмиды и затем, высевая клетки на культуры с антибиотиками, отбирают трансформированные клетки.

Технология рекомбинантных ДНК

Рассмотрим типичную процедуру технологии рекомбинантной ДНК (рис. 17.1).

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (донорская ДНК, клонируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК). Эту ДНК подвергают ферментативному

гидролизу и соединяют с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы. Для выделения фрагментов донорской и векторной ДНК используют одну и ту же рестриктазу, что и позволяет соединить эти фрагменты липкими концами. Образуется новая рекомбинантная молекула: конструкция «клонированный вектор – встроенная ДНК».

2. Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается по наследству при каждом делении. Этот процесс называется трансформацией.

3. Отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Успех молекулярного клонирования зависит 1) от возможности воспроизводимо разрезать молекулу ДНК на фрагменты определенного размера и 2) способа их целенаправленного транспорта.

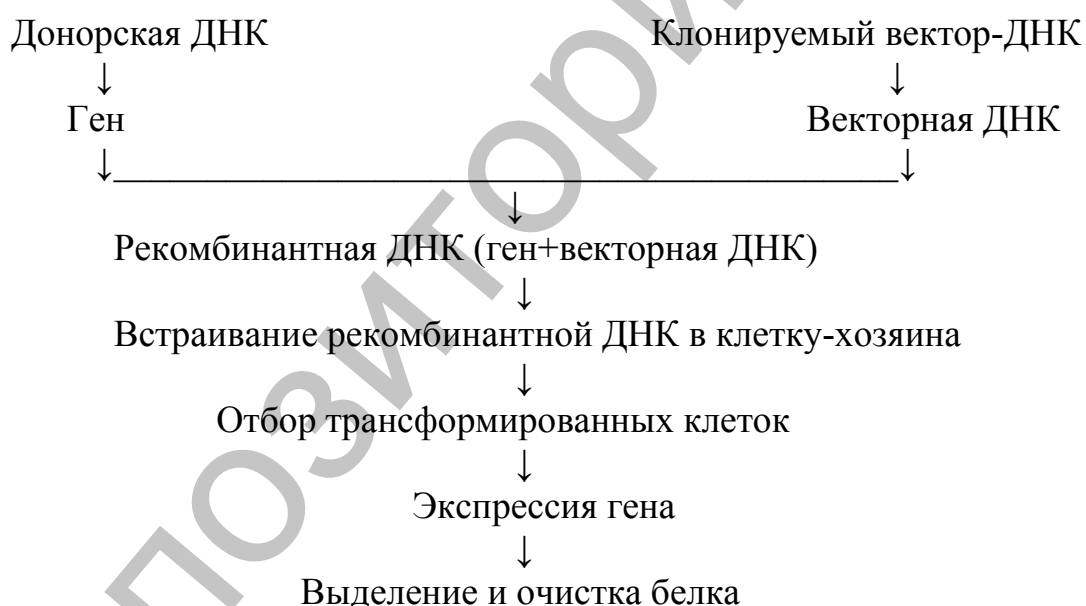


Рис. 13.1. Схема технологии рекомбинантных ДНК

В настоящее время используется более 100 различных рекомбинантных белков (инсулин, соматотропин и др.).

Глава 14. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ГОРМОНЫ

Для нормального функционирования животных и растительных клеток помимо обмена веществ и энергии необходима интеграция функций, осуществляемая, в частности, гормонами. Термин «гормон» (от греч. *hormāō* возбуждаю, побуждаю) был впервые предложен Э.Старлингом в 1905 г. применительно к секретину, образующемуся в

клетках двенадцатиперстной кишки и воздействующему на функции поджелудочной железы.

14.1. Общая характеристика гормонов

Гормоны – вещества органической природы, которые вырабатываются в специализированных клетках желез внутренней секреции, поступают в кровь или лимфу и взаимодействуют с клетками-мишенями, оказывая влияние на обмен веществ и физиологические функции. Гормоны участвуют в поддержании гомеостаза внутренней среды организма, занимают промежуточное положение между нервной системой и действием ферментов, которые непосредственно регулируют скорость метаболизма. Гормоны вызывают либо быструю (срочную) ответную реакцию, повышая активность имеющихся ферментов, либо медленную реакцию, связанную с синтезом ферментов *de novo*.

Динамика выработки гормонов

Гормоны циркулируют в крови в очень низких концентрациях (10^{-7} - 10^{-12} М). Однако эти величины сильно варьируют. Концентрация гормонов подвержена *периодическим колебаниям*, цикл или ритм которых может зависеть от времени дня, месяца, времени года или менструального цикла. В качестве примера можно привести околосуточный (циркадианный) ритм кортизола. Многие гормоны поступают в кровь импульсами и нерегулярно. Поэтому концентрация гормонов может меняться *эпизодически*, т.е. *пульсировать*. Концентрация других гормонов изменяется в зависимости от *внешних* факторов. Выброс гормонов является ответом на внешнее воздействие или на изменение внутреннего состояния.

Нейро-эндокринная регуляция синтеза гормонов

Импульсы, поступающие из внешней или внутренней среды, воспринимаются специализированными рецепторами и поступают в ЦНС, а оттуда в гипоталамус, где синтезируются биологически активные гормональные вещества – либерины и статины. Гормоны гипоталамуса не поступают в общий кровоток, а через портальную систему сосудов достигают специфических клеток гипофиза и стимулируют (либерины) или ингибируют (статины) выделение тропных гормонов гипофиза. Тропные гормоны гипофиза током крови приносятся в соответствующую периферическую эндокринную железу, стимулируя выработку гормона. Это *трансгипофизарный* путь регуляции секреции гормона. Выделяют также *парагипофизарный путь*: импульсы из ЦНС активируют секрецию гормонов периферическими эндокринными железами. Характерен для секреции катехоламинов в мозговом веществе надпочечников (адреналин).

Гормон периферической эндокринной железы оказывает действие на органы и ткани-мишени и ингибирует синтез гормонов гипоталамуса или гипофиза (*длинная петля обратной связи*). Гормон гипофиза также может

ингибировать выработку гормона гипоталамуса (*короткая петля обратной связи*). Кроме того, метаболиты или субстраты влияют на секрецию гормонов. Например, увеличение концентрации глюкозы в крови вызывает высвобождение инсулина, который усиливает потребление и утилизацию глюкозы в тканях; в результате уровень глюкозы возвращается к норме, что снижает секрецию инсулина. Регуляция уровня гормонов может осуществляться и по механизму *положительной обратной связи*.

Ткань-мишень – это такая ткань, в которой гормон вызывает специфическую биохимическую или физиологическую реакцию.

14.2. Классификация гормонов

Гормоны классифицируются в зависимости от места их природного синтеза – гормоны гипоталамуса, гипофиза, щитовидной железы, надпочечников, поджелудочной железы, половых желез и др.

Гормоны могут быть классифицированы по месту *синтеза и месту действия на 3 группы*:

- 1) эндокринные гормоны – синтезируются эндокринными железами и транспортируются кровью к клеткам-мишеням;
- 2) паракринные гормоны – синтезируются вблизи места их действия;
- 3) аутокринные гормоны – действуют на те же клетки, которые их синтезируют.

По *химической структуре* гормоны классифицируются на:

- 1) пептиды и белки, которые синтезируются в виде больших предшественников и затем подвергаются процессингу и секреции;
- 2) производные аминокислот (катехоламины и тиреоидные гормоны – производные тирозина, мелатонин – производное триптофана);
- 3) стероидные гормоны (кортикостероиды и половые гормоны, которые являются производными холестерина);
- 4) производные жирных кислот (эйкозаноиды).

По *растворимости* гормоны классифицируются на:

- 1) гидрофильные (пептиды, белки, катехоламины);
- 2) липофильные (стероиды и тиреоидные гормоны).

Для транспорта *липофильных* гормонов требуются *белки-переносчики*, *гидрофильные* гормоны транспортируются *самостоятельно*. Транспортные белки создают *резерв гормонов* в крови, т.к. в связанном виде гормоны не подвергаются метаболизму и экскреции. Биологическая активность присуща только свободной форме гормона. Пептидные и белковые гормоны не имеют специальных транспортных белков в плазме крови, и поэтому период полужизни в крови намного меньше (секунды или минуты), чем у стероидных гормонов (часы).

Растворимость определяет *механизм действия* гормона.

По механизму действия гормоны классифицируются на 3 группы:

1) гормоны, *не проникающие в клетку* и имеющие рецепторы на поверхности мембран. Действие этих гормонов на клетку осуществляется через вторичных посредников, образующихся в клетке после связывания гормона с рецептором. К этим гормонам относятся гидрофильные гормоны – белково-пептидной природы и катехоламины.

2) гормоны, *проникающие в клетку* (липофильные гормоны). Свободный гормон легко проходит сквозь плазматическую мембрану любой клетки и, попадая в клетку-мишень, связывается с рецепторами, локализованными в цитоплазме или ядре клетки. Комплекс лиганд-рецептор рассматривается как внутриклеточный посредник действия гормонов этой группы. К этой группе гормонов относят стероидные и тиреоидные гормоны.

3) гормоны *смешанного действия*. Рецепторы расположены на поверхности клеток. После связывания гормонов с рецептором, комплекс проникает внутрь клетки и оказывает эффект. К этой группе гормонов относится инсулин.

14.3. Характеристика рецепторов и механизмы действия гормонов

Во внеклеточной жидкости гормоны присутствуют в очень низкой концентрации – 10^{-15} - 10^{-19} моль/л. Это намного ниже содержания других структурно сходных соединений (стеролов, аминокислот, пептидов, белков) и иных веществ, которые находятся в крови в концентрации 10^{-5} - 10^{-3} моль/л. Следовательно, клетки-мишени должны отличать данный гормон не только от других гормонов, присутствующих в малых количествах, но и от прочих соединений, присутствующих в 10^6 - 10^9 -кратном количестве. Высокую избирательность обеспечивают рецепторы. Биологический эффект гормонов начинается с их связывания со специфическими рецепторами, а завершается, как правило, диссоциацией рецептора и гормона.

Свойства рецепторов

- 1) по строению являются гликопротеинами;
- 2) высокое сродство (10^{-11} - 10^{-9} моль/л), обусловленное структурной специфичностью;
- 3) высокая специфичность связывания гормона;
- 4) насыщаемость при физиологических концентрациях гормона;
- 5) обратимость связывания (гормон и рецептор связываются за счет сил гидрофобного и электростатического взаимодействия);
- 6) способность к трансдукции сигнала.

Механизм действия гормонов, проникающих в клетку

Липофильные гормоны диффундируют через плазматическую мембрану и связываются со специфическими *рецепторами*, расположенными в цитозоле клеток. В результате этой реакции,

зависящей от температуры и присутствия солей, меняется величина, конформация и поверхностный заряд гормон-рецепторного комплекса и он приобретает способность связываться с хроматином. Гормон-рецепторный комплекс связывается со специфической областью ДНК – гормон-чувствительным элементом (hormone response element) и активирует или инактивирует специфические гены. Избирательно влияя на транскрипцию генов и продукцию соответствующих мРНК, *изменяется количество специфических белков* и скорость метаболических процессов (первичный ответ генов). В некоторых случаях продукты первичных генов могут активировать другие гены – вторичный ответ генов.

Механизм действия гормонов, не проникающих в клетку

Передача гормонального сигнала в клетку гормонов этой группы осуществляется через *мембранные рецепторы*.

Рецепторы для гормонов этой группы – интегральные мембранные белки, которые связывают сигнальные вещества на внешней стороне мембраны и за счет изменения пространственной структуры генерирует сигнал на внутренней стороне мембраны.

Различают три типа рецепторов.

1) *Рецепторы первого типа* являются белками, имеющими одну трансмембранную полипептидную цепь. Внеклеточный домен этого рецептора связывается с гормоном. Внутриклеточный домен обладает ферментативной активностью, который активируется, когда гормон связывается с внеклеточным доменом. Примером такого рецептора может быть трансмембранная тирозинкиназа, которая при активации фосфорилирует остатки тирозина. Вначале рецептор аутофосфорилируется, а затем фосфорилирует остатки тирозина других белков. К такому типу рецепторов принадлежат рецепторы инсулина, ростовых факторов и цитокинов.

2) *Ионные каналы*. Эти рецепторы являются олигомерными белками, образующими лиганд-активируемый ионный канал. Связывание лиганда ведет к открытию канала для ионов Na^+ , K^+ , Cl^- . По такому механизму осуществляется действие нейромедиаторов, таких как ацетилхолин и γ -аминомасляная кислота.

3) *Рецепторы третьего типа, сопряженные с ГТФ-связывающими белками*. Такие рецепторы передают сигнал с помощью G-белков на белки-эффекторы, которые являются ферментами или ионными каналами. Название этот белок получил, поскольку обладает способностью связывать гуаниловые нуклеотиды – ГТФ или ГДФ. G-белок состоит из 3-х субъединиц - α , β и γ . Различают G_s (стимулирующий) и G_i (ингибирующий)-белки. При связывании гормона с рецептором конформация последнего изменяется таким образом, что комплекс приобретает способность связывать G-белок. Ассоциация G-белка с рецептором приводит к обмену ГДФ на ГТФ. При этом происходит

активация G-белка, он отделяется от рецептора и диссоциирует на α -субъединицу и β, γ -комплекс. Комплекс ГТФ- α -субъединица связывается с белками-эффекторами и изменяет их активность, в результате чего происходит открывание или закрывание ионных каналов, активация или ингибирование рецепторов. В результате изменяется концентрация ионов или вторичных посредников.

Ферментами-эффекторами являются аденилатциклаза, гуанилатциклаза, фосфолипаза C.

Выделяют 3 типа *вторичных посредников*: 1) циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ); 2) ионы Ca^{2+} и 3) метаболиты фосфатидилинозитола.

Циклические нуклеотиды

цАМФ синтезируется аденилатциклазой, активность которой контролируется G-белками, которые в свою очередь сопряжены с рецепторами третьего типа. цАМФ активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, которая катализирует фосфорилирование специфических клеточных белков. Протеинкиназа состоит из 4- субъединиц: 2-х регуляторных (R) и 2-х каталитических (C). Тетрамер протеинкиназы неактивен. 2 молекулы цАМФ присоединяются к каждой R-субъединице и вызывают диссоциацию комплекса с высвобождением C-субъединиц, которые обладают каталитической активностью. Активная протеинкиназа фосфорилирует клеточные белки: ферменты (изменение активности), ядра и рибосом (изменение транскрипции и трансляции) и мембран (изменение проницаемости). Кроме того, комплекс R-субъединицы протеинкиназы и цАМФ может проникать в ядро и влиять на экспрессию генов.

Снятие гормонального сигнала

Диссоциация гормон-рецепторного комплекса вызывает изменение конформации рецептора и возвращение ее в первоначальное состояние. α -субъединица проявляет ГТФ-азную активность и происходит гидролиз ГТФ до ГДФ и Рн. α -субъединица отсоединяется от аденилатциклазы и реассоциирует с β, γ -субъединицами.

Концентрация цАМФ в клетке снижается в результате гидролиза цАМФ до АМФ под действием фермента фосфодиэстеразы. Фосфодиэстераза активируется ионами кальция. Некоторые лекарственные препараты, например, метилированные производные ксантина (кофеин, эуфиллин) ингибируют фосфодиэстеразу и тем самым потенцируют действие гормонов. Дефосфорилирование ферментов катализируется протеинфосфатазами.

Гуанилатциклаза существует в 2-х формах – растворимой и мембранносвязанной и катализирует образование цГМФ. Часто действие цАМФ и цГМФ противоположно. цГМФ связывается с цГМФ-зависимой протеинкиназой и активирует ее, что приводит к фосфорилированию специфических белков, в частности, белков гладкой мускулатуры (легкая

цепь миозина). В результате происходит расслабление гладких мышц и расширение сосудов. Так действуют, например, атриальный натрийуретический фактор, ряд соединений, например, нитроглицерин, нитрит натрия, азид натрия и др.

Ионы Ca^{2+}

Концентрация внеклеточного кальция (Ca^{2+}) составляет 5 ммоль/л и регулируется очень строго. Внутриклеточная концентрация свободного кальция равна 0,1-10 мкмоль/л, а количество Ca^{2+} , связанного с внутриклеточными органеллами (митохондриями и ЭПР), колеблется в пределах 1-20 мкмоль/л. Несмотря на этот 5000-10000-кратный концентрационный градиент, вход кальция в клетки резко ограничен. При накоплении в клетке слишком большого количества Ca^{2+} образуется малорастворимая соль фосфата кальция, и прекращается любая продукция и утилизация АТФ.

Изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле происходит по 3-м механизмам. Ряд гормонов повышает проницаемость мембраны для Ca^{2+} и тем самым увеличивает вход в клетку Ca^{2+} . Это может происходить по механизму $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена, обладающему большой емкостью, но низким сродством к Ca^{2+} . Существует также зависимый от АТФ-азы $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ насос, обеспечивающий выведение Ca^{2+} из клетки в обмен на H^+ . Этот механизм характеризуется высоким сродством к Ca^{2+} , но малой емкостью и отвечает за тонкую регуляцию уровня Ca^{2+} в цитозоле. Третий механизм – мобилизация Ca^{2+} митохондрий и ЭПР.

Ca^{2+} в клетке связывается с кальций-зависимым регуляторным белком – кальмодулином (мол. масса 17 000 Д). Кальмодулин содержит 4 участка связывания Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} с кальмодулином вызывает конформационные изменения белка, что определяет способность кальмодулина активировать или инактивировать ферментов. Комплекс Ca^{2+} с кальмодулином может изменять активность ферментов одним из двух способов: 1) путем прямого взаимодействия с ферментом-мишенью или 2) через активируемую этим комплексом протеинкиназу. Действие последней полностью аналогично эффектам цАМФ-зависимой протеинкиназы, но белки-мишени могут различаться. Кальмодулин часто оказывается одной из многочисленных субъединиц сложных белков (например, в состав киназы фосфорилазы, переводящей фосфорилазу из неактивной формы в активную).

Продукты распада фосфатидилинозитолов

Очевидно, что коммуникация между рецептором гормона на плазматической мембране и внутриклеточными депо Ca^{2+} должна осуществляться с помощью какого-то сигнала. Связывание гормона (вазопрессин, катехоламины) с рецептором на поверхности мембраны приводит к активации фосфолипазы С. Рецептор и фосфолипаза С сопряжены с Gq белком. Фосфолипаза С катализирует гидролиз

фосфатидилинозитола 4,5-дифосфата (IP_3) до инозитол трифосфата и 1,2-диацилглицерола.

1. Диацилглицерол (гидрофобная структура) латерально диффундирует в мембране и активирует протеинкиназу С, зависимую от концентрации ионов Ca^{2+} . Протеинкиназа С фосфорилирует специфические субстраты, которые изменяют физиологические процессы.

2. IP_3 является водорастворимой молекулой, поступает в цитозоль и способствует эффективному высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ЭПР и митохондрии). Активированный G-протеин способен непосредственно воздействовать на кальциевые каналы.

Инактивация IP_3 осуществляется дефосфорилированием, диацилглицерола – гидролизом.

14.4. Гормоны гипоталамуса и гипофиза

Гормоны гипоталамуса вырабатываются в пульсирующем режиме. Эти гормоны регулируют выработку гормонов гипофиза. Вещества, стимулирующие или угнетающие выработку гормонов гипофиза называются релизинг-факторы (от англ. release – освобождать) или либерины; вещества, угнетающие высвобождение (и, возможно, биосинтез) гипофизарных гормонов, называются статины.

В гипоталамусе выделяют 7 либеринов (кортиколиберин, тиреолиберин, люлиберин, фоллилиберин, соматолиберин, пролактолиберин, меланолиберин) и 3 статина (соматостатин, пролактостатин, меланостатин). По химическому строению все гормоны гипоталамуса являются низкомолекулярными пептидами.

Нейропептиды гипоталамуса активируют высвобождение тропных гормонов гипофиза по аденилатциклазному механизму или через изменение концентрации ионов Ca^{2+} .

В зависимости от места синтеза различают *гормоны передней, задней и промежуточной долей гипофиза*.

Гормоны передней доли гипофиза

1. *Кортикотропин* (АКТГ) – полипептид, состоящий из 39 аминокислот. Регулирует рост и функцию коры надпочечников. Для проявления биологической активности необходимы 24 N-концевые аминокислоты.

АКТГ 1) повышает синтез и секрецию стероидов надпочечников; 2) оказывает жиромобилизующий эффект и 3) обладает меланоцитстимулирующей активностью. Механизм действия – аденилатциклазный.

2. *Соматотропин* (СТГ). СТГ состоит из 191 аминокислоты. Обладает видовой специфичностью. Обеспечивает рост по периода полового созревания (деление клеток, рост костей в длину, задержка кальция, увеличение массы внутренних органов. Оказывает прямое и

опосредованное действие. Прямое действие связано с увеличением внутриклеточной концентрации цАМФ в тканях. Опосредованное действие обусловлено образованием в печени инсулиноподобных факторов (IGF-1 и IGF-2), которые обеспечивают анаболический эффект. При недостатке СТГ у детей (гипофизарная карликовость) отмечается нарушение развития тела и сохранение нормальных пропорций и психического развития. При гиперфункции в детском возрасте развивается гигантизм, у взрослых – акромегалия (увеличение отдельных участков тела).

3. *Тиротропин* (ТТГ). ТТГ представляет по химическому строению сложный белок – гликопротеин. Состоит из 2-х субъединиц - α и β . β -субъединица определяет биологическую активность, α необходима для проявления биологической активности β -субъединицы. Действует по аденилатциклазному механизму. Орган-мишень – щитовидная железа. ТТГ контролирует развитие и функцию щитовидной железы и регулирует биосинтез и секрецию в кровь тироидных гормонов.

4. *Фоллитропин* (ФСГ) и *лютропин* (ЛТГ). Являются сложными белками-гликопротеинами, состоящими из α и β -субъединиц. Фоллитропин вызывает созревание фолликулов в яичниках у женщин и сперматогенез у мужчин. Лютропин стимулирует секрецию эстрогенов и прогестерона, разрыв фолликулов у женщин и секрецию тестостерона и развитие интерстициальной ткани у мужчин. Оба гормона являются сложными белками-гликопротеинами, состоящими из α и β -субъединиц. Каждая из них в отдельности лишена биологической активности. Специфичность действия гормонов зависит от β -субъединиц (они отличаются), а α -субъединицы имеют сходное строение.

5. *Пролактин*. Состоит из 199 аминокислотных остатков. Является одним из самых древних гормонов. Основное действие – стимуляция развития молочных желез и лактации. Кроме того, стимулирует рост внутренних органов, секрецию желтого тела, оказывает гипергликемическое действие. Концентрация пролактина повышается в крови у женщин перед родами.

6. *α - и β -липотропные гормоны*. Биологическое действие – мобилизация жира из депо. Кроме того, отмечают кортикотропную, меланоцитстимулирующую и гипокальциемическую активности. Механизм действия – увеличение концентрации цАМФ.

В клетках переднего сегмента задней доли гипофиза (у животных – средней доли гипофиза) образуются *α - и β -меланоцитстимулирующие гормоны*. α -МСГ состоит из 13 аминокислот, β - из 18-22 аминокислотных остатков. Биологическая роль – стимуляция синтеза меланина и увеличение количества пигментных клеток (меланоцитов) в коже, радужке, пигментном эпителии сетчатки глаза. В жировой ткани оказывает жиромобилизующее действие.

Гормоны задней доли гипофиза (окситоцин и вазопрессин)

Относятся к гормонам задней доли гипофиза условно, поскольку синтезируются в особых нейронах гипоталамуса, откуда переносятся в заднюю долю гипофиза и поступают непосредственно в кровь. Для транспорта синтезированных гормонов в секреторные гранулы гипоталамуса и в гипофиз синтезируются специальные белки – нейрофизины I и II. По химическому строению представляют собой пептиды, состоящие из 9 аминокислот. Период полужизни 2-4 мин.

1. ***Вазопрессин (антидиуретический гормон).*** Орган-мишень – клетки дистальных канальцев почек, где вазопрессин связывается с клеточными рецепторами и увеличивает концентрацию цАМФ, что приводит к активации протеинкиназ и фосфорилированию мембранных белков почечных канальцев. Конечный эффект – увеличение реабсорбции воды. Вазопрессин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры сосудов, оказывая сильное вазопрессорное действие. При недостаточности секреции гормона развивается несахарный диабет – заболевание, характеризующееся выделением чрезвычайно больших количеств жидкости.

2. ***Окситоцин.*** Стимулирует сокращение гладких мышц матки и сокращение мышечных волокон, расположенных вокруг альвеол молочных желез, вызывающее секрецию молока. Усиливает синтез белка в молочной железе, оказывает инсулиноподобное действие на жировую ткань, усиливает потребление глюкозы и синтез триацилглицеринов. Механизм действия – увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ и ионов кальция.

14.5. Регуляция обмена белков, жиров и углеводов

В регуляции обмена белков, жиров и углеводов принимают участие гормоны поджелудочной железы (инсулин и глюкагон), коркового вещества надпочечников (кортикостероиды) и мозгового вещества надпочечников (норадреналин и адреналин).

Инсулин

1. ***Синтез инсулина.*** Синтез инсулина происходит в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Ген человеческого инсулина локализован в коротком плече 11 хромосомы. Инсулин синтезируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума в виде препроинсулина (М.м. 11500), который на N-конце содержит сигнальный пептид, состоящий из 16 аминокислот и направляющий пептидную цепь в просвет эндоплазматического ретикулума. В ЭПР сигнальный пептид отделяется и после замыкания дисульфидных связей образуется проинсулин (М.м. 9000). Биологическая активность проинсулина составляет 5% биологической активности инсулина. Проинсулин поступает в аппарат Гольджи, где в секреторных

везикулах происходит отщепление эквимольного количества С-пептида и образуется зрелый инсулин, который сохраняется в форме цинксодержащего гексамера вплоть до секреции. Мембраны секреторных пузырьков (гранул) в процессе секреции сливаются в плазматической мембраной клетки, а их содержимое высвобождается во внеклеточное пространство. Определение в крови концентрации С-пептида может быть использовано для определения функции поджелудочной железы при введении экзогенного инсулина или при невозможности прямого определения инсулина в сыворотке крови из-за наличия инсулиновых антител.

2. *Структура инсулина.* Молекула инсулина – полипептид, состоящий из 2-х цепей, А цепь (21 аминокислотный остаток) и В цепь (30 аминокислотных остатков). Цепи связаны между собой дисульфидными мостиками. Дисульфидные мостики локализованы между аминокислотными остатками А7-В7 и А20-В19. Третий дисульфидный мостик связывает между собой 6 и 11 аминокислотные остатки А цепи. Локализация всех трех дисульфидных мостиков постоянна.

Выделяют 3 консервативных участка в молекуле инсулина; 1) положение 3-х дисульфидных связей; 2) гидрофобные остатки в С-концевом участке В-цепи и 3) С- и N-концевые участки А-цепи.

Наиболее схожи по своему строению инсулин человека, свиньи (отличие по 1 аминокислоте) и быка (3 аминокислоты), что позволяет их использовать в качестве заместительной терапии при сахарном диабете.

Поджелудочная железа человека секретирует до 40-50 ед. инсулина в сутки, что соответствует 15-20% общего количества гормона в железе.

3. *Регуляция синтеза инсулина.* Повышение концентрации глюкозы в крови – главный физиологический стимул секреции инсулина. Пороговой для секреции инсулина является концентрация глюкозы натощак $>5,0$ ммоль/л, а максимальная секреция наблюдается при концентрации глюкозы 15-20 ммоль/л. Кроме того, стимулируют синтез и секрецию инсулина являются аминокислоты лейцин, глюкагон, гормон роста, кортизол, плацентарный лактоген, эстрогены и прогестерон. Ингибируется синтез инсулина адреналином.

4. *Дегградация инсулина.* В крови инсулин не имеет белков-переносчиков. Период полужизни 3-5 минут. Катаболизм инсулина происходят в основном в печени, почках и плаценте. Около 50% инсулина метаболизируется за один пассаж крови через печень. В дегградации инсулина участвуют 2 ферментативные системы: 1) инсулин-специфическая протеиназа, расщепляющая инсулин до аминокислот и 2) глутатион-инсулин-трансгидрогеназа, который восстанавливает дисульфидные мостики.

5. *Формы инсулина в крови.* Различают 3 формы инсулина в крови: 1) свободная форма инсулина – способствует утилизации глюкозы жировой и

мышечной тканью; 2) связанная с белками форма инсулина – влияет только на жировую ткань; 3) форма А – промежуточная форма инсулина, появляется в крови в ответ на быструю, срочную потребность организма в инсулине.

5. *Механизм действия инсулина.* По механизму действия инсулин относится к гормонам со смешанным механизмом действия. Эффект инсулина начинается со связывания со специфическим гликопротеиновым рецептором, который содержит много гликозильных остатков на поверхности клетки-мишени. Удаление сиаловых кислот и галактозы снижает способность рецептора связывать инсулин и активность гормона.

Рецептор для инсулина состоит из 2-х α и 2-х β -субъединиц, связанных дисульфидными мостиками. α -субъединица расположена вне клетки и осуществляет связывание инсулина. β -субъединица обладает тирозинкиназной активностью и содержит участок аутофосфорилирования. Фосфорилированные β -субъединицы активируют протеинкиназы и фосфатазы, оказывая биологическое действие. При связывании инсулина с рецептором происходит изменение конформации рецептора, гормон-рецепторный комплекс проникает в цитозоль путем эндоцитоза (интернализация), распадается и генерируется сигнал внутри клетки. Рецепторы могут подвергаться протеолизу или повторному процессингу и вновь встраиваться в мембрану. В качестве внутриклеточных посредников выступает сам инсулин, ионы кальция, циклические нуклеотиды, продукты распада фосфатидилинозитола, пептиды мембран.

Различные эффекты инсулина делятся на 1) быстрые, которые проявляются через несколько секунд или минут (деполяризация мембран, транспорт глюкозы и ионов, фосфорилирование белков, активация или ингибирование ферментов, синтез РНК) и 2) медленные – от нескольких часов до суток (синтез белка, ДНК, пролиферация клеток).

6. *Метаболические эффекты инсулина.*

Все органы делятся на инсулинчувствительные (мышечная, жировая ткани и частично печень) и инсулиннечувствительные (нервная ткань, эритроциты).

Основное биологическое значение инсулина – создание резерва веществ в организме. Поэтому инсулин стимулирует анаболические процессы и ингибирует катаболизм.

Обмен углеводов. Инсулин – единственный гормон, который снижает уровень глюкозы в крови по следующим механизмам.

1. Инсулин повышает проницаемость мембран мышечной и жировой тканей для глюкозы, увеличивая количество переносчиков для глюкозы и транслокацию их из цитозоля в мембрану. Гепатоциты хорошо проницаемы для глюкозы и инсулин способствует задержке глюкозы в клетках печени, стимулируя активность глюкокиназы и ингибируя глюкозо-6-фосфатазу. В результате быстро протекающего

фосфорилирования концентрация свободной глюкозы в гепатоцитах поддерживается на очень низком уровне, что способствует проникновению ее в клетки по градиенту концентрации.

2. Инсулин влияет на внутриклеточную утилизацию глюкозы следующими путями: 1) ~50% поглощенной глюкозы превращается в энергию (гликолиз); 2) 30-40% - в жиры и ~ 10% в гликоген.

3. Инсулин усиливает интенсивность гликолиза в печени, повышая активность ферментов глюкокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы. Более интенсивный гликолиз способствует более активной утилизации глюкозы и, следовательно, способствует снижению выхода глюкозы из клетки.

4. В печени и мышцах инсулин стимулирует синтез гликогена путем ингибирования аденилатциклазы и активации фосфодиэстеразы. В результате концентрация цАМФ уменьшается, что приводит к активации гликогенсинтазы и ингибированию фосфодиэстеразы.

5. Инсулин ингибирует глюконеогенез в результате уменьшения концентрации фосфоенолпируваткарбоксилазы (ингибирование транскрипции генов и синтез мРНК).

Обмен липидов.

1. Инсулин стимулирует липогенез в жировой ткани путем:

а) увеличения концентрации ацетил КоА и НАДФН₂, необходимых для синтеза жирных кислот в результате активации пируватдегидрогеназного полиферментного комплекса и пентозофосфатного пути распада глюкозы;

б) активации фермента ацетил-КоА-карбоксилазы, катализирующего превращение ацетил-КоА в малонил-КоА;

в) активации полиферментного комплекса синтазы высших жирных кислот путем дефосфорилирования;

г) увеличение притока глицерина, необходимого для синтеза триглицеридов;

2. В печени и жировой ткани инсулин ингибирует липолиз через снижение концентрации цАМФ и ингибирования гормон-чувствительной липазы;

3. Инсулин ингибирует синтез кетоновых тел в печени

4. Инсулин влияет на образование и клиренс ЛПОНП и ЛПНП.

Обмен белков. Инсулин оказывает анаболический эффект на обмен белков, поскольку он стимулирует синтез и тормозит распад белков. Инсулин стимулирует поступление нейтральных аминокислот в мышечную ткань. Влияние инсулина на синтез белков в скелетных мышцах и сердечных мышцах проявляется, вероятно, на уровне трансляции мРНК.

Пролиферация клеток. Инсулин стимулирует пролиферацию клеток в клеточных культурах и возможно участвует в регуляции роста *in vivo*.

Нарушение метаболизма инсулина. При недостатке инсулина развивается сахарный диабет. Примерно у 90% больных диабетом наблюдается инсулиннезависимый сахарный диабет II типа. Характерен для людей зрелого возраста. Для таких больных типичны ожирение, повышенное содержание в плазме инсулина и снижение количества инсулиновых рецепторов. У 10% наблюдается диабет I типа (инсулинзависимый, ювенильный), начинается в раннем возрасте. Обусловлен поражением поджелудочной железы различными факторами и снижением количества инсулина в крови. Разрушение β -клеток может быть вызвана лекарственными препаратами, вирусами, аутоиммунными процессами.

Метаболические изменения при диабете. Основными признаками инсулина являются: гипергликемия, кетоацидоз и гипертриглицеридемия. Гипергликемия обусловлена снижением утилизации глюкозы периферическими тканями и повышенной продукцией глюкозы за счет активации глюконеогенеза и гликогенолиза. Когда концентрация глюкозы превышает порог реабсорбции, глюкоза экскретируется с мочой (глюкозурия). Повышенная мобилизация жирных кислот приводит к повышенной продукции кетоновых тел и развитию кетоацидоза. При диабете повышается превращение жирных кислот в триацилглицеролы и секреция ЛПОНП и хиломикронов, что приводит к увеличению их концентрации в крови.

Глюкагон

Глюкагон – полипептид, состоящий из 29 аминокислот (м.м. 3500 Да). Основным местом синтеза глюкагона являются α -клетки островкового аппарата поджелудочной железы. Период полужизни около 15-20 минут. Инактивация гормона происходит в печени путем протеолиза.

Регуляция секреции. Секреция глюкагона подавляется глюкозой. На его секрецию влияют многие другие соединения – аминокислоты (аланин), жирные кислоты и кетоновые тела, гормоны ЖКТ и нейромедиаторы.

Метаболические эффекты глюкагона. Основные органы-мишени – печень и жировая ткань, в меньшей степени – мышцы.

1. *Обмен углеводов.* Глюкагон является основным гормоном, который повышает уровень глюкозы в крови. В печени глюкагон активирует глюконеогенез за счет увеличения синтеза фосфоенолпируваткарбоксикиназы и повышает расщепление гликогена (гликогенолиз). В результате увеличивается поступление глюкозы из печени в кровь. Глюкагон не влияет на распад гликогена в мышцах. Действие глюкагона опосредуется цАМФ.

2. *Обмен липидов.* В жировой ткани глюкагон через цАМФ увеличивает липолиз. Образующиеся в большом количестве жирные кислоты используются в качестве источника энергии или превращаются в кетоновые тела через ацетилКоА.

3. *Обмен белков.* Глюкагон активирует захват аминокислот печенью и стимулирует распад белков. Образованные аминокислоты используются для глюконеогенеза и после дезаминирования – для биосинтеза мочевины.

Гормоны мозгового вещества надпочечников (катехоламины)

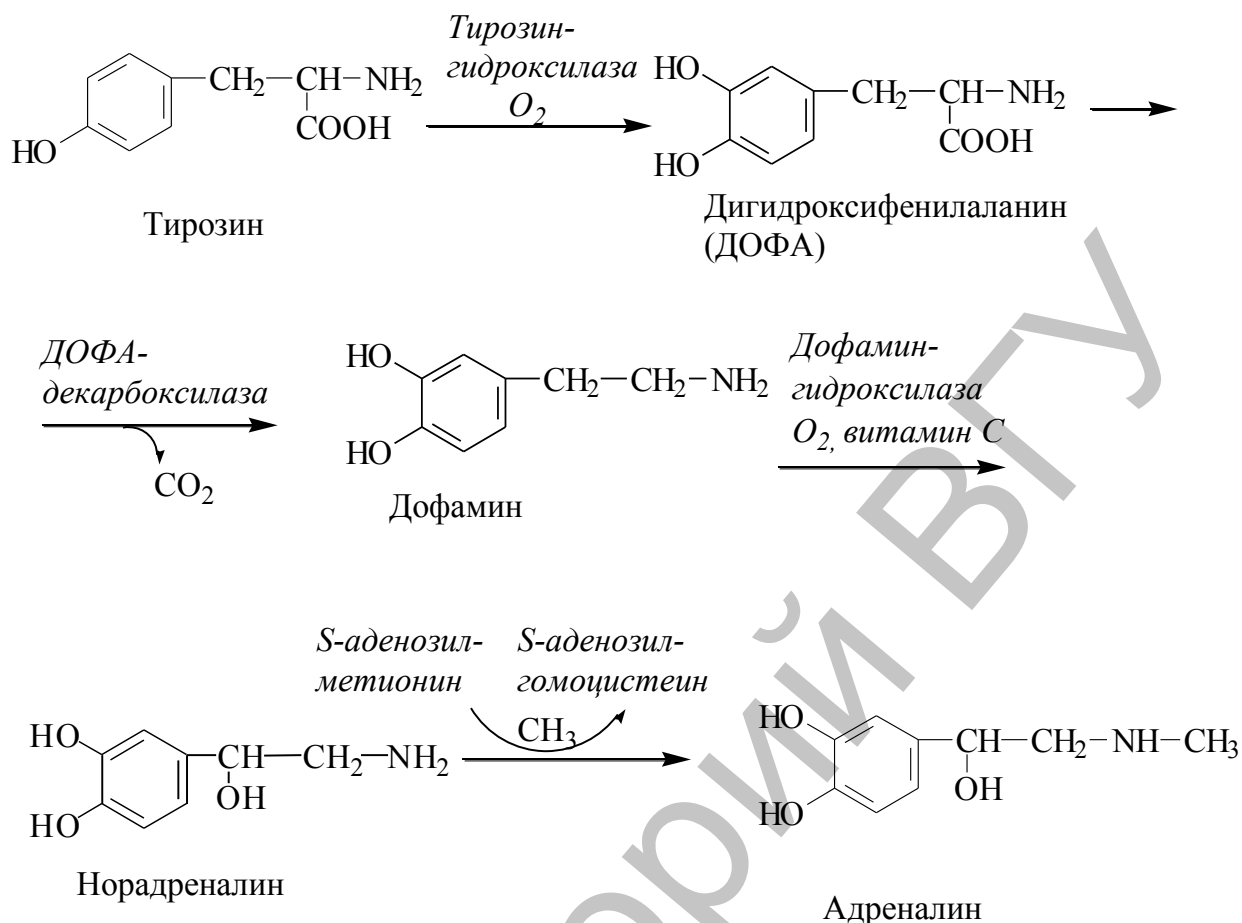
В мозговом веществе надпочечников синтезируются норадреналин и адреналин. Роль этих гормонов заключается в адаптации к острым и хроническим стрессам.

Синтез катехоламинов происходит в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников из аминокислоты тирозина. Свое название эти клетки получили потому, что содержат гранулы, окрашивающиеся под действием бихромата калия в красно-коричневый цвет. Главный продукт мозгового слоя надпочечников – адреналин, который составляет ~ 80% всех катехоламинов (1-3 мг/г адреналина и 0,2-0,6 мг/г норадреналина). Вне мозгового вещества адреналин не образуется. В отличие от него норадреналин, обнаруживаемый в органах, иннервируемых симпатическими нервами, образуется преимущественно *in situ*; остальная часть норадреналина образуется главным образом в окончаниях нервов и достигает своих мишеней с кровью.

Превращение тирозина в адреналин включает четыре последовательных этапа: 1) гидроксирование кольца, 2) декарбоксилирование, 3) гидроксирование боковой цепи, 4) N-метилирование. Благодаря метилированию адреналин приобрел способность циркулировать в кровеносном русле.

Запасание и секреция катехоламинов. В мозговом слое надпочечников содержатся хромаффинные гранулы – органеллы, способные к биосинтезу, поглощению, запасанию и секреции катехоламинов. Нервная стимуляция мозгового слоя надпочечников приводит к слиянию хромаффинных гранул с плазматической мембраной и, таким образом, обуславливает выброс норадреналина и адреналина путем экзоцитоза. Секретируемый надпочечниками адреналин попадает в печень и скелетные мышцы, но затем быстро метаболизируется. Катехоламины циркулируют в плазме в слабоассоциированном с альбумином виде. Период полужизни составляет 10-30 с. Концентрация норадреналина в плазме крови составляет 4 нмоль/л, адреналина – 2 нмоль/л. При стрессе количество катехоламинов увеличивается в 4-8 раз.

Метаболизм катехоламинов. Лишь очень небольшая часть адреналина (менее 5%) выделяется с мочой. Катехоламины быстро метаболизируются под действием катехол-О-метилтрансферазы (цитозольный фермент, обнаруживается во многих тканях) и моноаминоксидазы с образованием О-метилированных и дезаминированных продуктов, которые выводятся с мочой.



Механизм действия катехоламинов. Катехоламины действуют через 2 типа рецепторов: α -адренергические и β -адренергические. Каждый из них подразделяется на α_1 и α_2 , β_1 и β_2 . Адреналин связывается (и активирует) как с α -, так и с β -рецепторами, и поэтому его действие на ткань, содержащую рецепторы обоих классов, зависит от относительного сродства этих рецепторов к гормону. Норадреналин в физиологических концентрациях связывается главным образом с α -рецепторами.

При связывании с β -адренорецепторами активируется аденилатциклаза и увеличивается концентрация цАМФ. α -Адренорецепторы участвуют в процессах, ведущих к изменению внутриклеточной концентрации кальция или к изменению метаболизма фосфатидилинозитола.

Влияние на метаболизм.

1. **Обмен углеводов.** Адреналин активирует распад гликогена (гликогенолиз) в мышцах и в меньшей степени в печени, стимулирует синтез глюкозы в печени (глюконеогенез) и понижает поглощение глюкозы в мышцах и других тканях.

2. Адреналин уменьшает секрецию инсулина и увеличивает секрецию глюкагона, что приводит к повышению концентрации глюкозы в крови, которая используется в качестве источника энергии для мозга.

3. *Обмен липидов.* В жировой ткани адреналин и норадреналин стимулируют распад триацилглицеролов за счет повышения содержания цАМФ и активации гормон-чувствительной липазы. Жирные кислоты используются в качестве источника энергии для мышечной активности и, кроме того, могут активировать глюконеогенез в печени.

4. *Влияние на физиологические функции.* Действуя на сердце, адреналин увеличивает минутный объем в результате повышения силы (инотропный эффект) и частоты (хронотропный эффект) сердечных сокращений. Катехоламины вызывают расслабление гладкой мускулатуры бронхов, желудочно-кишечного тракта и кровеносных сосудов скелетных мышц. С другой стороны, катехоламины стимулируют сокращение гладкой мускулатуры сосудов кожи и почек.

Стероидные гормоны

К стероидным гормонам относятся гормоны коры надпочечников (глюкокортикоиды и минералокортикоиды) и половые гормоны (эстрогены, прогестерон и тестостерон).

Синтез стероидных гормонов происходит по общей схеме и регулируется гормонами гипофиза.

Стероидные гормоны образуются из холестерина, который поступает в периферическую эндокринную железу в составе ЛПНП или синтезируется внутриклеточно из ацетил-КоА. Значительная часть холестерина подвергается эстерификации и накапливается в цитоплазме в виде эфиров. При синтезе гормонов происходит активация холестеролэстеразы и образующийся свободный холестерол транспортируется в митохондрии, где превращается в общий промежуточный продукт – прегненолон. Прегненолон транспортируется в ЭПР, где через ряд промежуточных метаболитов превращается в стероидные гормоны.

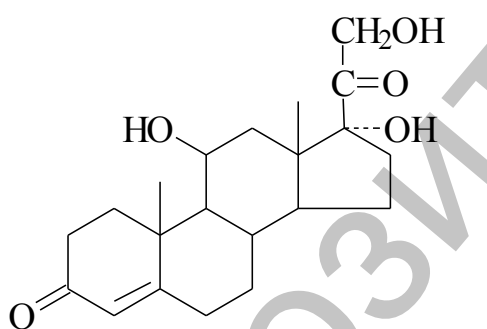
Кортикотропин в коре надпочечников и лютропин в половых железах влияют на следующим образом на синтез стероидных гормонов: 1) увеличивают число рецепторов для ЛПНП на поверхности мембраны клеток; 2) активируют холестеролэстеразу и способствуют образованию свободного холестерина; 3) активируют ферменты превращения холестерина в прегненолон в митохондриях; 4) стимулирует распад углеводов и липидов, обеспечивая стероидогенез энергетическим и пластическим материалом.

В крови 90-95% стероидных гормонов связаны с белками. Активные свободные формы гормона. По обратной связи стероидные гормоны тормозят продукцию тропных гормонов гипофиза. Период полужизни стероидных гормонов 0,5-1,5 часа. В печени, почках и других тканях гормоны модифицируются (восстановление двойных связей, гидроксирование и др.), что приводит к потере биологической активности. Повышение гидрофильности достигается образованием

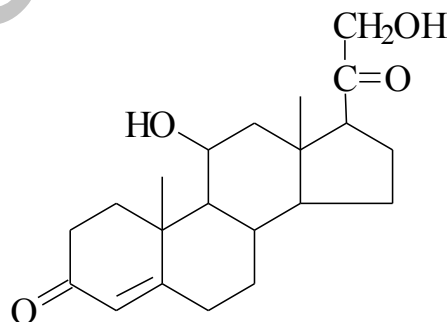
парных соединений (глюкуронаты, сульфаты, фосфаты), которые выводятся с мочой.

Гормоны коры надпочечников. Кора надпочечников взрослого человека состоит из трех четко различимых слоев, или зон. Субкапсулярная зона называется *клубочковой* зоной; она связана с продукцией *минералокортикоидов* (см. обмен воды и минеральных солей). Следующей идет *пучковая* зона; в ней, а также в *сетчатой* зоне вырабатываются *глюкокортикоиды* и андрогены. Из ткани коры надпочечников выделено и получено в кристаллическом виде около 50 стероидов. Большинство из них – промежуточные продукты; только немногие секретируются в значительном количестве и совсем малое число обладает значительной гормональной активностью. В целом наблюдается перекрывание их биологической активности; так, все природные глюкокортикоиды проявляют минералокортикоидный эффект и, наоборот, минералокортикоиды обладают глюкокортикоидной активностью.

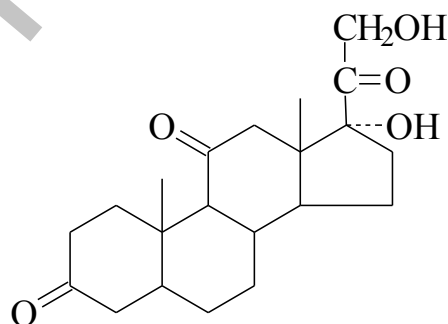
Глюкокортикоиды – стероиды, состоящие из 21 углеродного атома. В основе строение – циклопентанпергидрофенантроновая структура, в 3-м и 20-м положении – кетогруппа, двойная связь в 4,5 положении. Основной глюкокортикоид человека – кортизол, у грызунов – кортикостерон. Глюкокортикоиды играют важную роль в адаптации к сильным и продолжительным стрессам.



Кортизол (гидрокортизон)



Кортикостерон



Кортизон

Регуляция синтеза и секреции глюкокортикоидов осуществляется кортиколиберином гипоталамуса и кортикотропином гипофиза. В сутки

синтезируется 20-25 мг кортизола. Существует циркадный ритм выработки гормона. Увеличение синтеза происходит сразу после засыпания. Во время сна уровень кортизола продолжает возрастать, достигая пика вскоре после просыпания, затем постепенно падает до минимальных величин к концу дня и в ранние вечерние часы.

Транспорт в крови. Кортизол в плазме крови находится в связанной с белками и свободной форме. Основным связывающий белок плазмы крови - α -глобулин – *транскортин*. Транскортин синтезируется в печени и синтез его стимулируется эстрогенами. Меньшее количество кортизола транспортируется альбуминами. Период полужизни кортизола ~ 1,5-2 ч, у кортикостерона - < 1 часа (т.к. он менее сильно связывается с транспортными белками).

Метаболизм и экскреция. Метаболизм глюкокортикоидов в основном происходит в печени и включает восстановление двойных связей в первом кольце и 3-кетогруппы. Восстановленные метаболиты в печени подвергаются конъюгации с глюкуроновой или серной кислотами, благодаря чему они становятся липофильными и выводятся из организма. Около 70% конъюгированных стероидов экскретируется с мочой, 20% - с калом, остальное – через кожу. Небольшое количество кортизола при отщеплении боковой цепи превращается в 17-кетостероиды.

Органы-мишени: печень, почки, лимфоидная ткань (селезенка, лимфоузлы, лимфоциты, тимус и др.), соединительная ткань (кости, подкожная клетчатка, жировая ткань), скелетные мышцы.

Влияние на обмен веществ. По механизму действия глюкокортикоиды относятся к гормонам, проникающим в клетку, и, следовательно, влияют на экспрессию генов и синтез определенных белков. Само название «глюкокортикоиды» обусловлено способностью стимулировать образование глюкозы.

1. *Обмен углеводов.* Глюкокортикоиды способствуют повышению концентрации глюкозы в крови по следующим механизмам: **1)** увеличивают скорость глюконеогенеза в печени путем повышения количества (и активности) ключевых ферментов глюконеогенеза (пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы); **2)** стимулируют высвобождение аминокислот – субстратов глюконеогенеза – из периферических тканей (мышечная, лимфоидная) через активацию катаболических процессов; **3)** глюкокортикоиды тормозят потребление и использование глюкозы во внепеченочных тканях. В результате увеличивается уровень глюкозы в плазме крови. У здоровых людей это влияние уравнивается инсулином, оказывающим противоположный эффект; **4)** Глюкокортикоиды увеличивают запасы гликогена в печени путем увеличения активности гликогенсинтазы.

2. *Обмен липидов.* Глюкокортикоиды в мозговом веществе надпочечников индуцируют синтез метилтрансферазы, которая стимулирует образование адреналина из норадреналина и таким образом косвенно активирует липолиз в жировой ткани и увеличивает концентрацию свободных жирных кислот в крови. Избыточное количество глюкокортикоидов стимулирует липолиз в одних частях тела (конечности) и липогенез – в других (лицо и туловище).

3. *Обмен белков.* Глюкокортикоиды в целом оказывают анаболическое действие на обмен белков в *печени и почках* и катаболическое – в других органах (*мышцы, лимфоидная ткань, жировая ткань, кожа и кости*). Механизм анаболического действия обусловлен активацией специфических генов и соответствующим возрастанием скорости биосинтеза специфических белков. Блокада синтеза белка в лимфоидной ткани и активный протеолиз в ней увеличивают фонд аминокислот, которые поступают в кровь. В печени и почках эти аминокислоты используются для биосинтеза белка.

4. *Иммунная система.* Глюкокортикоиды в высокой концентрации тормозят иммунологический ответ организма-хозяина. Они вызывают гибель лимфоцитов и инволюцию лимфоидной ткани, что используется для подавления реакции отторжения при пересадке тканей.

5. *Противовоспалительный ответ.* Глюкокортикоиды обладают противовоспалительным действием. Механизм противовоспалительного действия обусловлен способностью ингибировать синтез простагландинов через ингибирование фермента фосфолипазы A_2 . Кроме того, глюкокортикоиды способствуют поступлению в костный мозг, лимфоидную ткань и селезенку лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов и выходу полиморфноядерных лейкоцитов из костного мозга. Они тормозят накопление лейкоцитов в участках воспаления, но стимулируют высвобождение из лейкоцитов веществ, участвующих в воспалительных реакциях (кининов, плазминоген-активирующего фактора, простагландинов и гистамина). Сочетание указанных эффектов приводит к плохому заживлению ран, повышенной чувствительности к инфекции и снижению воспалительного ответа, что обычно наблюдается у людей с избытком глюкокортикоидов. В костной ткани глюкокортикоиды тормозят деление клеток и синтез коллагена. Продолжительное действие этих гормонов приводит к остеопорозу.

При длительном стрессе в крови обнаруживается повышенная концентрация глюкозы, аминокислот, жирных кислот, кетоновых тел, в моче – глюкозурия, кетонурия, аминоацидурия. Это состояние называется стероидным диабетом.

14.6. Регуляция анаболических процессов, связанных с ростом и морфогенезом

К этой группе гормонов относят соматотропин, тироидные гормоны и половые гормоны.

Соматотропин

Соматотропин (гормон роста, ГР) синтезируется в ацидофильных клетках гипофиза. По химической структуре – полипептид, состоящий из 191 аминокислоты, с молекулярной массой около 22 000 Да. Обладает *видовой специфичностью*.

Регуляция синтеза ГР осуществляется *соматолиберином* и *соматостатином* гипоталамуса.

На секрецию ГР влияет ряд стимулов (сон, стресс). Секреция ГР, как и многих гипофизарных гормонов, носит эпизодический, пульсирующий характер. В течение нескольких минут уровень ГР в плазме может изменяться в 10 раз. Один из самых больших пиков отмечается вскоре после засыпания, что подтверждает поговорку: «Кто не спит, тот не растет». К другим стимулам секреции относят стресс (боль, холод, тревога, хирургическое вмешательство), физические упражнения, острая гипогликемия или голодание, белковая пища или аминокислота аргинин. Реакции на стресс могут быть опосредованы катехоламинами, действующими через гипоталамус.

Физиологические эффекты ГР.

ГР необходим для *постнатального роста* и для нормализации углеводного, липидного, азотного и минерального обменов.

Различают *прямое* действие ГР (через образование цАМФ) и *опосредованное* через стимуляцию выработки IGF-1 и IGF-2.

Ростовые эффекты ГР опосредуются главным образом через инсулиноподобные факторы роста (IGF-1, IGF-2), которые синтезируются в печени. IGF-1 состоит из 70 аминокислот и по строению он сходен с проинсулином. Первоначально был известен как «сульфатирующий фактор», благодаря своей способности стимулировать включение сульфата в хрящ. Позднее его стали называть соматомедин С. В плазме крови обнаруживается еще один инсулиноподобный фактор – IGF-2 (67 аминокислот), обладающий митогенной стимулирующей активностью. Содержание в плазме крови IGF-2 в два раза выше, чем IGF-1, но эффекты соматотропина тесно коррелируют с IGF-1. Некоторые авторы считают, что в печени образуются до 7 типов соматомединов, которые опосредуют действие соматотропина (А,В,С). К биологическим эффектам соматомединов в хрящевой ткани относится: 1) стимуляция включения $^{35}\text{SO}_4$ в протеогликаны; 2) стимуляция включения тимидина в ДНК; 3) стимуляция синтеза РНК; 4) стимуляция синтеза белков.

Метаболические эффекты.

1. *Обмен белков.* 1) ГР обладает анаболическим эффектом на метаболизм белков. 2) ГР стимулирует транспорт аминокислот в мышечные ткани и усиливает биосинтез белка. 3) ГР вызывает положительный азотистый баланс, что отражает общее повышение белкового синтеза и снижение содержания аминокислот и мочевины в плазме крови и моче. Это сопровождается повышением уровня синтеза РНК и ДНК. По эффекту на синтез белка гормон роста сходен с действием инсулина.

2. *Обмен углеводов.* 1) По влиянию на обмен углеводов ГР является антагонистом инсулина. 2) ГР снижает утилизацию глюкозы периферическими тканями и активирует глюконеогенез. В результате развивается гипергликемия. 3) ГР увеличивает содержание гликогена в печени в результате активации глюконеогенеза из аминокислот. 4) ГР ингибирует гликолиз в мышцах, что связано с мобилизацией жирных кислот при липолизе. Поэтому при избыточной продукции ГР может развиваться сахарный диабет.

3. *Обмен липидов.* 1) ГР усиливает липолиз и повышает концентрацию свободных жирных кислот и глицерина в крови. 2) ГР усиливает окисление жирных кислот в печени. При недостаточности инсулина (например, при диабете) может возрастать кетогенез.

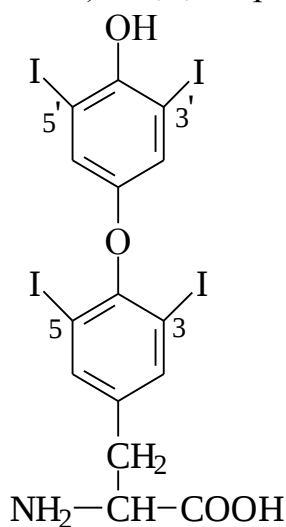
4. *Обмен минеральных веществ.* ГР или, что более вероятно, IGF-1 способствует положительному азотистому балансу кальция, магния и фосфата и вызывает задержку Na^+ , K^+ и Cl^- . Первый эффект, возможно, связан с действием ГР на кости: он стимулирует рост длинных костей в области эпифизарных пластинок у детей и аппозиционный или акральный рост у взрослых. У детей ГР усиливает образование хряща.

5. *Пролактиноподобные эффекты.* ГР связывается с лактогенными рецепторами и обладает свойствами пролактина, в частности способностью к стимуляции молочных желез и лактогенеза.

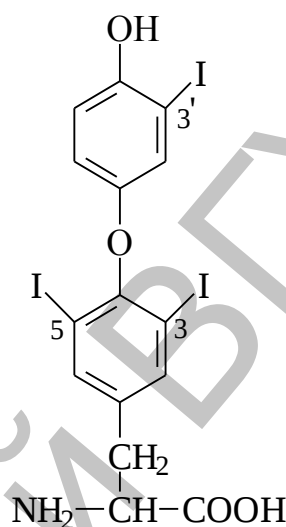
Нарушение синтеза ГР. Недостаточность ГР особенно опасна у детей, поскольку нарушает их способность к нормальному росту. При недостатке СТГ у детей (*гипофизарная карликовость*) отмечается нарушение пропорционального развития тела и сохранение нормальных пропорций и психического развития. Избыток ГР в детском возрасте приводит к развитию *гигантизма*. Избыточная секреция у взрослых – *акромегалия*. Акральный рост костей приводит к характерным изменениям лица (выступающая челюсть, огромный нос), увеличение размеров кистей, стоп и черепа. Другие симптомы включают разрастание внутренних органов, истончение кожи, метаболические расстройства (сахарный диабет).

Тироидные гормоны

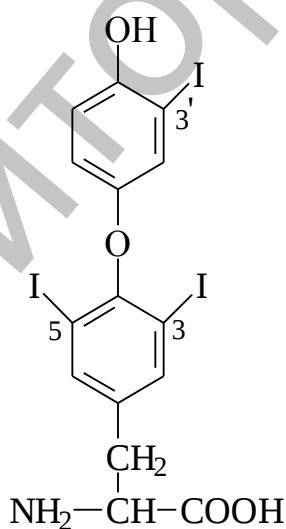
Тироидные гормоны синтезируются в щитовидной железе. Основными тироидными гормонами являются 3,5,3',5'-тетрайодтиронин (тироксин, T₄) и 3,5,3'-трийодтиронин (T₃).



3,3',5,5'-тетрайодтиронин
(тироксин, T₄)



3,3',5-трийодтиронин (T₃)



3,3',5'-трийодтиронин (реверсивный T₃)

Биосинтез тироидных гормонов

Отличительная особенность тироидных гормонов состоит в том, что для их биологической активности требуется микроэлемент йод. Почти во всех континентах света йод является следовым компонентом почвы и поэтому в малых количествах присутствует в пище. Более половины йода, содержащегося в организме, находится в щитовидной железе.

1. Синтез тироидных гормонов происходит в *фолликулах щитовидной железы*. Для синтеза гормонов необходим белок тироглобулин, который синтезируется в эпителиальных клетках щитовидной железы и хранится во внеклеточном коллоиде. Тироглобулин – гликозилированный белок с молекулярной массой около 660 000 Да. Каждая молекула тироглобулина содержит около 5500 остатков аминокислот, включая 140 остатков тирозина. Из этих 140 остатков только от 2 до 5 остатков тирозина превращается в T_3 или T_4 .

2. Для синтеза тироидных гормонов необходим *йод*. Йод поступает в щитовидную железу против высокого электрохимического градиента. Этот процесс сопряжен с работой Na^+, K^+ -АТФ-азы. *Активный* транспорт необходим, поскольку существует 500-кратный градиент иодида натрия снаружи и внутри фолликулярных клеток. Незначительное количество йода поступает в железу путем *простой диффузии*.

3. В фолликулярной клетке происходит окисление йода в иодиниум ($I \rightarrow I^+$) с помощью фермента *йодпероксидазы* с использованием *перекиси водорода* как кофактора. Щитовидная железа – единственная ткань, способная окислять йод. Ряд соединений тормозит окисление йода и, следовательно, его включение в гормоны. Наибольшее значение имеют соединения тиомочевины (тиоурацил, метимазол и др.), что используется для подавления биосинтеза гормонов щитовидной железы.

4. Окисленный йод реагирует с тирозильными остатками тироглобулина. Тирозин тироглобулина вначале йодируется в 3-м и 5-м положении и образуется моно- (МИТ) и дийодтирозила (ДИТ). Конденсация 2-х молекул йодированного тирозина приводит к образованию T_3 и T_4 в составе тироглобулина. Образовавшиеся гормоны остаются в составе тироглобулина до начала его деградации.

Регуляция синтеза. Главными факторами, регулирующими выработку T_3 и T_4 является *тиролиберин* гипоталамуса и *тиротропин* гипофиза. Стимулом для повышенной секреции тиролиберина и тиротропина служит снижение содержания тироидных гормонов в крови. У маленьких детей стимулирующим фактором для синтеза тиролиберина является холод, поскольку известна роль тироидных гормонов в теплопродукции. Тиролиберин гипоталамуса стимулирует выделение тиротропина. Соматотропин ингибирует выделение тиротропина. Циркулирующие в крови T_3 и T_4 подавляют секрецию тиролиберина и тиротропина; T_4 подавляет синтез тироглобулина.

Тиротропин оказывает следующие эффекты: 1) стимулирует активный транспорт I^- в полость фолликула за счет цАМФ-зависимого фосфорилирования белков клеточных мембран; 2) усиливает транскрипцию и трансляцию тироглобулина; 3) стимулирует рост эпителиальных клеток, формирующих фолликулы; в фолликулярном коллоиде – йодирование тирозилов; 4) по аденилатциклазному механизму

стимулирует синтез T_3 , T_4 (аналогично действуют адреналин и ПГЕ₂); 5) стимулирует секрецию йодированного тироглобулина путем пиноцитоза и отщепления T_3 и T_4 .

Метаболизм тироидных гормонов. Преобладающей метаболически активной молекулярной формой гормона является T_3 , поскольку он связывается с рецепторами клеток-мишеней со сродством в 10 раз превышающим сродство T_4 . Основное количество тироидных гормонов секретируется в виде T_4 . Около 80% циркулирующего T_4 превращается на периферии (в основном в печени и почках) в T_3 или реверсивный T_3 и этот процесс служит главным источником T_3 . Реверсивный T_3 представляет собой очень слабый агонист гормона.

Другие пути метаболизма тироидных гормонов включают дейодирование, дезаминирование или декарбоксилирование. Образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой или сульфатом приводит к образованию гидрофильных молекул, которые выводятся с мочой.

Транспорт тироидных гормонов. Тироидные гормоны *липофильны*, поэтому 99% гормона циркулирует в крови в комплексе с белками. Основные переносчики тироидных гормонов – *тироксин-связывающий глобулин* – гликопротеин и *тироксин-связывающий преальбумин*. ТСГ синтезируется в печени. Белки-переносчики позволяют создать резерв гормона в организме, освобождение которого происходит в тканях-мишенях. Биологическая активность гормонов обуславливается небольшой несвязанной (свободной) фракцией. Период полужизни T_4 – 7 дней, T_3 – 16 часов.

Механизм действия. Йодтиронины действуют на многие ткани организма, хотя наиболее чувствительны *печень, сердце, почки, скелетные мышцы*; в меньшей степени *жировая и нервная ткани*. В клетках-мишенях предполагают наличие цитозольных, митохондриальных и ядерных рецепторов (не исключены и мембранные рецепторы).

Последовательность проявления гормонального эффекта: 1) T_4 отщепляется от транспортных белков плазмы и переносится внутрь клетки. В случае связывания с мембранным рецептором усиливается поступление аминокислот в клетку. 2) На мембранах эндоплазматического ретикулума T_4 дейодируется в T_3 . 3) T_3 связывается с хроматиновым рецептором (его сродство к рецептору в 100-1000 раз выше, чем у T_4). 4) Результатом связывания T_3 с хроматиновым рецептором является повышение активности РНК-полимеразы, синтеза мРНК и трансляция более 100 типов белков. В эмбриогенезе усиливается синтез специфических белков, обеспечивающих развитие и дифференцировку тканей.

Влияние на метаболизм.

1. Основная метаболическая функция тироидных гормонов – стимуляция метаболической активности и *повышение потребления кислорода* в большинстве тканей (исключение мозг, легкие, семенники и

сетчатка). Согласно гипотезе Эдельмана и соавторов большая часть энергии клетки утилизируется при работе Na^+ , K^+ -АТФазного насоса. Тироидные гормоны повышают функцию этого насоса и увеличивают число единиц АТФазы. Повышение утилизации АТФ ассоциируется с повышением потребления кислорода через механизмы окислительного фосфорилирования. Повышенный обмен АТФ (образование и использование) определяет теплопродукцию.

2. *Обмен белков.* Тироидные гормоны действуют как анаболические гормоны, вызывают положительный азотистый баланс и обеспечивают рост и развитие. Однако, высокая концентрация T_3 ингибирует синтез белков и вызывает отрицательный азотистый баланс. Проявления действия йодтиронинов в норме: 1) на уровне клетки – пролиферация, рост, дифференцировка. 2) на уровне организма – нормальный рост и правильное развитие тканей, органов. Следует учитывать взаимоотношения тироидных гормонов и соматотропина. T_3 и глюкокортикоиды повышают транскрипцию гена соматотропина, что приводит к усиленной продукции гормона роста.

3. *Обмен углеводов.* Тироидные гормоны способствуют всасыванию глюкозы, активируют глюконеогенез и гликогенолиз, повышая уровень глюкозы в крови.

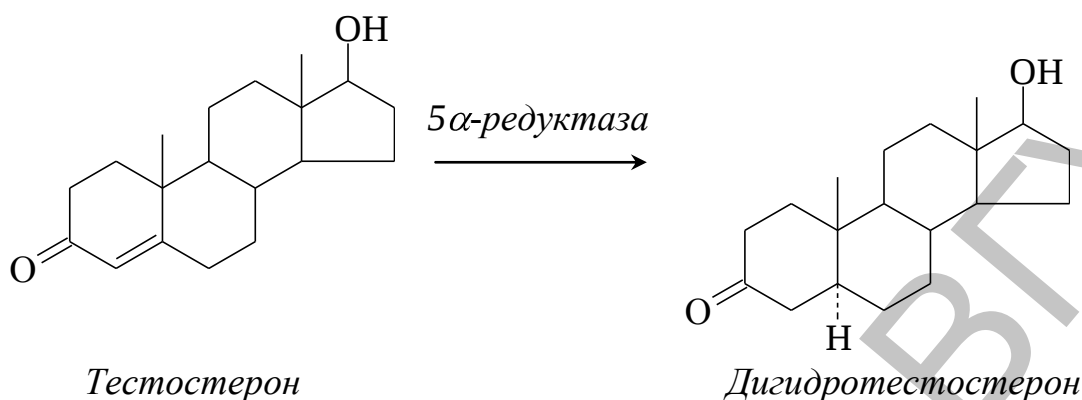
4. *Обмен липидов.* Тироидные гормоны активируют обмен и окисление липидов.

Нарушения функции щитовидной железы. 1) Гипофункция щитовидной железы в детском возрасте – *кретинизм* (снижение и замедление метаболизма, физического и умственного развития). 2) Гипофункция щитовидной железы в зрелом возрасте – *микседема* (нарушение водно-солевого, липидного обменов на фоне замедления метаболизма – ожирение и отеки). 3) Недостаточность йода в воде и растениях в регионах – *эндемический зоб* (увеличение щитовидной железы преимущественно за счет разрастания соединительной ткани). 4) *Радиационно-индуцированные поражения щитовидной железы* преимущественно у детей (воздействие в первые две недели после аварии на Чернобыльской АЭС) – чаще гипотироидные состояния (уменьшение T_3), но возможны гипертироидные состояния, гиперплазии и рак. 5) Повышение функции щитовидной железы (*тиротоксикоз*, Базедова болезнь). Избыток T_3 ингибирует синтез белков, вызывает отрицательный азотистый баланс, мобилизацию липидов, углеводов; усилена теплопродукция.

Мужские половые гормоны

Семенники – бифункциональные органы, продуцирующие тестостерон (мужской половой гормон) и сперматозоиды (мужские половые клетки). Суточная секреция тестостерона составляет около 5 мг. Активной формой гормона является дигидротестостерон, который

образуется в периферических тканях (семенные пузырьки, предстательная железа, наружные половые органы и некоторые участки кожи) из тестостерона под действием фермента 5α -редуктазы.



Транспорт тестостерона. В плазме тестостерон и дигидротестостерон транспортируются тестостерон-эстроген-связывающим (секс-гормон-связывающим) глобулином, образуемым в печени. Его продукция усиливается под действием эстрогенов.

Метаболизм тестостерона. Метаболические превращения тестостерона осуществляются по 2-м путям. 1) Окисление в 17-м положении и образование 17-кетостероидов. В печени 17-кетостероиды образуют конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотой и выделяются с мочой, желчью и калом. 2) Восстановление двойной связи кольца А и 3-кетогруппы происходит преимущественно в тканях-мишенях и ведет к образованию потенциальных метаболитов дигидротестостерона.

Регуляция синтеза. Функция семенников регулируется ЛГ и ФСГ. ЛГ стимулирует стероидогенез и образование тестостерона, связываясь с рецепторами на плазматической мембране клеток и увеличивая концентрацию цАМФ. В результате ускоряется процесс отщепления боковой цепи холестерина. ФСГ стимулирует синтез андроген-связывающего белка (АСБ). Этот белок представляет собой гликопротеин, связывающий тестостерон и транспортирующий его к месту сперматогенеза.

Классические ткани-мишени: предстательная железа, семенные пузырьки, наружные половые органы, кода половых органов. Мишени для тестостерона: эмбриональный вольфов проток, сперматогонии, мышцы, кости, почки, мозг.

Физиологические и биохимические функции андрогенов: 1) половая дифференцировка плода; 2) сперматогенез; 3) развитие вторичных половых признаков; 4) стимуляция анаболических процессов; 5) определение психофизиологического статуса мужчины.

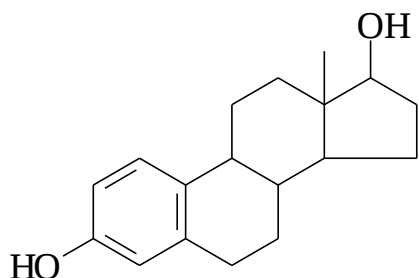
Механизм действия андрогенов. Свободный тестостерон проникает в клетки через плазматическую мембрану путем пассивной или облегченной

диффузии. В цитоплазме многих клеток имеется фермент, 5 α -редуктаза, под действием которого тестостерон превращается в дигидротестостерон. Комплекс тестостерон/дигидротестостерон проникает в ядро и активирует специфические гены, что обеспечивает синтез белка в мужских половых органах.

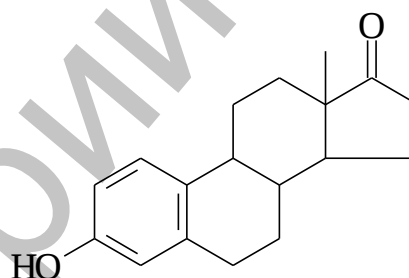
Нарушение секреции андрогенов. Снижение синтеза тестостерона называют гипогонадизмом. При гипогонадизме у лиц, не достигших половой зрелости, вторичные половые признаки не развиваются. Если гипогонадизм развивается у взрослых мужчин, эти признаки претерпевают обратное развитие.

Женские половые гормоны

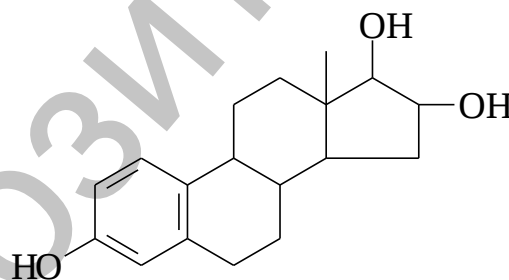
Яичники – бифункциональные органы, продуцирующие женские половые гормоны – *эстрогены* и *прогестины*, а также женские половые клетки – яйцеклетки. Наиболее активные гормоны, вырабатываемые в яичниках – эстрадиол и прогестерон.



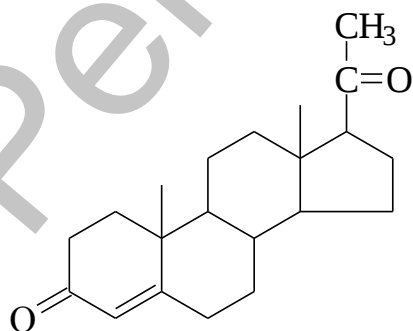
Эстрадиол



Эстрон



Эстриол



Прогестерон

Синтез гормонов. Эстрогены образуются путем ароматизации андрогенов. В синтезе участвуют 2 типа клеток – в клетках теки происходит синтез тестостерона, а в клетках гранулезы – происходит ароматизация тестостерона и образование эстрадиола. Прогестерон синтезируется желтым телом. Синтез гормонов осуществляется в рамках полового цикла.

Фолликулярная фаза. В конце менструации концентрация эстрогенов низкая. По механизму обратной связи происходит увеличение секреции ФСГ и ЛГ. Это ведет к росту группы фолликулов, продуцирующих эстрогены. Под влиянием ФСГ начинает увеличиваться один из фолликулов, остальные атрофируются. В первую неделю фолликулярной фазы содержание эстрадиола остается низкими, но по мере увеличения фолликула начинает прогрессивно повышаться. За 24 ч до пика ЛГ (ФСГ) уровень эстрогенов достигает максимума и сенсibiliзирует гипофиз к действию гонадолиберина. Выброс ЛГ обуславливается либо этим высоким уровнем эстрогенов по механизму положительной обратной связи, либо резким падением его уровня. Содержание прогестерона в фолликулярной фазе очень мало.

Лютеиновая фаза. После овуляции на месте лопнувшего фолликула образуется желтое тело – структура, которая начинает вырабатывать прогестерон и незначительное количество эстрогенов. Прогестерон необходим для формирования секреторного эндометрия, обеспечивающего нужные условия для развития имплантированной яйцеклетки. На первых порах сохранение желтого тела требует присутствия ЛГ и гипофиз в течение примерно 10 дней выделяет этот гормон. Если имплантация произошла – функцию ЛГ берет на себя хорионический гонадотропин (ХГТ) – плацентарный гормон, очень близкий к ЛГ, вырабатываемый цитотрофобластными клетками имплантированного эмбриона на ранних стадиях развития. ХГЧ поддерживает синтез прогестерона желтым телом до тех пор, пока плацента не начнет продуцировать большие количества прогестерона.

Секреция и транспорт гормонов. Уровень секреции гормонов яичников меняется в зависимости от менструального цикла и зависит от скорости образования их в яичниках. Эти гормоны не накапливаются, а секретируются по мере их синтеза.

Эстрогены транспортируются секс-гормон-связывающим глобулином, прогестины – кортикостероисвязывающим глобулином. Биологической активностью обладают свободные формы гормона. Связывающие белки обеспечивают резерв гормона в крови. Скорость метаболизма гормонов находится в обратной зависимости от сродства к белкам-переносчикам. Клиренс эстрогена выше клиренса эстрадиола.

Метаболизм и экскреция. В печени эстрадиол и эстрон превращаются в эстриол. С помощью ферментативных систем происходит

превращение эстрогенов в конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотами. Конъюгированные стероиды выводятся с желчью, калом и в меньшей степени с мочой. Процесс метаболизма происходит очень быстро. Поэтому пероральное применение эстрогенов неэффективно.

Прогестерон в печени быстро метаболизируется, образуя ряд соединений. Прегнандиол-20-глюкуронид натрия – основной метаболит прогестина, обнаруживаемый в моче человека. Некоторые синтетические стероиды обладают активностью прогестина и не подвергаются в печени никаким превращениям. Поэтому они широко используются в качестве пероральных контрацептивов.

Механизм действия. Основные эффекты эстрогенов и прогестина обусловлены их способностью присоединяться к внутриклеточным рецепторам. Образующийся гормон-рецепторный комплекс связывается со специфическими участками хроматина или ДНК, что приводит к изменению скорости транскрипции специфических генов.

Физиологические и биохимические функции эстрогенов. Основная функция яичниковых гормонов – подготовка структурных компонентов женской половой системы к размножению.

1. Влияние на репродуктивную систему: а) развитие органов половой сферы; б) формирование вторичных половых признаков; в) процессы в фолликулиновую фазу цикла; г) психофизический статус женщины; д) протекание беременности, родов, лактации.

2. Биохимические функции: а) повышают липогенез в жировой ткани и поэтому содержание жиров в организме женщин на 5% больше, чем мужчин; б) снижают уровень холестерина и ЛПНП в плазме крови и повышают уровень ЛПВП; в) в печени усиливают синтез ряда специфических белков: белков-переносчиков стероидных и тиреоидных гормонов, факторов свертывания крови II, VII, IX, X, субстрата ренина – ангиотензиногена, ЛПВП, ЛПОНП; г) для эстрогенов характерен анаболический эффект и положительный азотистый баланс; д) эстрогены активируют гликолиз, пентозофосфатный путь (восстановительные синтезы); е) способствует кальцификации и росту костей; ж) оказывают тормозящее действие на Na^+, K^+ -АТФазу, что вызывает деполяризацию мембран миомерия, повышение его возбудимости и сократимости.

Эстрогены и прогестерон как бы дополняют регуляторные эффекты друг друга на обмен веществ, рост, развитие тканей и органов. Как правило, эффекты прогестерона возможны на фоне предварительного действия на ткани эстрогенов. Механизм действия этих проникающих в клетку гормонов связан с усилением матричных синтезов белков.

Функции прогестерона. Прогестерон действует только в период функционирования желтого тела и обеспечивает: 1) торможение сокращения матки и труб; 2) подготовку и имплантацию оплодотворенной

яйцеклетки; 3) лактацию; 4) снижение возбудимости гиппокампа, центра терморегуляции и сексуальной реактивности.

14.7. Регуляция обмена воды и минеральных солей

Минеральные вещества делятся на *макро-* и *микроэлементы*. Макроэлементы содержатся в организме в г и суточная потребность их составляет >100 мг. К ним относятся калий (K), натрий (Na), кальций (Ca), магний (Mg), хлор (Cl), фосфор (P), сера (S) и йод (I). Микроэлементы содержатся в организме в мг и мкг. Суточная потребность составляет менее 100 мг. К ним относятся Fe, Zn, Cu, Br, Mn, Co, Al и др.

Функции минеральных веществ: 1) создание осмотического давления в тканях; 2) образование буферных систем и поддержание pH; 3) образование комплексных соединений с белками, нуклеиновыми кислотами, что приводит к изменению их конформации и физиологических свойств; 4) компоненты некоторых биологически важных соединений (Hb – Fe, тироксин – I, инсулин – Zn, витамин B₁₂ – Co); 5) участие в ферментативном катализе: могут являться кофакторами (Mg, Mn, Cu, Zn, K), входить в состав ферментов (Co, Mo, Se), фермент-субстратных комплексов или служить эффекторами.

Кальций

Кальций является наиболее распространенным минеральным веществом организма. Содержание кальция в организме составляет 1-1,5 кг. Кальций – это внеклеточный катион: в плазме крови содержание кальция – 2-2,8 ммоль/л. 99% кальция локализовано в костях и зубах, где вместе с фосфатом он образует кристаллы гидроксиапатита, составляющие структурный компонент скелета. Остеобласты – клетки, отвечающие за формирование костной ткани, остеокласты – за деминерализацию. Большая часть кальция кости не может свободно обмениваться с кальцием внеклеточной жидкости. Около 1% кальция скелета составляет легкообменивающийся пул, еще 1% находится в периостальном пространстве (надкостнице) и эти два источника образуют мобильную фракцию Ca²⁺.

Функции кальция: 1) построение костной ткани; 2) мышечное сокращение; 3) свертывание крови; 4) передача нервного импульса; 5) активатор ферментов; 6) внутриклеточный посредник в действии гормонов; 7) поддержание целостности мембран и транспорт через мембраны; 8) активатор ферментов; 9) высвобождение гормонов; 10) секреторные процессы (экзоцитоз, эндоцитоз); 11) межклеточное взаимодействие.

Суточная потребность – 800 мг, женщины во время беременности и лактации – 1,5 г. *Источники* – молоко, молочные продукты, бобовые, рыба, яйца, капуста, зеленые части овощей.

В крови Ca^{2+} присутствует в трех формах: 1) в комплексе с органическими и неорганическими кислотами; 2) в связанной с белками форме и 3) в ионизированном виде. В комплексы с цитратом, фосфатом и другими анионами вовлечено около 6% общего кальция. Остальное количество Ca^{2+} распределяется почти поровну между связанной с белками и ионизированной (несвязанной) формой. Ионизированный кальций (Ca^{2+}), концентрация которого у большинства млекопитающих, птиц и пресноводных рыб поддерживается в пределах 1,1-1,3 ммоль/л – это биологически активная фракция.

Организм обладает очень малой толерантностью к значительным отклонениям уровня Ca^{2+} от указанных границ. В случае снижения уровня кальция у животных нарастают явления повышенной возбудимости (вплоть до возникновения тетанических судорог). Заметное повышение ионизированного кальция в плазме может привести к смерти из-за паралича мышц и комы.

Ион Ca^{2+} и парный ему ион фосфата присутствуют в плазме крови в концентрациях, близких к пределу растворимости их соли. Поэтому связывание Ca^{2+} с белками предупреждает возможность образования осадка и эктопической кальцификации. При изменении концентрации белков плазмы (альбуминов) изменяется уровень общего Ca^{2+} в плазме крови.

Экскреция: Ca^{2+} выводится из организма через почки и кишечник.

Фосфор

Содержание фосфора в организме около 1 кг. Более 80% фосфора находится в комплексе с ионами Ca^{2+} в костях и зубах, около 10% - в мышцах и крови в комплексе с белками, липидами и углеводами, остальные 10% - в составе других органических компонентах.

Функции: 1) компонент костей; 2) образование важнейших органических соединений (АТФ, ГТФ, креатинфосфат, фосфолипиды, фосфопротеины, нуклеиновые кислоты, коферменты – НАДФ⁺, пиридоксальфосфат и др.); 3) участие в регуляции активности молекул путем фосфорилирования; 4) образование фосфатной буферной системы.

Суточная потребность определяется поступлением кальция. Оптимальное соотношение Са:Р 1:1 (т.е. 800 мг/день) у взрослых и 2:1 у детей.

Источники: молоко, злаки, зеленые части овощей, яйца, мясо.

Всасывание фосфора происходит в тонком кишечнике. Всасывание кальция и фосфора оптимально, если их соотношение в пище 1:2 - 2:1.

В сыворотке крови фосфат существует в виде свободного иона (40%), в виде комплексов с катионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ (50%), около 10% связано с белками.

Экскреция: фосфор выводится из организма с мочой.

Регуляция обмена кальция и фосфора

В механизм, поддерживающий концентрацию кальция вовлечены 3 гормона: паратгормон, кальцитриол и кальцитонин, которые действуют на три органа – кости, почки и кишечник.

Паратгормон – пептид, состоящий из 84 аминокислот (мол. масса 9500 Да). Синтезируется в паращитовидных железах. Синтез и секреция ПТГ увеличивается при *снижении концентрации Ca^{2+} в крови*. В паращитовидных железах мало накопительных гранул и количества гормона в них может обеспечить максимальную секрецию лишь в течение 1,5 ч. Концентрация гормона в крови подвержена суточным ритмам. Около 2 часов дня отмечается увеличение концентрации гормона в крови на 50%, в 9 часов вечера отмечается снижение на 50% концентрации гормона в крови.

Механизм действия. Паратгормон – гормон, не проникающий в клетку. В тканях-мишенях гормон связывается с рецепторами на поверхности мембран, что приводит к активации аденилатциклазы и увеличению концентрации цАМФ и фосфолипазы С (продукция инозитол-3-фосфата) с последующей мобилизацией кальция из внутриклеточного депо.

Различают 3 органа-мишени: кости, почки и кишечник.

В костной ткани паратгормон стимулирует остеокласты и усиливает деструкцию кости, сопровождающуюся высвобождением кальция, фосфора и органического матрикса.

В почках ПТГ оказывает прямое влияние на реабсорбцию ионов и опосредованное через стимуляцию образования активной формы витамина Д – кальцитриола. В нормальных условиях свыше 90% Ca^{2+} , содержащегося в клубочковом фильтрате, подвергается реабсорбции. Паратгормон увеличивает эту величину до 98% и более. Паратгормон тормозит реабсорбцию фосфора и транспорт натрия, калия и бикарбонатов.

ПТГ не оказывает прямого влияния на слизистую кишечника, но стимулирует всасывание Ca^{2+} через образование активной формы витамина Д в почках.

Конечный эффект действия ПТГ – повышение концентрации Ca^{2+} в крови.

Кальцитриол – активная форма витамина Д. Образуется из 7-дигидрохолестерина в коже или поступает с пищей. В печени подвергается гидроксилированию с образованием 25-гидроксиколекальциферола, а затем в почках по 1-му углеродному атому с образованием 1,25-дигидроксиколекальциферола или кальцитриола.

Основная биологическая роль кальцитриола – стимуляция всасывания кальция и фосфата в кишечнике. Кальцитриол – единственный гормон, способствующий транспорту кальция против концентрационного градиента, существующего на мембране клеток кишечника. Кальцитриол

усиливает: 1) захват и перенос кальция и фосфора через мембрану щеточной каемки и микроворсинок; 2) транспорт через мембрану клеток слизистой и 3) выведение через базальную мембрану во внеклеточную жидкость. В результате концентрация кальция в сыворотке крови повышается.

В почках кальцитриол способен усиливать действие паргормона на реабсорбцию кальция в почках.

В костях кальцитриол способствует захвату кальция остеобластами и кальцификации костной ткани.

Кальцитонин – пептид, состоящий из 32 аминокислот. Синтезируется парафолликулярными К-клетками щитовидной железы и реже – паращитовидной железой или тимусом. Секреция кальцитонина возрастает при значительном увеличении концентрации кальция в крови. Является антагонистом паргормона.

Органы-мишени: кости, в меньшей степени кишечник и почки.

Кальцитонин действует на кости, тормозит резорбцию матрикса и снижает высвобождение кальция и фосфата. Кальцитонин увеличивает концентрацию цАМФ и влияет, вероятно, на те клетки, которые не являются мишенями для ПТГ.

Кальцитонин *снижает реабсорбцию и повышает экскрецию* кальция с мочой.

Натрий и калий

Натрий - основной катион внеклеточной жидкости. Около 50% Na находится в костях, 40% во внеклеточной жидкости и 10% - в мягких тканях. Содержание натрия в плазме крови 135-150 ммоль/л, в эритроцитах – 8-13 ммоль/л. В течение суток с пищей поступает 3-4 г натрия, практически такое же количество выводится почками. В 10 г соли содержится 4 г Na.

Источники: соль, хлеб, зерновые, орехи, яйца, молоко.

Функции натрия: 1) регуляция кислотно-щелочного баланса с хлоридами и бикарбонатами; 2) поддержание осмотического давления; 3) создание электрохимического потенциала на мембранах клетки; 4) всасывание глюкозы, галактозы и аминокислот в кишечнике.

Калий – внутриклеточный катион. Содержание калия в плазме крови – 4-4,5 ммоль/л, в эритроцитах – 115 ммоль/л.

Суточная потребность – 2-3 г.

Источники: бананы, апельсины, ананасы, помидоры, печень, бобовые, молоко кокосового ореха.

Функции: 1) создание внутриклеточного осмотического давления; 2) регуляция кислотно-щелочного и водного баланса в клетке; 3) вместе с натрием участвует в создании электрохимического потенциала (см. Na^+ , K^+ - АТФаза); 4) необходим для функционирования некоторых ферментов (пируваткиназа) и биосинтеза белков на рибосомах.

Вода составляет до 60% массы тела (у мужчин 55-70%, у женщин 45-60%). Возможно, это связано с тем, что у мужчин выше процент белковых веществ (мышцы), а у женщин выше процент жировых веществ, которые обладают гидрофобными свойствами и в меньшей степени способны связываться с водой. При средней массе человека в 70 кг примерно 42 кг приходится на долю воды. Большая часть воды (около 40% от общей массы тела – 28 л) входит в состав *внутриклеточных жидкостей* организма. *Внеклеточная* вода (14 л) входит в состав *межклеточной* и *внутрисосудистой* жидкости. Межклеточная жидкость включает *неорганизованную* воду, которая относительно свободно перемещается в межклеточном пространстве (около 10% от массы тела – 7 л) и *организованную* воду, которая связана со структурами межклеточного пространства, например, с коллагеновыми волокнами, с рыхлой соединительной тканью. Эта вода также составляет примерно 10% от общей массы организма, т.е. около 7 л. На внутрисосудистую жидкость – плазму крови – приходится примерно 5% массы, т.е. около 4 л жидкости.

Кроме того, всю воду делят на *две фракции*: фракцию, способную к обмену, и фракцию, связанную в коллоидных системах с молекулами органических веществ. Известно, что на каждый грамм откладывающихся в тканях гликогена и белка задерживается соответственно 1,5 и 3 мл связанной воды. В результате катаболизма в организме человека образуется ежедневно 300-350 мл воды. При окислении 100 г жира образуется 107 мл воды, 100 г белка – 41 мл воды и 100 г углеводов – 55 мл воды. Потеря 10% воды приводит к состоянию дегидратации, а 20% – к смерти. Преобладающие ионы внутриклеточной жидкости – K^+ , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} . Преобладающие ионы межклеточной жидкости – Na^+ , Cl^- , HCO_3^- .

Функции воды

1) является растворителем полярных и нейтральных молекул и диспергирует соединения, содержащие гидрофобные группы; 2) участвует в биохимических реакциях (гидролиза, гидратации и дегидратации, окисление, синтезы); 3) транспортирует к тканям и клеткам питательные вещества и удаляет продукты метаболизма; 4) терморегуляторная (путем испарения воды); 5) механическая роль (скольжение трущихся поверхностей суставов и т.д.).

Содержание воды в различных тканях отличается: в сером веществе мозга составляет 84%, в почках – 81%, в сердце – 78%, в печени и мышцах – 75%, в цельной крови – 80%, а в плазме крови – 92%. Наиболее низко содержание воды в жировой ткани (25%) и в костной ткани (20-40%). С возрастом содержание воды в тканях и органах снижается.

Суточная потребность взрослого человека в воде составляет примерно 40 г на 1 кг массы, т.е. около 2,5 л. Эта потребность покрывается за счет введения в организм различных жидкостей и пищевых продуктов.

Кроме того, часть воды (около 400 мл) образуется в организме при окислении органических веществ (эндогенная вода). При окислении 100 г жиров образуется 107 г воды, 100 г углеводов – 55 г воды и 100 г белков – 41 г воды. Выделяется вода из организма через почки (с мочой), кожу (с потом), легкие (с дыханием) и через кишечник (с калом). Часть воды временно может депонироваться в коже и печени.

Обмен воды тесно связан с обменом минеральных веществ, образуя водно-минеральный обмен.

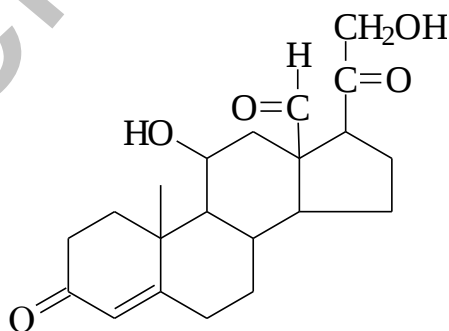
Регуляция водно-минерального обмена

В регуляции водно-минерального обмена принимают участие 3 системы: ренин-ангиотензин-альдостероновая система, вазопрессин и атриальный натрийуретический фактор.

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система

Снижение артериального давления, объема циркулирующей крови или концентрации ионов Na^+ приводит к активации клеток юктагломерулярного аппарата (ЮГА), локализованных в области приносящей артериолы почек. Клетки ЮГА вырабатывают *ренин*, который воздействует на *ангиотензиноген* - α_2 -глобулин, синтезируемый печенью, и превращает его в декапептид - *ангиотензин I*. От ангиотензина I под действием ангиотензинпревращающего фермента отщепляется дипептид и образуется октапептид *ангиотензин II*. Ангиотензин II – самый мощный сосудосуживающий фактор из всех известных вазоактивных агентов. Он тормозит высвобождение ренина юктагломерулярными клетками и оказывает действие на выработку альдостерона в коре надпочечников. Ангиотензин II превращается в гептапептид – *ангиотензин III*. У человека ангиотензина II в плазме крови в 4 раза выше, чем ангиотензина III и поэтому именно октапептид оказывает основной эффект. Ангиотензины II и III инактивируются под действием ангиотенгиназ.

Ангиотензин II связывается со специфическими рецепторами клубочковой зоны коры надпочечников и стимулирует выработку альдостерона через изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и метаболитов фосфатидилинозитолов.



Альдостерон – проникающий в клетку гормон. Клетками-мишенями являются *дистальные каналцы и собирательные трубочки почек*, где

альдостерон усиливает реабсорбцию Na^+ . Гормон-рецепторный комплекс связывается с хроматином и регулирует транскрипцию специфических генов.

Na^+ из жидкости, содержащейся в канальцах и омывающей апикальную поверхность почечных клеток, пассивно входит в клетки по Na^+ -каналам. Далее происходит перенос этого иона в интерстициальную жидкость, причем транспорт через мембрану на серозной стороне клетки осуществляется Na^+/K^+ -АТФ-азой. Альдостерон увеличивает: 1) число каналов на мембране апикальной стороне клеток, что повышает уровень внутриклеточного Na^+ ; 2) активность митохондриальных ферментов (в частности цитратсинтазы) за счет индукции транскрипции генов, что способствует выработке АТФ, необходимой для работы Na^+/K^+ -АТФ-азы и 3) количество Na^+/K^+ -АТФ-азы. Альдостерон способствует выделению из организма ионов K^+ и NH_4^+ .

Задержка Na^+ имеет 2 следствия: 1) увеличивается осмотическое давление, что вызывает продукцию вазопрессина. Это приводит к задержке воды. В результате восстанавливается объем крови. 2) повышенная концентрация натрия придает мышечным стенкам большую чувствительность к вазоактивным веществам. Это приводит вместе с прямым действием ангиотензина II на сосуды к восстановлению артериального давления до стабильного уровня.

Вазопрессин (антидиуретический гормон)

Синтезируется в гипоталамусе и поступает в гипофиз, а оттуда – в кровь. Секретию вазопрессина стимулируют: 1) повышение осмотического давления крови, которое воспринимается осморецепторами мозга; 2) уменьшение объема крови, которое воспринимается барорецепторами кровеносных сосудов; 3) боль, возбуждение. АДГ влияет на клетки трех типов: 1) клетки почечных канальцев; 2) гладкомышечные клетки сосудов; 3) клетки печени. В клетках почечных канальцев под действием вазопрессина увеличивается концентрация цАМФ, активируется протеинкиназа и фосфорилируются белки мембраны клеток дистальной части извитых канальцев и собирательных трубок. Мембрана становится проницаема для воды. Вода поступает из первичной мочи в клетку, а затем в кровь, увеличивая объем жидкости и уменьшая осмотическое давление. В настоящее время показано, что белками, которые участвуют в транспорте воды и на которые действует вазопрессин являются аквапорины.

Реакция сосудов заключается в сокращении гладкомышечного слоя, сужению сосудов и опосредуется увеличением концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

В печени АДГ стимулирует гликогенолиз и глюконеогенез. Эти эффекты связаны с увеличением концентрации Ca^{2+} .

Предсердный (атриальный) натрийуретический фактор

Это полипептид, вырабатывающийся в клетках предсердий. Состоит из 28 аминокислот. Является физиологическим антагонистом ангиотензина II. Расширяет сосуды и стимулирует потерю натрия. Рецепторы к нему расположены на мембранах клеток клубочковой зоны, где он ингибирует секрецию альдостерона и на клетках пучковой зоны, где ингибирует выделение кортизола.

14.8. Гормоны растений

Гормоны растений называются *фитогормонами*. Фитогормоны – это химические соединения, с помощью которых осуществляется взаимодействие клеток, тканей и органов и которые в малых количествах необходимы для регуляции всех процессов жизнедеятельности растений. Гормоны растений – это низкомолекулярные соединения, которые активны в очень низких концентрациях (10^{-13} - 10^{-5} моль/л). Они, как правило, образуются в одной части растения, а транспортируются в другую, где и оказывают сильнейшее воздействие на процессы роста и развития растительного организма.

Несмотря на многообразие функций определенных гормонов, их можно объединить в две группы: *гормоны-стимуляторы* и *гормоны-ингибиторы*. К важнейшим стимуляторам относят ауксины, гиббереллины и цитокинины, а к ингибиторам – абсцизовую кислоту и этилен.

Ауксинами называются вещества индольной природы: индолилуксусную кислоту и ее производные. Предшественником ауксинов в растении служит одна из незаменимых аминокислот – триптофан. Синтез ауксина из триптофана находится под контролем других гормонов растений – гиббереллинов (они активируют синтез) и этилена (подавляет синтез). Ауксины синтезируются преимущественно в верхушечных системах (точках роста) стебля и корни. Больше всего их накапливают растущие почки и листья, пыльца и формирующиеся семена. Сильное влияние оказывает ауксин на цветение, рост и созревание плодов растений. Ауксин, содержащийся в пыльце, необходим для роста пыльцевой трубки и, следовательно, для опыления растений. Транспорт ауксинов в растении происходит строго полярно: вниз по стеблю от верхушки побега к кончику корня – к зоне его растяжения. Сюда же вливаются и потоки ауксина из листьев. Ауксин – один из самых древних фитогормонов. Известно, что даже у примитивных жгутиковых организмов имеется регуляторное химическое соединение – серотонин, очень близкое по строению к ауксину, играющее роль внутриклеточного гормона. У высокоорганизованных животных серотонин является одним из нейромедиаторов. Ауксины используют в растениеводстве для стимуляции корнеобразования у черенков древесно-кустарниковых и травянистых растений (смородины, крыжовника, вишни, винограда, жасмина, розы и др.), а также для улучшения срастания привоя и подвоя при проведении прививок.

Гиббереллины. Название этих фитогормонов происходит от латинского названия гриба гиббереллы из класса Сумчатые (*Gibberella fujikuroi*). Этот гриб продуцирует гибберелловую кислоту, которая была открыта (в 1926 г.) в Японии. Гиббереллины синтезируются особо интенсивно в растущих (верхушечных 9-апикальных) стеблевых почках растений, в хлоропластах листьев, в формирующихся семенах, в зародыше прорастающих семян. Физиологические функции гиббереллинов разнообразны. Они оказывают сильное влияние на интенсивность митоза и растяжение клеток. Под действием гиббереллинов удлиняются стебель и листья, а цветки и соцветия становятся крупнее. У винограда образуются более крупные гроздья.

Мощное влияние оказывает гиббереллин на цветение растений. Оказалось, что для зацветания растений необходима определенная концентрация гиббереллина в тканях. Такая концентрация возникает либо при длинном световом дне, либо при низких температурах (при яровизации). Поэтому обработка гиббереллином ускоряет цветение длиннодневных растений: их можно «заставить» цвести даже при коротком световом дне.

Сильнейшее влияние гиббереллин оказывает на выход растений из состояния физиологического покоя. Семена и клубни многих растений после уборки находятся в состоянии покоя и не прорастают даже в благоприятных условиях увлажнения, обеспеченности кислородом и теплом. Однако обработка гиббереллином вызывает их прорастание.

Гиббереллин также пробуждает спящие почки зимующих травянистых и древесно-кустарниковых растений. Обработка гиббереллином позволяет, например, получить в середине зимы цветущие побеги жасмина, сирени или ландыша. Такой метод в растениеводстве получил название выгонки растений.

Высокая физиологическая активность гиббереллинов проявляется в период формирования сочных плодов. Как оказалось, развивающиеся после оплодотворения семена продуцируют гиббереллины, необходимые для роста и формирования плодов. Недостаток в этот критический момент активных гиббереллинов вызывает приостановку роста плодов. Дополнительная обработка гиббереллином, напротив, способствует формированию крупных бессемянных (партенокарпических) плодов у томата, винограда, перца, цитрусовых, плодовых семечковых и косточковых культур.

Цитокинины. Цитокинины – фитогормоны, производные пурина, оказывающие сильное стимулирующее действие на рост и развитие растений. Основное место синтеза цитокининов – верхушечные меристемы корней. Они также образуются в молодых листьях и почках, в развивающихся плодах и семенах.

Примечательно, что цитокинины синтезируются не только растениями, но и некоторыми микроорганизмами, связанными с растениями. Так, клубеньковые бактерии, поселяющиеся на корнях бобовых растений. Обогащают их ткани цитокининами и ауксинами, что приводит к притоку питательных веществ и образованию клубеньков.

Цитокинины в растениях стимулируют деление клеток, ускоряют рост клеток двудольных (но не однодольных) растений в длину, способствуют их дифференцировке. В основе физиологической активности цитокининов – усиление синтеза ДНК, белка, роста и развития хлоропластов и других органелл клеток. Цитокинины стимулируют рост и развитие побегов, но угнетают рост корней. В этом их отличие от действия ауксинов.

Подобно гиббереллинам, цитокинины обладают высокой «пробуждающей» способностью: они выводят из состояния глубокого покоя семена и клубни, спящие почки деревьев и кустарников, повышают всхожесть семян гороха, кукурузы, ячменя и многих других растений.

Цитокинины задерживают старение листьев, усиливают поступление в ткани питательных веществ, благодаря чему происходит восстановление структуры хлоропластов, усиливается синтез в них хлорофилла, РНК и белка. Повышается интенсивность фотосинтеза.

Многие микроорганизмы – паразиты растений «взяли на вооружение» высокую физиологическую активность гормонов-активаторов – ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. Синтезируя эти соединения или стимулируя к этому зараженные ими растения, микробы активируют приток к зараженным растительным тканям органических соединений. Тем самым они обеспечивают себя питательными

веществами. Следствием такой гормональной активности паразитических микроорганизмов является появление на зараженных органах растений (корнях стеблях, корнеплодах) наростов.

Абсцизовая кислота. Если ауксины, гиббереллины и цитокинины – это стимуляторы роста и развития растений, то абсцизовая кислота – важнейший растительный ингибитор широкого спектра действия. Абсцизовая кислота (АБК) синтезируется практически во всех органах растений, особенно в стареющих. АБК является антагонистом гормонов-стимуляторов. Так, переход в покой семян, клубней, луковиц и почек связан с увеличением содержания в них АБК.

Как оказалось, растение реагирует на укорочение светового дня и приближение зимы ускорением синтеза АБК. В этот период повышается содержание этого гормона в зимующих органах многолетних бобовых и злаковых трав, озимых зерновых. Одновременно подавляется активность ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. Это предотвращает чрезмерную физиологическую активность растений, готовящихся к зимовке.

Старение растений и созревание плодов томата, земляники, груши, винограда и других культур связано со значительной концентрацией АБК: фитогормон ускоряет распад белков, нуклеиновых кислот, фотопигментов.

Как оказалось, абсцизовая кислота участвует в таком важном процессе, как регуляция работы устьиц. При обезвоживании листьев содержание в них АБК быстро повышается. Это заставляет устьица закрываться, что приводит к снижению транспирации.

Динамическое равновесие в растительных клетках между тормозящим действием АБК, с одной стороны, и стимулирующим эффектом ауксинов, цитокининов и гиббереллинов, с другой стороны, служит необходимым условием нормального роста и развития растений. Создается своеобразная система взаимного сдерживания гормонов-антагонистов, в результате чего метаболизм растительного организма приобретает необходимую устойчивость.

Этилен. Гормональным фактором растительного организма служит хорошо известный газ этилен. Он образуется из аминокислоты метионина практически в любом органе растений, но все же наиболее высока скорость его биосинтеза в стареющих листьях и созревающих плодах. Физиологические функции этилена в растении многообразны. Этилен способствует старению тканей и тем самым ускоряет опадение листьев и плодов. В случае локальных повреждений растение синтезирует так называемый «стрессовый этилен», который способствует отторжению поврежденных тканей. Этилен увеличивает покой семян, клубней и луковиц, а также ускоряет созревание плодов. Поэтому этилен используют для ускорения дозревания плодов, для чего их помещают в специально герметично закрытые камеры, заполненные этим газом.

Этилен оказывает влияние на генеративные органы растений, в частности способствует смещению пола двудомных растений в женскую сторону. Это приводит, например, к изменению соотношения женских и мужских цветков огурца и способствует повышению его урожайности. Этилен, как газообразное соединение, обладает высокой подвижностью в растительных тканях. Поэтому, быстро распространяясь по растению, он оказывает регулирующее воздействие на работу других фитогормонов, усиливая или, наоборот, подавляя их физиологическую активность.

Таким образом, гормональная система растений является многокомпонентной. Соотношение гормонов-активаторов и гормонов-ингибиторов закономерно изменяется в процессе индивидуального развития растений, а также в ответ на изменение

экологических факторов. В связи с этим исключительно велико значение фитогормонов для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам. Общая закономерность такова: в случае стрессового воздействия преобладает роль гормонов-ингибиторов (абсцизовой кислоты и этилена), а при выходе растения из стрессового состояния и переходе к нормальной жизнедеятельности – гормонов-активаторов (ауксинов, гиббереллинов и цитокининов).

Глава 15. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ВИТАМИНЫ

Во второй половине XIX века было установлено, что пищевая ценность продуктов питания определяется содержанием в них белков, жиров, углеводов, минеральных солей, воды. Однако практический опыт свидетельствовал, что даже самая обильная пища не всегда могла предотвратить некоторые заболевания, связанные с дефектом питания, а именно с недостатком или отсутствием витаминов.

15.1. Определение и классификации

Витамины – это незаменимые компоненты пищи, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена веществ в целостном организме; при этом витамины **не используются для пластических и энергетических** нужд организма. Человек в сутки потребляет около 600 г пищи в пересчете на сухое вещество, из этого количества пищи на витамины приходится 100-200 мг.

Все витамины называются тремя способами: 1) по предложению Мак-Коллума (1913 г.) их называют латинскими буквами А, В, С, Е, D, К и др.; 2) наименование по физиологическому эффекту – к названию болезни, которую предупреждает или излечивает витамин, добавляется приставка «анти» (антискорбутный, антигеморрагический, антистерильный и др.); 3) химическое наименование.

В 1974 году принята временная классификация витаминов:

1) Витамины, растворимые в воде: В₁ – тиамин, антинеуритный; В₂ – рибофлавин, витамин роста; В₃ – пантотеновая кислота, антидерматитный; В₅ (РР) – никотиновая кислота, антипеллагрический; В₆ – пиридоксол, антидерматитный; В₁₂ – цианкобаламин, антианемический; В_с – фолиевая кислота, антианемический; Н – биотин, антисеборрейный; С – аскорбиновая кислота, антискорбутный; Р – рутин, капилляроукрепляющий.

2) Витамины, растворимые в жирах: А – ретинол, антиксерофтальмический; D – кальциферол, антирахитический; Е – токоферол, антистерильный; К – филлохинон, антигеморрагический;

3) Витаминоподобные вещества: холин; липоевая кислота; оротовая кислота; витамин В₁₅; инозит; ПАБК (парааминобензойная кислота); карнитин; витамин U.

Функциональная классификация витаминов. 1. Витамины, участвующие в ферментативных реакциях в качестве *коферментов* (В₁, В₂,

В₆, В₁₂, РР, фолиевая кислота, биотин, пантотеновая кислота, К). 2. Витамины-антиоксиданты (С, Е, каротиноиды). 3. Витамины-прогормоны (А, Д).

Недостаточное поступление витаминов с пищей вызывает заболевания, называемые *гиповитаминозами*. При отсутствии витаминов в организме развивается *авитаминозы*. При недостатке нескольких витаминов – *полигиповитаминозы*, а при их отсутствии в пище – *полиавитаминозы*. Как сказал В.А.Энгельгардт: «Витамины проявляют себя не своим присутствием, а своим отсутствием». При чрезмерном введении витаминов (чаще жирорастворимых) могут развиваться гипервитаминозы.

Чаще всего встречаются гиповитаминозы, причинами которых являются: 1) недостаток витаминов в продуктах питания; 2) нарушения всасывания витаминов, в результате заболеваний желудочно-кишечного тракта; 3) нарушения метаболизма витаминов (нарушение синтеза транспортных белков, образования коферментов и др.); 4) подавление жизнедеятельности микрофлоры кишечника, вырабатывающей ряд витаминов, при пероральном применении антибиотиков и сульфаниламидных препаратов; 5) повышенная потребность в витаминах при росте, беременности, лактации, физической нагрузке; 6) повышенное выведение витаминов и др.

Последствиями недостаточного потребления витаминов в современных условиях являются: снижение физической и умственной работоспособности, сопротивляемости различным заболеваниям, усиление отрицательного воздействия на организм неблагоприятных экологических условий, вредных факторов производства, нервно-эмоционального напряжения и стресса, повышение профессионального травматизма, чувствительности организма к воздействию радиации, сокращение продолжительности активной трудоспособной жизни.

Недостаточное поступление витаминов в детском и юношеском возрасте отрицательно сказывается на показателях физического развития, заболеваемости, успеваемости, способствует постепенному развитию обменных нарушений, хронических заболеваний и, в конечном итоге, препятствует формированию здорового образа жизни.

15.2. Количественное определение витаминов

1) Физико-химические методы определения содержания витаминов как химических веществ (нг, мкг, мг).

2) Микробиологические методы – по скорости роста микроорганизмов в присутствии витамина судят о его количестве.

3) Биологические методы – определяют минимальное количество пищи или лекарственного препарата, способное предохранить животное (находящееся на диете, в которой отсутствует изучаемый витамин) от

заболевания. Это количество пищи или витаминного препарата принимают за витаминную единицу.

Физиологическая потребность в витаминах и рекомендуемые нормы их потребления. Физиологическая потребность – объективная реальность, predetermined природой и условиями жизни человека. Она не зависит от наших знаний и установлений. Ее можно пытаться узнать, но ее нельзя «нормировать» или «рекомендовать». Физиологическая потребность индивидуальна и может относительно широко варьировать среди представителей одной и той же половозрелой группы людей в зависимости от особенностей организма, условий внешней среды и труда отдельных индивидуумов.

Рекомендуемая норма (размер) потребления устанавливается с учетом индивидуальных потребностей людей, входящих в данную половозрелую группу, таким образом, чтобы гарантированно перекрыть разброс индивидуальных потребностей подавляющего большинства (обычно 97,5%) ее состава. По определению, принятому Объединенной группой экспертов ФАО/ВОЗ в 1965 г., «рекомендуемые нормы (размеры) потребления являются такими количествами, которые достаточны для поддержания нормального здоровья почти у всех людей».

Антивитамины

Для витаминов, растворимых в воде, известны антивитамины. В настоящее время антивитамины принято делить на две группы:

1) антивитамины, имеющие структуру, сходную со строением нативного витамина, и оказывающие действие, основанное на конкурентных взаимоотношениях с ним;

2) антивитамины, вызывающие модификацию химической природы витаминов или затрудняющие их всасывание, транспорт, что сопровождается снижением или потерей биологического эффекта витаминов. Структуроподобные антивитамины по существу представляют собой антиметаболиты и при взаимодействии с апоферментом образуют неактивный ферментный комплекс со всеми вытекающими отсюда последствиями.

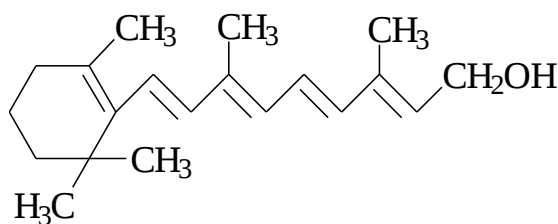
Помимо структуроподобных аналогов витаминов, введение которых обуславливает развитие истинных авитаминозов, различают антивитамины биологического происхождения, в том числе ферменты и белки, вызывающие расщепление или связывание молекул витаминов, лишая их физиологического действия. К ним относятся, например, тиаминазы I и II, вызывающие распад молекулы витамина B₁, аскорбатоксидаза, катализирующая разрушение витамина C, белок авидин, связывающий биотин в биологически неактивный комплекс.

15.3. Жирорастворимые витамины

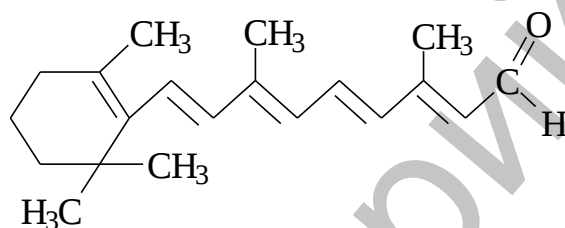
К жирорастворимым витаминам относят витамины A, D, E, K.

Витамин А (ретинол, антиксерофтальмический)

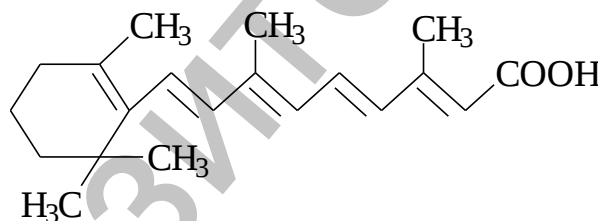
1. *Структура.* Витамин А является полиизопреноидом, содержащим циклогексенильное кольцо. В группу витамина А входят ретинол, ретиналь и ретиноевая кислота. Только ретинол обладает полной функцией витамина А. Термин «ретиноиды» включает природные и синтетические формы ретинола. Растительный предшественник бета-каротин обладает 1/6 активности витамина А.



Ретинол



Ретиналь



Ретиноевая кислота

2. *Метаболизм.* Эфиры ретинола растворяются в жирах пищи, эмульгируются желчными кислотами и всасываются кишечным эпителием. Всосавшийся β -каротин расщепляется на две молекулы ретиналя. В клетках эпителия ретиналь восстанавливается в ретинол и небольшая часть ретиналя окисляется в ретиноевую кислоту. Большая часть ретинола эстерифицируется насыщенными жирными кислотами и в составе хиломикронов поступает через лимфу в кровь. После липолитической трансформации ремнанты хиломикронов захватываются печенью. В печени витамин А запасается в виде эфиров. Для транспорта к периферическим тканям эфиры ретинола гидролизуются и свободный ретинол связывается в сыворотке крови с ретинолсвязывающим протеином (ПРСП). Ретиноевая кислота транспортируется альбуминами. Внутри периферических клеток ретинол связывается с клеточным ретинол-связывающим протеином (КРСП). Токсическое действие

витамина А проявляется при появлении свободной формы витамина, т.е. после истощения мощности КРСР. Ретинол и ретиналь взаимопревращаются друг в друга с помощью НАДФ-зависимых дегидрогеназ или редуктаз. Ретиноевая кислота не может превращаться в ретинол или ретиналь, поэтому ретиноевая кислота может поддерживать рост и дифференцировку тканей, но не может заменить ретиналь в зрении или ретинол в функционировании репродуктивных органов.

3. Биологическая роль

1) *Ретинол* действует подобно *гормонам*, проникающим в клетку, – связывается с ядерными белками и регулирует экспрессию определенных генов. Ретинол необходим для осуществления нормальной репродуктивной функции.

2) *Ретиналь* участвует в *акте зрения*. 11-цис-ретиналь связан с белком опсином и образует родопсин. На свету родопсин диссоциирует и цис-ретиналь переходит в транс-ретиналь. Реакция сопровождается конформационными изменениями мембран палочек и открытием кальциевых каналов. Быстрый вход ионов кальция инициирует нервный импульс, который передается в зрительный анализатор. Для повторного восприятия (т.е. в темноте) транс-ретиналь восстанавливается алкогольдегидрогеназой в транс-ретинол (здесь возможны потери витамина А). Транс-ретинол изомеризуется в цис-ретинол (здесь возможно восполнение убыли витамина А). Цис-ретинол окисляется в цис-ретиналь, который, соединяясь с опсином, образует родопсин. Система светоощущения готова к восприятию следующего кванта света.

3) *Ретиноевая кислота* участвует в *синтезе гликопротеинов*, усиливает *рост* и *дифференцировку тканей*.

4) *Ретиноиды* обладают *антиопухолевой* активностью и *ослабляют* действие *канцерогенов*.

5) *β-каротин* – *антиоксидант* и способен обезвреживать пероксидные свободные радикалы ($\text{ROO}^\bullet$) в тканях с низким парциальным давлением кислорода.

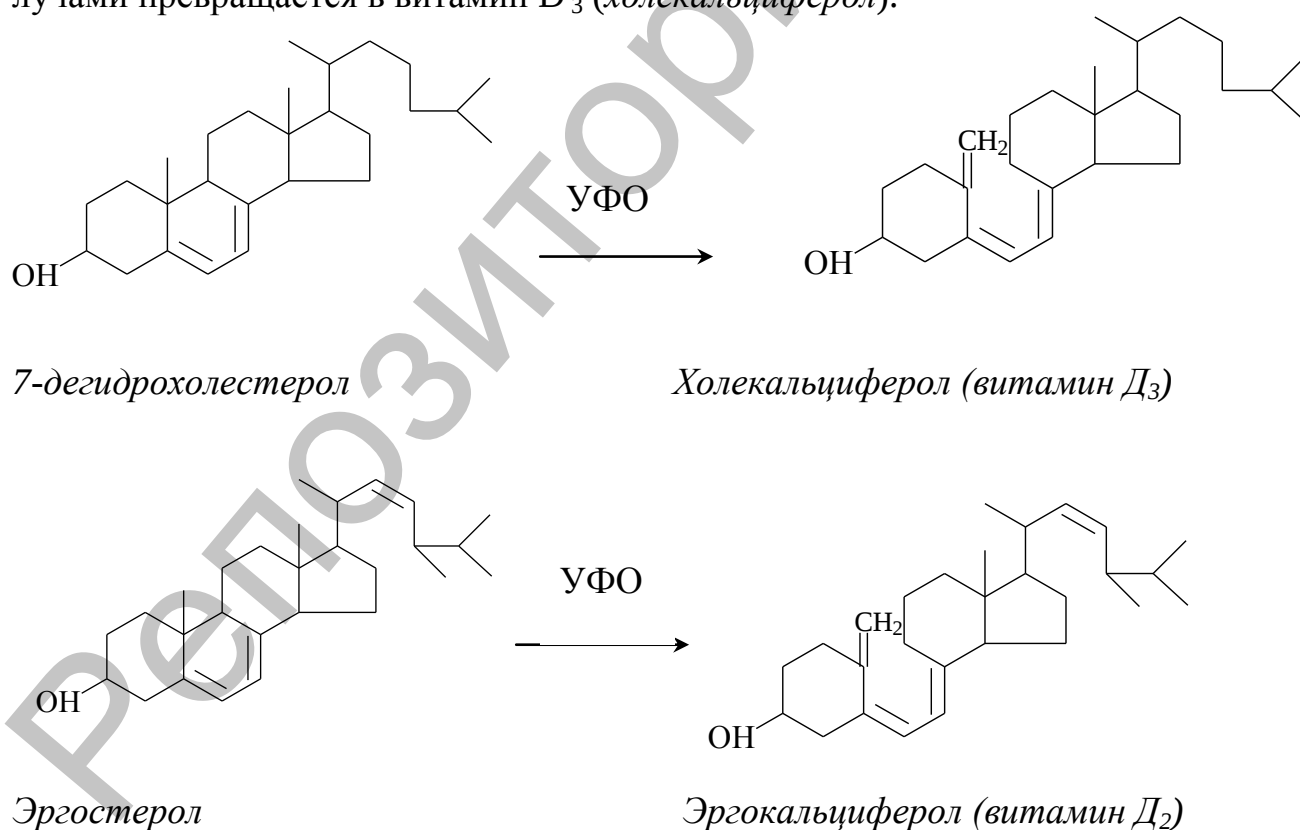
4. *Источники*. Витамин А содержится только в продуктах животного происхождения (печень, почки, сливочное масло, рыбий жир). Из печени пресноводных рыб выделен витамин A_2 , который отличается наличием еще одной двойной связи в 3-4 положении и называется 3-дегидроретинол. Биологическая активность витамина A_2 для млекопитающих соответствует примерно 40% активности витамина A_1 . В растениях есть пигменты – α -, β - и γ -каротины, которые могут превращаться в витамин А (морковь, томаты).

5. *Суточная потребность*. 1-2,5 мг витамина А (5000-7000 МЕ). 1 МЕ = 0,344 мкг ретинолацетата. Частично потребность в витамине А может покрываться за счет каротина (2-5 мг), причем 1 мг каротина = 0,67 мг ретинола.

6. *Гиповитаминоз* проявляется в виде куриной слепоты – гемералопия. Это наиболее ранний признак недостаточности витамина А: человек нормально видит при дневном освещении и очень плохо различает предметы при плохом освещении (в сумерках). Авитаминоз характеризуется падением массы тела, остановкой роста, пролиферацией и ороговеванием эпителия, сухости кожи и слизистых, слущиванием эпителия, нарушением репродуктивной функции. Сухость роговицы глаза называется ксерофтальмия (отсюда название витамина – антиксерофтальмический). Повреждение эпителия мочевых путей, кишечника приводит к развитию воспалительных заболеваний. Важнейшей причиной недостаточности витамина А являются нарушения всасывания и транспорта липидов. При введении высоких доз витамина А развивается гипervитаминоз А.

Витамин D (кальциферол, антирахитический)

1. *Структура.* В растительных продуктах содержится эргостерин, который при действии ультрафиолетовых лучей превращается в витамин D₂ (эргокальциферол). В животных тканях распространен 7-дегидрохолестерол, который в коже при облучении ультрафиолетовыми лучами превращается в витамин D₃ (холекальциферол).



2. *Метаболизм.* Витамин D пищи всасывается в составе мицелл. В крови транспортируется в связи со специфическим транспортным глобулином. В гепатоцитах гидроксилируется в 25-гидроксихолекальциферол (25-OH-D₃). Это главная резервная в печени и

транспортная в крови форма витамина D. Часть 25-ОН-D₃ участвует в энтеро-печеночной циркуляции (как желчные кислоты). При ее нарушении может возникать дефицит витамина D. В почках, плаценте и костях 25-ОН-D₃ может гидроксилироваться в положении 1 с образованием 1,25-дигидроксиолекальциферола или кальцитриола. Продукция кальцитриола регулируется собственной концентрацией, паратгормоном и сывороточными фосфатами.

3. *Биологическая роль.* Кальцитриол функционирует подобно проникающим гормонам. Кальцитриол – единственный регулятор перемещения кальция через мембрану энтероцитов против градиента концентрации. Кальцитриол стимулирует биосинтез в энтероцитах кальций-связывающего белка, что обеспечивает всасывание кальция и фосфатов в тонком кишечнике. Витамин D₃ усиливает реабсорбцию фосфатов в почечных канальцах, что способствует поддержанию нормального соотношения Ca²⁺ и НРО₄³⁻ в плазме и внеклеточных жидкостях. Это необходимо для кальцификации молодой растущей костной ткани.

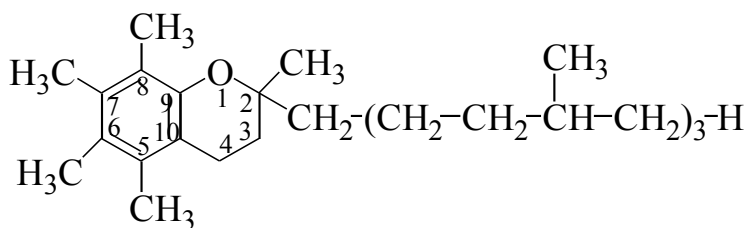
4. *Источники:* рыбий жир, печень рыб и животных, сливочное масло, яичный желток, молоко.

5. *Суточная потребность.* Потребность в витамине D зависит от возраста и состояния организма и составляет 12-25 мкг (500-1000 МЕ) в сутки (1 мкг=40 МЕ).

6. *Гиповитаминоз.* При недостатке витамина D у детей развивается заболевание рахит: нарушение минерализации костей, позднее развитие зубов, гипотония мышц. При недостатке витамина D у взрослых развивается остеопороз. Для профилактики D-гиповитаминоза используют ультрафиолетовое облучение кожи и пищи. При передозировке витамина D (в дозах, превышающих лечебные в 2-3 тысячи раз 1 500 000 МЕ) развивается гипервитаминоз: у детей остановка роста, рвота, исхудание, повышение артериального давления, возбуждение с переходом в ступор. В основе – гиперкальциемия и кальцификация внутренних органов.

Витамин Е (токоферол, антистерильный)

1. *Структура.* К витамину Е относится группа соединений – производных токола, обладающих витаминной активностью. Известно 8 видов токоферолов – α, β, γ, δ и т.д. Наибольшей активностью обладает α-токоферол (5,7,8-триметилтокол).



α -токоферол (5,7,8-триметилтокол)

β -токоферол (5,8-диметилтокол)

γ -токоферол (7,8-диметилтокол)

2. *Метаболизм.* Витамин Е не метаболизируется в организме. Нарушение всасывания липидов может приводить к дефициту токоферола, поскольку токоферол растворяется в жирах пищи, высвобождается и всасывается во время их переваривания. Токоферол всасывается в кишечнике и в составе хиломикронов через лимфу поступает в кровь. Токоферол попадает в ткани, в капиллярах которых хиломикроны подвергались действию липо-протеинлипазы, и в печень витамин Е поступает в составе ремнантов хиломикронов. Токоферол транспортируется из печени к периферическим тканям в составе ЛПОНП. *Депонируется витамин в жировой ткани, печени и мышцах.*

3. *Биологическое* роль витамина Е заключается в следующем:

1) Витамин Е накапливается в мембранах клеток и действует как *антиоксидант*, прерывая цепи свободно-радикальных реакций. Это препятствует пероксидации полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. В отличие от других витаминов, витамин Е повторно не используется и после своего действия должен заменяться новыми молекулами токоферола. Антиоксидантное действие токоферола эффективно при *высокой концентрации кислорода*, поэтому он находится в мембранах клеток с высоким парциальным давлением кислорода (мембраны эритроцитов, клеток респираторных органов). Потребность в витамине Е повышается при увеличении потребления ненасыщенных жирных кислот.

2) Витамин Е и *селен (Se)* действуют как синергисты. Se входит в состав глутатионпероксидазы, которая обеспечивает обезвреживание пероксидных радикалов. Se необходим для нормального функционирования поджелудочной железы. При нарушении функции ее нарушается переваривание и всасывание липидов и вторично витамина Е.

3) Витамин Е может участвовать в *функционировании SH-содержащих ферментов*, влиять на биосинтез КоQ, участвовать в механизмах переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий.

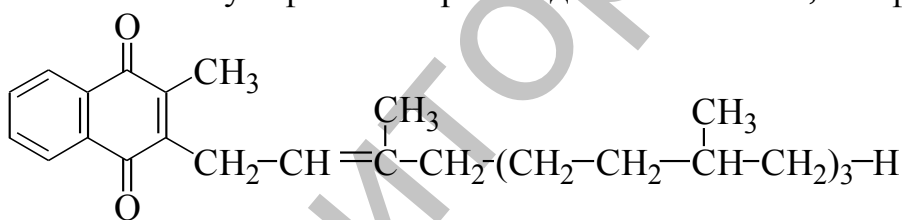
4. *Источником* витамина Е для человека являются растительные масла, а также зерновые продукты, ягоды шиповника, салат, капуста.

5. *Суточная потребность.* 20-30 мг.

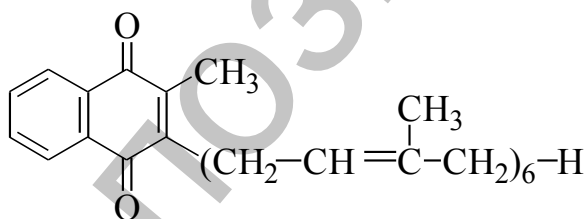
6. *Дефицит витамина Е.* При дефиците витамина Е нарушается образование сперматозоидов у мужчин и развитие плода у женщин. Развиваются дегенеративные изменения клеток репродуктивных органов, мышечная дистрофия, дегенеративные изменения клеток спинного мозга, жировое перерождение печени, дислиппротеинемии. У новорожденных может развиваться анемия, поэтому витамин Е необходимо добавлять к пище беременных и лактирующих женщин. Анемия развивается из-за уменьшения продукции гемоглобина и сокращения продолжительности жизни эритроцитов. При нарушении переваривания и всасывания липидов развивается гиповитаминоз Е, ведущий к неврологическим заболеваниям.

Витамин К (филлохион, антигеморрагический)

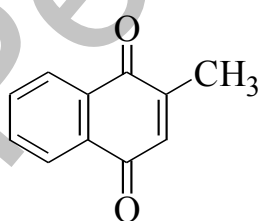
1. *Структура.* Три соединения обладают биологической активностью витамина К. *Витамин К₁* (филлохион) является производным 2-метил-1,4-нафтохинона, содержащий в положении 3 боковую цепь (фитол). Выделен из люцерны. *Витамин К₂* (менахинон) выделен из гниющей рыбной муки. Синтезируется кишечной микрофлорой. Отличается от витамина К₁ строением боковой цепи, представленной фарнезилдигеранилом. *Витамин К₃* (менадион, синтетический) не имеет боковой цепи в положении 3. На его основе А.Б.Палладин синтезировал водорастворимый препарат викасол (натриевая соль бисульфитного производного 2-метил-1,4-нафтохинона).



Витамин К₁



Витамин К₂



Витамин К₃

3. *Биологическая роль.*

2. *Метаболизм.* Для всасывания природных витаминов группы К (нафтахинонов) требуются желчные кислоты. В кровь они поступают в составе хиломикронов через лимфу. Викасол может всасываться без желчных кислот и прямо поступает в воротную вену и печень. Витамин К вначале аккумулируется в печени, но быстро расходуется.

1) Витамин К стимулирует биосинтез в печени *четырёх белковых факторов свертывания крови* (II-протромбин; VII-проконвертин; IX-фактор Кристмаса, или антигемофильный глобулин В; X-фактор Стюарта-Прауэра).

2) Витамин К действует как *кофактор карбоксилазы* на этапе *посттрансляционной модификации глутаминовых остатков протромбина*. Протромбин содержит 10 таких остатков, которые карбоксилируются витамин К-зависимой карбоксилазой. Образуется γ -карбоксиглутамат, который затем хелатируется кальцием, что важно для свертывания крови.

3) Реакция карбоксилирования требует CO_2 и восстановленной (гидрохиноидной) формы витамина К. В эндоплазматическом ретикулуме есть цикл восстановления продукта карбоксилазной реакции витамина К (т.е. хиноидной формы в гидрохиноидную). Центральное место занимают две редуктазные реакции (в первой используются дитиоловый восстановитель, во второй – НАДФ-зависимая редуктаза).

4) Описано участие витамина К в окислительном фосфорилировании, его многостороннее анаболическое действие, функционирование в составе мембран.

5. *Основной источник* витамина К – микрофлора кишечника. Возможно поступление нафтохинонов с пищей (шпинат, тыква, капуста, ягоды рябины, печень животных).

6. *Суточная потребность.* Суточная потребность условно выражается 0,2-0,3 мг.

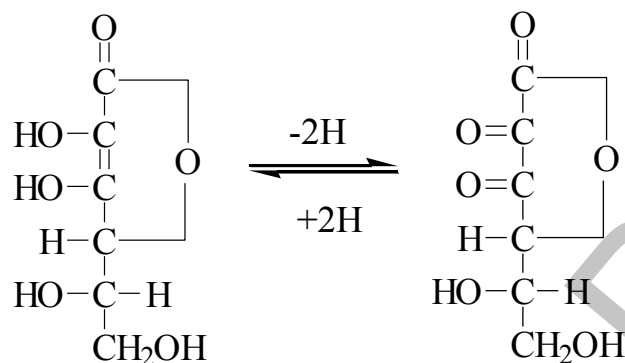
7. *Дефицит витамина К.* При нормальной микрофлоре кишечника у взрослых дефицита витамина К не бывает. Основная причина гиповитаминоза К – это стерилизация кишечника антибиотиками и сульфаниламидными препаратами. У новорожденных возможен дефицит витамина К, т.к. плацента его не пропускает, а кишечник стерил. После родов витамин К в плазме падает, но после еды восстанавливается. Если уровень протромбина низкий, возможно развитие геморрагического синдрома. Гиповитаминоз К бывает при мальабсорбции, дисфункции гепато-билиарной и панкреатической систем, при атрофии слизистой кишечника. Основные проявления гиповитаминоза К связаны с нарушением внутрисосудистого свертывания крови и кровоточивостью.

15.4. Водорастворимые витамины

К водорастворимым витаминам относят витамины группы В, С, Р, Н.

Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный витамин)

1. *Структура.* Витамин С по структуре представляет собой γ -лактон, имеющий 2 асимметричных атома углерода. Биологически активной является L-форма аскорбиновой кислоты.



Аскорбиновая кислота

Дегидроаскорбиновая кислота

Кислые свойства аскорбиновой кислоты обусловлены наличием 2-х *енольных гидроксильных групп*. L-аскорбиновая кислота обратимо подвергается окислению с образованием *дегидроаскорбиновой кислоты* под действием фермента *аскорбатоксидазы*. Восстановление дегидроаскорбиновой кислоты в аскорбиновую осуществляется с участием редуктазы и восстановленного глутатиона. *Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты являются биологически активными формами витамина*. При гидратации в присутствии кислорода дегидроаскорбиновая кислота необратимо окисляется в 2,3-дикетогулоновую кислоту, которая не обладает биологической активностью и распадается до щавелевой и треоновой кислот. Скорость разрушения витамина возрастает с повышением температуры, в щелочной среде, под действием УФ-лучей, в присутствии солей тяжелых металлов (например, меди). Аскорбиновая кислота разрушается в процессе приготовления пищи и хранения продуктов.

2. *Метаболизм.* Аскорбиновая кислота всасывается путем простой диффузии на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, но преимущественно в тонком кишечнике. В организме не накапливается.

3. *Биологическая роль.*

1) *Окислительно-восстановительные реакции.* Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем с окислительно-восстановительным потенциалом +0,08 в и участвует в восстановлении молекулярного кислорода, нитратов и цитохромов *a* и *c*.

2) Витамин С участвует в *гидроксилировании* остатков *пролина* и *лизина* в процессе биосинтеза коллагена. ОН-группы гидроксипролина необходимы для стабилизации структуры коллагена, формируя водородные связи между цепями триплетной спирали зрелого коллагена. Гидроксилизин в коллагене служит для образования участков связывания с

полисахаридами. Витамин С необходим для формирования костной ткани, поскольку основными компонентами костной ткани являются органический матрикс, коллаген, неорганический кальций и фосфаты.

3) Витамин С участвует в *метаболизме тирозина*. При синтезе катехоламинов норадреналина и адреналина из тирозина в надпочечниках и центральной нервной системе происходит окисление Cu^+ в Cu^{2+} ; для обратного процесса восстановления меди необходима аскорбиновая кислота. Кроме того, аскорбиновая кислота требуется для окисления р-гидроксифенилпирувата в гомогентизиновую кислоту.

4) Витамин С необходим для *гидроксилирования триптофана* в гидрокситриптофан при биосинтезе *серотонина*.

5) Витамин С участвует в биосинтезе *желчных кислот* из холестерина.

6) *Синтез кортикостероидных гормонов*. В коре надпочечников содержится высокая концентрация витамина С, особенно в период стресса. Предполагают, что витамин С необходим для синтеза кортикостероидов.

7) *Метаболизм железа и гемоглобина*. Аскорбиновая кислота повышает всасывание железа из кишечника путем его восстановления в Fe^{2+} . Витамин С участвует в образовании ферритина и высвобождение железа из связи его с транспортным белком крови трансферрином. Витамин С способствует *восстановлению метгемоглобина* в гемоглобин и участвует в деградации гемоглобина до желчных пигментов.

8) *Метаболизм фолиевой кислоты*. Активной формой фолиевой кислоты является тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК). Витамин С необходим для образования ТГФК. Вместе с ТГФК аскорбиновая кислота участвует в созревании эритроцитов.

9) Витамин С является *водорастворимым антиоксидантом* и защищает клетки от повреждения свободными радикалами. Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты объясняется ее способностью легко отдавать два атома водорода, используемых в реакциях обезвреживания свободных радикалов.

4. *Источники*. В организме человека, обезьян, морских свинок и некоторых птиц витамин С не синтезируется. Источником витамина С служит растительная пища. Особенно им богаты перец, черная смородина, укроп, петрушка, капуста, щавель, цитрусовые, земляника.

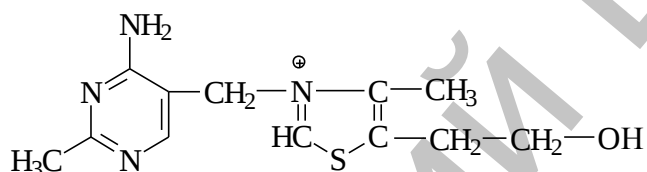
5. *Суточная потребность* 70-120 мг.

6. *Гиповитаминоз* проявляется повышенным утомлением, снижением аппетита, сниженной устойчивостью к простудным заболеваниям, кровоточивость десен. Авитаминоз приводит к заболеванию цингой (скорбутом). Главными симптомами цинги являются нарушение проницаемости капилляров, обусловленное недостаточностью гидроксилирования пролина и лизина в коллагене, расшатывание и выпадение зубов, отеки и боли в суставах, поражение костей, нарушение

заживления ран. Смерть обычно наступает от кровоизлияния в полость перикарда. При гиповитаминозе С развивается железодефицитная анемия из-за нарушения всасывания железа и использования его запасов при синтезе гемоглобина.

Витамин В₁ (тиамин, антиневритный витамин)

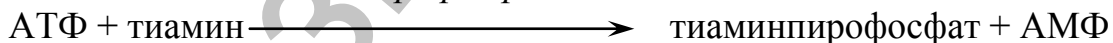
1. *Структура.* Витамин В₁ был первым витамином, выделенным в кристаллическом виде К.Функом в 1912 г. Позже был осуществлен его химический синтез. Свое название – тиамин – получил из-за наличия в составе его молекулы атома серы и аминогруппы. Тиамин состоит из 2-х гетероциклических колец – аминопиримидинового и тиазолового. Последнее содержит каталитически активную функциональную группу – карбанион (относительно кислый углерод между серой и азотом).



Тиамин устойчив в кислой среде и выдерживает нагревание до высокой температуры. В щелочной среде витамин быстро разрушается.

2. *Метаболизм.* В желудочно-кишечном тракте различные формы витамина гидролизуются с образованием свободного тиамин. Большая часть тиамин всасывается в тонком кишечнике с помощью специального механизма активного транспорта, остальное количество расщепляется тиаминазой кишечных бактерий. С током крови всосавшийся тиамин попадает вначале в печень, где фосфорилируется, а затем переносится в другие органы и ткани.

тиаминпирофосфаткиназа



Витамин В₁ присутствует в различных органах и тканях как в форме свободного тиамин, так и его фосфорных эфиров: тиаминмонофосфата, тиаминдифосфата и тиаминтрифосфата. Основной коферментной формой (60-80% от общего внутриклеточного) является тиаминпирофосфат (ТПФ).

После распада коферментов свободный тиамин выделяется с мочой и определяется в виде тиохрома.

3. *Биологическая роль*

1. ТПФ является коферментом 3-х полиферментных комплексов, которые катализируют окислительное декарбоксилирование кетокислот.

а) *Пируватдегидрогеназный комплекс* участвует в окислительном декарбоксилировании пирувата, что является одной из ключевых реакций в обмене углеводов. В результате этой реакции образуется ацетил-КоА, который включается в цикл трикарбоновых кислот, где окисляется до углекислоты и воды. Благодаря этой реакции создаются условия для полного окисления углеводов и утилизации всей заключенной в них

энергии. Кроме того, образующийся ацетил-КоА служит источником для синтеза многих биологических продуктов: жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, кетоновых тел и т.д.

б) *α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс* входит в состав ЦТК и катализирует окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата с образованием сукцинил-КоА.

в) *Дегидрогеназа кетокислот с разветвленным углеродным радикалом* участвует в метаболизме валина, изолейцина и лейцина.

2. ТПФ является коферментом *транскетолазы* – фермента пентозофосфатного пути окисления углеводов, основными продуктами которого являются НАДФН и рибоза.

3. Витамин В₁ принимает участие в синтезе *ацетилхолина*, катализируя в пируватдегидрогеназной реакции образование ацетил-КоА.

4. *Источники.* Довольно много витамина содержится в пшеничном хлебе из муки грубого помола, в оболочке семян хлебных злаков, в сое, фасоли, горохе, дрожжах. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты тиамином печень, нежирная свинина, почки, мозг, яичный желток.

5. *Суточная потребность* составляет 2-3 мг.

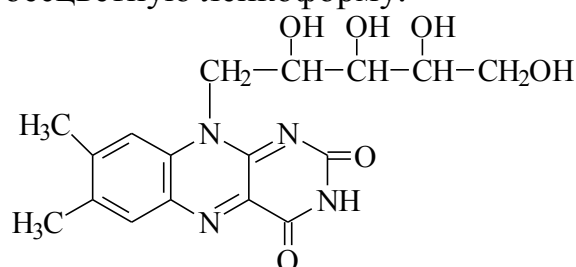
6. *Гиповитаминоз* проявляется слабостью, снижением аппетита, тошнотой, нарушением периферической чувствительности, онемением пальцев, ощущением ползания «мурашек», болями по ходу нервов. При авитаминозе развивается заболевание *бери-бери*, что в переводе с индийского означает овца, т.к. походка больного человека напоминает поступь овцы. Характерно поражение сердечно-сосудистой и нервной систем. Особая чувствительность нервной ткани к недостатку тиамин объясняется тем, что коферментная форма этого витамина необходима нервным клеткам для усвоения глюкозы.

Витамин В₂ (рибофлавин)

1. *Структура.* Витамин В₂ отличается от других витаминов желтым цветом (*flavus* – желтый). Рибофлавин впервые был выделен из кисломолочной сыворотки. Молекула рибофлавина состоит из гетероциклического изоаллоксазинового ядра, к которому в 9-м положении присоединен спирт рибитол (производное D-рибозы). Термином флавины обозначаются многие производные изоаллоксазина, обладающие В_в-витаминной активностью.

Биосинтез флавинов осуществляется растительными и многими бактериальными клетками, а также плесневыми грибами и дрожжами. Благодаря микробному биосинтезу рибофлавина в желудочно-кишечном тракте жвачные животные не нуждаются в этом витамине. У других животных и человека синтезированных в кишечнике флавинов недостаточно для предупреждения гиповитаминозов. Витамин В₂ хорошо растворим в воде, устойчив в кислой среде, но легко разрушается в

нейтральной и щелочной, в также под действием видимого и УФ-света. Витамин В₂ легко подвергается обратимому восстановлению, присоединяя водород по месту двойных связей (1 и 10), превращаясь из оранжево-желтого раствора в бесцветную лейкоформу.



2. *Метаболизм.* В пище витамин В₂ находится преимущественно в составе своих коферментных форм, связанных с белками – флавопротеинов. Под влиянием пищеварительных ферментов витамин высвобождается и всасывается путем простой диффузии в тонком кишечнике. В клетках слизистой кишечника, крови, печени и других тканях рибофлавин фосфорилируется до флавиномононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД).

3. *Биологическая роль.* Основное значение витамина В₂ состоит в том, что он входит в состав флавиновых коферментов – ФМН и ФАД. Различают два типа реакций, катализируемых флавопротеинами:

1) *Простые дыхательные системы* – это прямое окисление субстрата с участием кислорода, перенос на него атомов водорода с образованием Н₂О₂ и выделением энергии в виде тепла: *оксидазы L- и D-аминокислот, ксантиноксидаза* (разрушение пуриновых азотистых оснований), *альдегиддегидрогеназа* (деградация альдегидов).

2) *Участие в сложных дыхательных системах* (полная и укороченная цепи переноса электронов во внутренней мембране митохондрий): *сукцинатдегидрогеназа* и *ацил-КоА-дегидрогеназа* (дегидрирование метаболита ЦТК сукцината и ацил-КоА при окислении жирных кислот и направление протонов и электронов в укороченную дыхательную цепь); *НАДН-дегидрогеназа* (перенос протонов и электронов от НАДН+Н⁺ матрикса митохондрий в полную цепь переноса протонов и электронов во внутренней мембране митохондрий, разделение потоков протонов и электронов); *дигидролипоилдегидрогеназа* (фермент окислительного декарбоксилирования α-кетокислот, переносящий протоны и электроны с восстановленного ФАД на НАД⁺ и последующем введении их в полную цепь переноса электронов внутренней мембраны митохондрий).

4. *Источники.* Основными источниками рибофлавина являются печень, почки, желток куриного яйца, творог. В кислом молоке витамина содержится больше, чем в свежем. В растительных продуктах витамина В₂ мало (исключение – миндальные орехи). Частично дефицит рибофлавина восполняется кишечной микрофлорой.

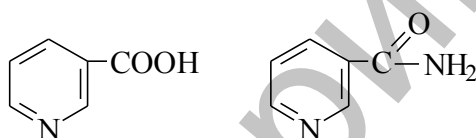
5. *Суточная потребность* 2-3 мг.

6. *Гиповитаминоз*. Недостаток витамина В₂, как и других витаминов, проявляется слабостью, повышенной утомляемостью, склонностью к простудным заболеваниям. К специфическим проявлениям недостаточности рибофлавина относятся воспалительные процессы в слизистых оболочках. Слизистая губ и полости рта становится сухой, язык приобретает ярко-красный цвет, в углах рта появляются трещины. Отмечается повышенное шелушение эпителия кожи, особенно на лице.

Витамин РР (витамин В₅, никотиновая кислота, никотинамид, ниацин; антипеллагрический витамин)

1. *Структура*. Витамин РР выделен К.Эвельгеймом в 1937 г. Его введение предохраняло от заболевания пеллагра или излечивало ее. РР означает противопеллагрический (preventive pellagra).

Никотиновая кислота является пиридин-3-карбоновой кислотой, никотинамид – ее амидом. Оба соединения в организме легко превращаются друг в друга и поэтому обладают одинаковой витаминной активностью.



Витамин РР плохо растворим в воде, но хорошо в водных растворах щелочей.

2. *Метаболизм*. Поступающий с пищей витамин РР быстро всасывается в желудке и кишечнике в основном путем простой диффузии. С током крови никотиновая кислота попадает в печень и другие органы, несколько медленнее проникает в них никотинамид. В тканях оба соединения преимущественно используются для синтеза коферментных форм НАД⁺ и НАДФ⁺. Часть никотинамидных коферментов синтезируется в организме животных из *триптофана*. Однако этот путь, в который вовлекается до 2% метаболического пула триптофана, значительно уступает по эффективности первому (т.е. из прямого витаминного предшественника).

3. *Биологическая роль*. Значение витамина РР определяется ролью коферментов НАД⁺ и НАДФ⁺.

1) НАД⁺ входит в состав дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные превращения пирувата, изоцитрата, α-кетоглутарата, малата и др. Эти реакции чаще локализованы в митохондриях и служат для освобождения энергии в сопряженных митохондриальных цепях переноса протонов и электронов.

2) НАДФ⁺ входит в состав дегидрогеназ (редуктаз), которые чаще локализованы в цитозоле или эндоплазматическом ретикулуме и служат для восстановительных синтезов (НАДФ-зависимые дегидрогеназы пентозофосфатного пути, синтеза жирных кислот и холестерина,

микросомальные и митохондриальные монооксигеназные системы для синтеза желчных кислот, кортикостероидных гормонов).

3) НАД^+ и НАДФ^+ - аллостерические регуляторы ферментов энергетического обмена

4. *Источники.* Продукты животного (печень, мясо) и растительного происхождения (рис, хлеб, картофель). Молоко и яйца содержат ниацин, но в них содержится триптофан, что может компенсировать недостаточное поступление никотинамида с пищей.

5. *Суточная потребность* составляет 15-25 мг.

6. *Гиповитаминоз.* Характерным признаком недостаточности витамина РР является симптомокомплекс «три Д»: дерматит, диарея и деменция. В основе заболевания лежит нарушение пролиферативной активности и энергетики клеток. Дерматит чаще всего отмечается на открытых участках кожи, которая под действием солнечных лучей краснеет, покрывается пигментными пятнами (на лице в виде крыльев бабочки) и шелушится. Язык становится ярко-красным и болезненным, утолщается, на нем появляются трещины. Расстройство пищеварения проявляется тошнотой, отсутствием аппетита, болями в животе. Нарушается функция периферических нервов и центральной нервной системы.

Симптомы гиповитаминоза развиваются:

а) У лиц с недостатком белка в диете. Объясняется это тем, что животные белки содержат оптимальное количество аминокислоты триптофана, витамина B_6 и некоторые другие компоненты, необходимые для синтеза ниацина.

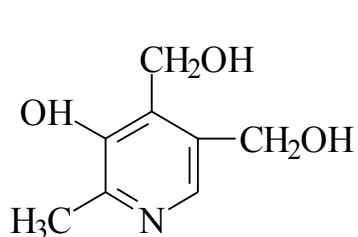
б) При постоянном питании маисом, где ниацин находится в связанной форме

в) При постоянном питании сорго, зерна которого содержат высокую концентрацию лейцина – ингибитора ключевого фермента превращения триптофана в НАД.

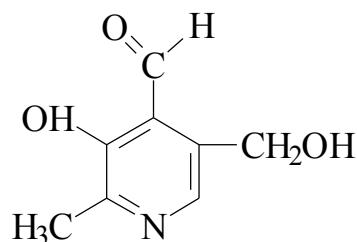
г) При дефиците витамина B_6 и его коферментных форм пиридоксальфосфата, необходимого для синтеза из триптофана коферментных форм.

Витамин B_6 (пиридоксин, антидерматитный витамин)

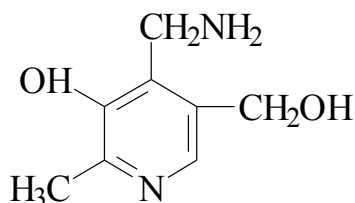
1. *Структура.* Витамин B_6 включает три природных производных пиридина, обладающих одинаковой витаминной активностью: пиридоксина, пиридоксаля, пиридоксамина, отличающихся друг от друга наличием соответственно спиртовой, альдегидной или аминогруппы. Витамин B_6 открыт в 1934 г. А.Сент-Дьердьи. Пиридоксин хорошо растворяется в воде и этаноле, устойчив в кислой и щелочной среде, но легко разрушается под действием света при $\text{pH}=7,0$.



Пиридоксол



Пиридоксаль



Пиридоксамин

2 *Метаболизм.* Всосавшись в тонком кишечнике, все формы витамина с током крови разносятся к тканям и, проникая в клетки, фосфорилируются с участием АТФ. Коферментные функции выполняют два фосфорилированных производных пиридоксина: пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.

3. *Биологическая роль.* Витамин В₆ характеризуется широким спектром биологического действия. Он принимает участие в регуляции белкового, углеводного и липидного обмена, биосинтезе гема и биогенных аминов, гормонов щитовидной железы и других биологически активных соединений. Коферментные формы витамина В₆ входят в состав следующих ферментов:

1) *Аминотрансфераз аминокислот*, катализирующих обратимый перенос NH₂-группы от аминокислоты на α-кетокислоту (образование заменимых аминокислот, непрямо́е дезаминирование и восстановительное аминирование аминокислот).

2) *Декарбоксилаз аминокислот*, отщепляющих карбоксильную группу аминокислот, что приводит к образованию биогенных аминов.

3) Ферментов, осуществляющих *неокислительное дезаминирование* серина, треонина, триптофана, серусодержащих аминокислот.

4) *Мышечной фосфорилазы* (распад гликогена).

4. *Источники.* Витамин В₆ богаты бобовые, зерновые культуры, мясные продукты, рыба, картофель. Он синтезируется кишечной микрофлорой, частично покрывая потребность организма в этом витамине.

5. *Суточная потребность.* 2-3 мг

6. *Гиповитаминоз.* Основными проявлениями недостаточности витамина В₆ являются гипохромная анемия и судороги. Отмечается развитие сухого себорейного дерматита, стоматита и глоссита. Чаще всего пиридоксиновая недостаточность:

а) наблюдается у маленьких детей при искусственном вскармливании стерилизованным молоком (разрушается витамин В₆), у беременных при токсикозах;

б) групповой недостаточности витаминов группы В;

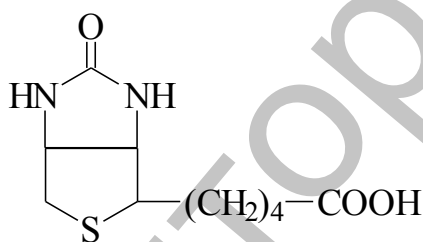
в) подавлении микрофлоры антибиотиками;

г) у алкоголиков, поскольку ацетальдегид стимулирует дефосфорилирование пиридоксальфосфата

Витамин Н (биотин)

Биотин – это первое вещество, которое было определено как необходимый ростовой фактор для микроорганизмов. Позже было показано токсическое действие сырого яичного белка на крыс. Употребление печени или дрожжей снимало этот эффект. Фактор, предотвращающий развитие токсикоза, был назван витамином Н или биотином (от греч. *bios* – жизнь).

1. *Структура.* Молекула биотина состоит из *имидазольного* и *тиофенового* колец и *боковой цепи*, представленной остатком *валериановой кислоты*. В пище биотин представлен биоцитином, который высвобождается путем протеолиза.



2. *Метаболизм*

1) Биотин не модифицируется в организме, но ковалентно связывается с ферментами, в которых выполняет функцию *протетической группы*.

2) Биотин связывается через свободную карбоксильную группу с остатком лизина апофермента. Комплекс биотин-фермент взаимодействует с CO₂ в присутствии АТФ (источник энергии) с образованием комплекса карбоксибиотин-фермент.

3) *Биотинидаза* катализирует удаление биотина от фермента во время метаболизма белков, что позволяет использовать биотин повторно.

3. *Биологическая роль.* Биотин действует как кофермент реакций *промежуточного карбоксилирования*, в которых служит переносчиком CO₂. В отличие от фотосинтезирующих клеток, клетки животных не могут связывать CO₂. Биотин участвует в реакциях временной фиксации углекислоты с выделением ее через несколько реакций. В организме 4 фермента используют биотин как кофермент.

1) *Пируваткарбоксилаза*. В результате карбоксилирования пирувата образуется оксалоацетат (ЩУК), который используется в глюконеогенезе и ЦТК.

2) *Ацетил-КоА-карбоксилаза* катализирует карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Реакция используется при биосинтезе высших жирных кислот.

3) *Пропионил-КоА-карбоксилаза* превращает пропионил-КоА в D-метилмалонил-КоА, который превращается в сукцинат (вступает в ЦТК).

4) *β-метил-кродонил-КоА-карбоксилаза*, участвующая в катаболизме лейцина и веществ, имеющих в составе изопреноидные структуры

4. *Источники*. Биотин в достаточном количестве синтезируется микрофлорой кишечника. Пищевые источники: печень, сердце, яичный желток, отруби, бобы, соя, цветная капуста и др.

5. *Суточная потребность*. 150-200 мкг.

6. *Дефицит*. Причиной гиповитаминоза являются:

а) применение антибиотиков, которые подавляют рост кишечной микрофлоры;

б) поступление в организм большого количества *авидина* – гликопротеина присутствующего в куриных яйцах, который нарушает всасывание биотина из-за образования нерастворимого комплекса;

в) нахождение длительное время на парэнтеральном питании.

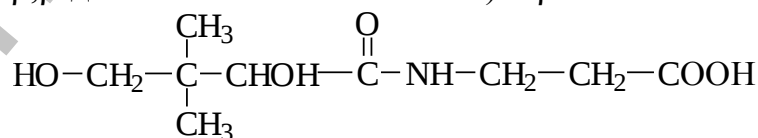
г) наследственный дефект фермента, который присоединяет биотин к лизиновым остаткам апофермента.

Симптомы гиповитаминоза включают себоррейный дерматит, тошноту, выпадение волос, боли в мышцах.

Пантотеновая кислота (витамин В₃)

Витамин В₃ широко распространен в природе, отсюда и его название – пантотеновая кислота (от *panthos* – повсюду). Витамин открыт Р.Вильямсом в 1933 г., спустя десятилетие от уже был синтезирован химическим путем.

1. *Структура*. Пантотеновая кислота состоит из пантоевой кислоты (α,γ-дигидрокси-β,β-диметилмасляная кислота) и β-аланина.



Пантотеновая кислота представляет собой вязкую светло-желтую жидкость, хорошо растворимую в воде. Она малоустойчива и легко гидролизуеться по месту пептидной связи под действием слабых кислот и щелочей.

2. *Метаболизм*. Всасываясь на всем протяжении тонкого кишечника и в толстой кишке, в зависимости от концентрации путем простой диффузии или активного транспорта, пантотеновая кислота с током крови поступает в ткани. Пантотеновая кислота фосфорилируется с

использованием АТФ до 4'-фосфопантотената. Присоединение цистеина и декарбоксилирование приводит к образованию тиоэтанолamina, из которого образуется 4'-фосфопантотеин – простетическая группа кофермента А (HS-KoA) и ацилпереносящего белка (АПБ).

3. *Биологическая роль.* Тиоловая группа в HS-KoA и АПБ действует как переносчик ацильных радикалов.

HS-KoA участвует в важнейших метаболических процессах:

а) обмен углеводов – окислительное декарбоксилирование пирувата в ацетил-KoA и α-кетоглутарата в сукцинил-KoA;

б) β-окисление жирных кислот на этапах активации до образования ацил-KoA и тиолитическом расщеплении с выделением ацетил-KoA и укороченного на 2 углеродных атома ацил-KoA;

в) в форме ацетил-KoA переносится остаток ацетила на холин с образованием медиатора ацетилхолина;

г) сукцинил-KoA участвует в синтезе порфиринов;

д) биосинтез жирных кислот – переносчик метаболитов в пальмитатсинтазном комплексе выполняет 4-фосфопантотеин;

ж) ацетил-KoA используется для синтеза кетонowych тел, холестерина и стероидных гормонов.

Ацетил-KoA занимает центральное место в процессах взаимосвязи обменов углеводов, аминокислот и жирных кислот.

4. *Источники.* Пантотеновая кислота широко распространена в продуктах животного (печень, почки, яйца, мясо, молоко и др.) и растительного (картофель, капуста, фрукты и др.) происхождения. Синтезируется кишечной микрофлорой.

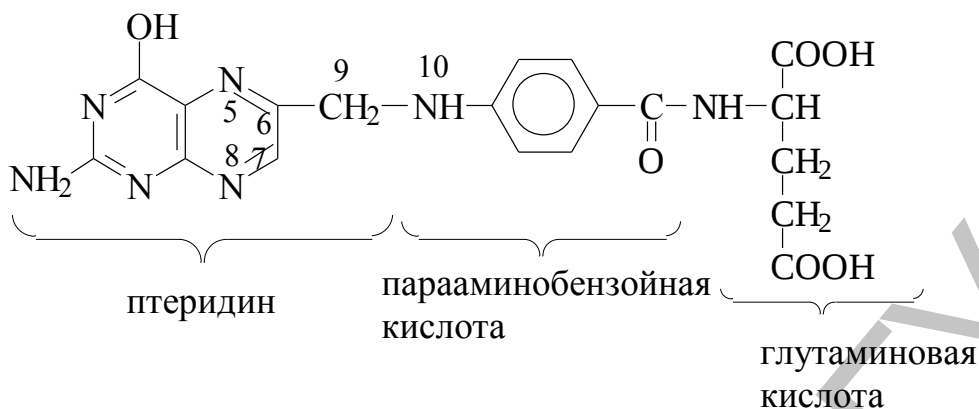
5. *Суточная потребность.* 10-15 мг

6. *Гиповитаминоз.* В связи с широким распространением витамина в продуктах питания авитаминоз В₃ не встречается. Симптомы гиповитаминоза: дерматиты, невриты, язвы слизистых пищеварительного тракта, нарушения продукции стероидных гормонов.

Фолиевая кислота (фолацин, витамин В₉, витамин В_с)

Витамин обнаружили в 1930 г., когда было показано, что люди с определенным типом мегалобластической анемии могли быть излечены принятием в пищу дрожжей или экстракта печени. В 1941 г. фолиевая кислота была выделена из зеленых листьев (лат. folium - лист, отсюда и название витамина). Витамином В_с это соединение назвали из-за его способности излечивать анемию у цыплят (от англ. chicken – цыпленок)

1. *Структура.* Фолиевая кислота состоит из птеридина, связанного с р-аминобензойной кислотой (ПАБК) и глутаминовой кислотой.



Фолиевая кислота плохо растворима в воде и органических растворителях, но хорошо в щелочных растворах. Разрушается под действием света, при обработке и консервировании овощей.

2. *Метаболизм.* Фолат в пище присутствует в форме полиглутамата. Внешние остатки глутамата удаляются в кишечнике до всасывания, главным образом, в тонком кишечнике. *Коферментной формой* фолиевой кислоты является 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК), которая образуется из фолиевой кислоты под действием фермента дигидрофолатредуктазы и с использованием НАДФН как донора атомов водорода

3. Биологическая роль

1) Фолиевая кислота является переносчиком одноуглеродных радикалов: метильного ($-\text{CH}_3$), метиленового ($=\text{CH}_2$), метинильного ($\equiv\text{CH}$), формильного ($-\text{CHO}$) и формиминового ($-\text{CH}=\text{NH}$). Одноуглеродные фрагменты связываются с ТГФК в положениях N^5 или N^{10} . Присоединение формильного радикала в 5 положении приводит к образованию N^5 -формилТГФК, которая известна как *фолининовая* кислота. МетилентГФК образуется при взаимодействии ТГФК с глицином, серином или холином.

2) Фолат необходим для синтеза пуриновых нуклеотидов (2 и 8 атомы углерода) и синтеза тимина. $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилентГФК вводит метильную группу при синтезе тимидилата, необходимого для синтеза ДНК и образования эритроцитов.

3) Участвует в метаболизме глицина, серина и этаноламина.

4) N-формилметионин является *инициирующей аминокислотой* в биосинтезе белка.

5) В крови ТГФК присутствует как N^5 -метилТГФК. Витамин B_{12} необходим для превращения N^5 -метилТГФК в ТГФК в реакции превращения гомоцистеина в метионин. Эта реакция необходима для освобождения свободной ТГФК и повторного использования в одноуглеродном метаболизме. При дефиците витамина B_{12} блокируется превращение N^5 -метилТГФК в ТГФК.

4. *Источники:* кишечная микрофлора, свежие овощи – салат, капуста, морковь, помидоры, лук.

5. *Суточная потребность*: 50-200 мкг.

6. *Дефицит*. При дефиците ТГФК снижается синтез пуринов и тимина, что приводит к нарушению синтеза ДНК. Это проявляется развитием *мегалобластической анемии*, которая характеризуется появлением в крови незрелых ядросодержащих форм эритроцитов.

Витамин В₁₂ (*кобаламин, антианемический витамин*)

Злокачественная анемия (болезнь Аддисона-Бирмера) оставалась смертельным заболеванием до 1926 г., когда впервые для ее лечения применили сырую печень. Поиски содержащегося в печени антианемического фактора привели к успеху и в 1955 г. Дороти Ходжкин расшифровала структуру этого фактора и его пространственную конфигурацию с помощью метода рентгеноструктурного анализа.

1. *Структура*. Структура витамина В₁₂ отличается от строения всех других витаминов наличием в молекуле иона металла – кобальта. Кобальт связан координационными связями с атомами азота, входящими в состав четырех пиррольных колец, которые образуют планарную (плоскую структуру), называемую *коррином*. I, II, III пиррольные кольца связаны через метиленовые мостики, IV и I – непосредственно. Перпендикулярно плоскости коррина расположен нуклеотид, содержащий 5,6-диметилбензимидазол, α-D-рибозу и остаток фосфорной кислоты, который связан координационной связью с атомом кобальта (рис. 15.1). В пище кобаламин содержит атом кобальта в окисленной форме (III). Для образования активных коферментных форм атом кобальта восстанавливается до Co (I).

В витамине В₁₂ атомы углерода пиррольных колец замещены метильными, ацетамидными и пропионамидными радикалами. Пропионамидный радикал в IV кольце через изопропиловый спирт связан с фосфатным остатком нуклеотида.

Атом кобальта трехвалентен и ковалентно связан с группой CN⁻. Вся структура получила название цианокобаламина или кобаламина, поскольку считают, что цианид-ион является артефактом, зависящим от способа выделения.

Кобаламины растворимы в воде, термостабильны и устойчивы в присутствии растворов кислот при pH 4,0.

2. *Метаболизм*

1) Витамин В₁₂, содержащийся в пище, называют *внешним фактором Кастла*. Всасывается витамин в тонком кишечнике в комплексе с *внутренним фактором Кастла* (гликопротеин, секретируемый париетальными клетками желудка).

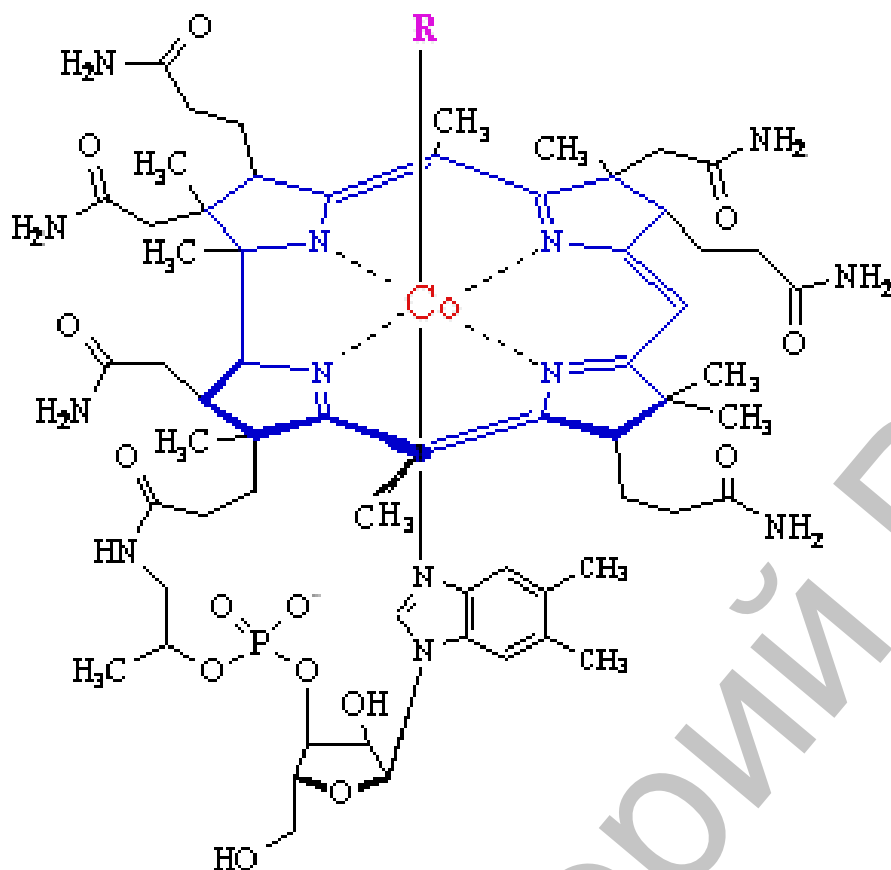


Рис. 15.1. Витамин В₁₂

Витамин В₁₂ находится в пище в комплексе с белками. В желудке под действием соляной кислоты и пепсина витамин В₁₂ высвобождается из комплекса с белками и связывается с кобалофилином (R-протеин, гаптокоррин) – белком, секретируемым слюной. В двенадцатиперстной кишке комплекс распадается, кобалофилин гидролизуется панкреатическими протеазами, витамин В₁₂ связывается с внутренним фактором Кастла. Комплекс витамин В₁₂-внутренний фактор Кастла всасывается в дистальной части подвздошной кишки через рецепторы (кубилины), которые связывают комплекс, но не связывают свободный фактор или свободный витамин. Другой белок – мегалин – связан с кубилином и обеспечивает процесс эндоцитоза для всасывания комплекса

2) Витамин транспортируется в крови в комплексе с белками, называемыми *транскобаламинами* и превращается в метилкобаламин и 5-дезоксиаденозилкобаламин в печени, клетках костного мозга и ретикулоцитах. *Транскобаламин I* участвует в хранении и резервировании водорастворимого витамина в печени и плазме крови (циркулирующий резерв). *Транскобаламин II* транспортирует витамин в крови. Комплекс транскобаламин II-витамин В₁₂ поступает в периферические клетки путем эндоцитоза. В лизосомах клеток транскобаламин II разрушается, витамин высвобождается в виде гидроксикобаламина, который либо превращается

в цитозоле в метилкобаламин, либо в митохондриях – в 5-дезоксиаденозилкобаламин. В печени запасается около 4-5 мг витамина и этих запасов достаточно для обеспечения организма витамином в течение 4-6 лет.

3. Биологическая роль

1) В организме человека витамин необходим для 2-х важнейших реакций:

а) 5-дезоксиаденозилкобаламин является коферментом метилмалонил-КоА-мутазы, который превращает метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Метилмалонил-КоА образуется как промежуточный продукт катаболизма валина и карбоксилирования пропионил-КоА, синтезирующегося при катаболизме изолейцина, холестерина, жирных кислот с нечетным числом атомов углерода или прямо из пропионовой кислоты (продукт микробиологической ферментации в кишечнике). В результате этой реакции метилмалонил-КоА превращается в сукцинил-КоА.

б) Метилкобаламин является коферментом гомоцистеинметилтрансферазы, которая катализирует метилирование гомоцистеина в метионин. Кобаламин забирает метильные группы от N⁵-метилтетрагидрофолиевой кислоты и превращает ее в тетрагидрофолат. Метаболическое значение этой реакции состоит в том, что сохраняются запасы метионина и тетрагидрофолата, что необходимо для синтеза пуриновых, пиримидиновых нуклеотидов и синтеза нуклеиновых кислот. При дефиците витамина B₁₂ фолат постоянно находится в форме N⁵-метил-ТГФК («фолатная» или метильная ловушка).

в) Витамин B₁₂ требуется для превращения D-рибонуклеотидов в дезокси-D-рибонуклеотиды. Эту реакцию у прокариот катализирует специфическая рибонуклеотид-редуктаза.

4. Источники. Основным источником витамина являются микроорганизмы. В растительной пище витамин B₁₂ отсутствует. В небольших количествах витамин образуется бактериями на поверхности фруктов. Значительное количество витамина содержится в печени, дрожжах, молоке, яичном желтке.

5. Дефицит

а) Энтеропеченочная циркуляция витамина B₁₂ обеспечивает организм достаточным количеством витамина и дефицит может развиваться при отсутствии витамина в диете в течение нескольких лет. При заболеваниях желудка или подвздошной кишки дефицит витамина может развиваться быстрее.

б) Пернициозная анемия является следствием дефицита витамина B₁₂ и характеризуется нарушением синтеза ДНК, образования эритроцитов и появлением незрелых ядерных форм эритроцитов (мегалобластов).

в) длительное вегетарианство может приводить к дефициту витамина В₁₂.

6. *Суточная потребность.* 2-5 мкг.

15.5. Витаминоподобные вещества

Кроме витаминов, описанных выше, в пище присутствуют другие компоненты, которые являются незаменимыми факторами.

Холин

Best и Huntsman (1934) обнаружили, что дефицит холина у крыс вызывает жировое перерождение печени. Тем не менее, холин может адекватно синтезироваться в организме (из серина) и содержится во многих продуктах (молоко, яйца, печень, злаковые и др.).

Структура. По химическому строению холин – аминоэтиловый спирт, содержащий 3 метильные группы у атома азота.



Биологическая роль

1. Является компонентом фосфолипидов (лецитины), которые являются компонентами мембран и участвуют в транспорте липидов.

2. Предотвращает накопление липидов в печени (липотропный фактор), что объясняется участием в синтезе фосфолипидов и липопротеинов, транспортирующих жиры из печени.

3. Участвует в метаболизме одноуглеродных радикалов из-за наличия в структуре трех метильных групп.

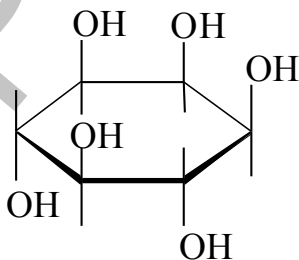
4. Предшественник для синтеза ацетилхолина, который участвует в передаче нервного импульса.

Недостаточность холина. Проявления недостаточности холина у человека не описаны. У животных отмечаются жировая инфильтрация печени, повреждение кровеносных сосудов.

Суточная потребность. Источники. Пищевым источником являются мясо и злаковые растения. Суточная потребность составляет в среднем 0,5 г.

Инозит

Структура. По химическому строению – шестиатомный циклический спирт циклогексана, хорошо растворимый в воде.



Биологическая роль

1. Необходим для синтеза фосфатидилинозитола (компонент клеточных мембран).

2. Действует как липотропный фактор (вместе с холином) и предотвращает накопление жиров в печени.

3. Является посредником в действии некоторых гормонов (инозитол-1,4,5-трифосфат). ИТФ способствует высвобождению кальция из ЭПР.

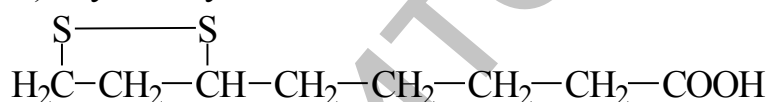
4. Высокая концентрация отмечена в сердечной мышце, хотя функция не известна.

Недостаточность инозитола у животных проявляется жировой дистрофией печени и падением содержания в ней фосфолипидов, облысением и анемией. У молодых особей наблюдается задержка роста.

Суточная потребность. Источники. Инозитол находится во всех продуктах животного и растительного происхождения, особенно много его в печени, мозге, мясе, яичном желтке, а также в хлебе, картофеле, зеленом горохе, грибах. Суточная потребность приблизительно 1,-1,5 г.

Липоевая кислота (витамин N)

Структура. В 1951 г. было выделено вещество, которое активно участвовало в обмене пирувата и ацетил-КоА – ключевых метаболитов клетки. Оно было названо липоевая кислота, так как хорошо растворялось в жирорастворителях (lipid – жир). По химическому строению липоевая кислота является серосодержащей жирной кислотой (6,8-дитиооктановая кислота). Существует в окисленной и восстановленной формах.



Биологическая роль

1. Липоевая кислота участвует в реакциях декарбоксилирования вместе с другими витаминами (тиамин, ниацин, рибофлавин и пантотеновая кислота), в результате которых пируват превращается до ацетил-КоА и α-кетоглутарат до сукцинил-КоА.

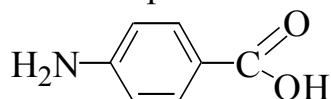
2. Липоевая кислота – антиоксидант. Обнаружена ее высокая эффективность в защите организма от повреждающего действия радиации и токсинов.

Гипо- и гипervитаминозы липоевой кислоты у человека не описаны.

Суточная потребность. Источники. Наиболее богаты липоевой кислотой дрожжи, мясные продукты, молоко. Суточная потребность предположительно 1-2 мг.

Парааминобензойная кислота (ПАБК)

Структура. Является структурным компонентом фолиевой кислоты. Химическое строение ПАБК представлено ниже.



ПАБК плохо растворяется в воде, хорошо – в спирте и эфире, химически устойчива.

Биологическая роль

1. Витаминные свойства ПАБК связаны с тем, что она входит в состав молекулы фолиевой кислоты. Следовательно, ПАБК принимает участие во всех реакциях метаболизма, где необходима фолиевая кислота.

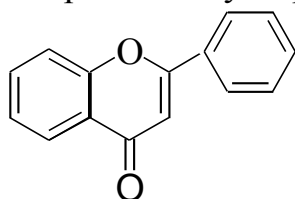
2. ПАБК оказывает антигипоксическое, антиатерогенное действие, препятствует окислению адреналина, положительно влияет на функцию щитовидной железы.

Суточная потребность. Источники. ПАБК содержится практически во всех продуктах питания. Наиболее богаты ее печень, мяо, молоко, яйца, дрожжи. Суточная потребность не установлена.

Витамин Р (рутин, биофлавоноиды)

Структура. В 1936 г. А.Сент-Дьерди из кожуры лимона выделил действующее начало, уменьшающее ломкость, проницаемость капилляров. Оно получило название витамин Р (от *permeability* – проницаемость).

Биофлавоноиды – разнообразная группа растительных полифенольных соединений, в основе структуры которых лежит дифенилпропановый углеродный скелет.



Биологическая роль

1. Биофлавоноиды могут использоваться для построения биологически важных соединений в клетке, в частности, убихинона.

2. Рутин и квертецин – полифенолы, обладающие Р-витаминной активностью, являются эффективными антиоксидантами. Флавоноиды (катехины) зеленого чая способны оказывать выраженное цитопротективное действие, в основе которого лежит их свойство перехватывать свободные радикалы. В отличие от витамина Е, биофлавоноиды кроме прямого антирадикального действия могут также связывать ионы металлов с переменной валентностью, ингибируя, тем самым, процесс ПОЛ биомембран.

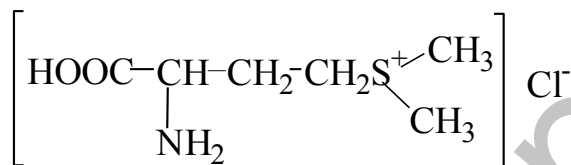
3. Достаточно изученным является капилляроукрепляющее действие витамина Р, обусловленное его способностью регулировать образование коллагена (синергизм с витамином С) и препятствовать деполимеризации основного вещества соединительной ткани гиалуронидазой.

Гиповитаминоз. Симптоматика недостаточности биофлавоноидов сводится к явлениям повышенной проницаемости и ломкости капилляров, петехиям (точечным ковоизлияниям), кровоточивости десен.

Суточная потребность. Источники. Р-витаминные вещества содержатся в тех же растительных продуктах, что и витамин С. Наиболее богаты ими черноплодная рябина, черная смородина, яблоки, виноград, лимоны, чайный лист и плоды шиповника. Биофлавоноид цитрон придает кожуре лимона желтый цвет. Потребление флавоноидов в составе натуральных продуктов (фруктов, соков и виноградных вин), где они могут находиться в виде комплексов с металлами, может быть более эффективным, чем использование очищенных витаминных препаратов. Суточная потребность 25-50 мг.

Витамин U

Структура. Витамин U был обнаружен в 1950 г. в сырых овощах. Поскольку сок сырых овощей, особенно капусты, обладал способностью предотвращать или задерживать развитие экспериментальных язв желудка, выделенный из него витамин назвали *противоязвенным*, или *витамином U* (от лат. *ulcus* – язва). По химическому строению он представляет собой S-метилметионин:



Витамин U хорошо растворим в воде. При варке пищи легко разрушается, особенно в нейтральной и щелочной среде.

Биологическая роль

Подобно метионину витамин U является донором метильных групп в реакциях синтеза холина и креатина.

Недостаточность витамина у человека не описаны. Цыплята, которым скармливался алкалоид цинкофен с целью моделирования язвы желудка, излечивались, если им в корм добавлялся свежий овощной сок.

Суточная потребность. Источники. Источниками витамина U являются свежая капуста, петрушка, морковь, лук, перец, зеленый чай, свежее молоко, печень.

15.6. Взаимосвязь обмена веществ

В процессе изучения биохимии обмена углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот, минеральных веществ и различные механизмы их регуляция рассматривались отдельно. Однако в целостном организме все эти процессы взаимосвязаны и условно могут быть представлены в виде карты метаболизма. Понимание интеграционных процессов в обмене веществ - это более высокая стадия изучения и понимания предмета. Интеграционные механизмы можно проследить на различных уровнях, начиная с биосферного и кончая межклеточным метаболизмом. Так, в биосфере происходит постоянный обмен веществ и энергии. В зеленых растениях из углекислого газа и воды в процессе фотосинтеза образуется молекула глюкозы, в химических связях которой аккумулируется солнечная

энергия. В организме животного или человека эта глюкоза подвергается распаду до углекислого газа и воды с выделением энергии, которая и используется для движения, трансмембранного транспорта и биосинтезов.

Интегрирующие системы. Все клетки организма имеют одно и то же количество ДНК, но в разных клетках активными являются разные участки и разное количество ДНК. Это позволяет разделить клетки на различные типы по метаболизму в зависимости от степени их дифференцировки. Например, узкоспециализированные клетки зрелых эритроцитов, которые потеряли ядро, митохондрии и предназначены для транспорта кислорода и углекислого газа и мультифункциональные клетки печени. Клетки, являющиеся *функциональной единицей организма*, образуют сложную иерархически организованную систему: клетки → ткани → органы → системы органов → организм. Такая организация обеспечивает рациональное разделение функциональной активности, но требует участия контролирующих инстанций, согласующих и координирующих работу различных органов и тканей.

Эту интегрирующую роль играют три важнейшие системы:

1) Нервная система, которая является центром обработки информации и принятия решений, воспринимающим импульсы, которые отражают воздействия на организм изменяющихся условий среды (гипоксия, голод, жажда, изменение температуры, стресс и др.), и передающим соответствующие команды другим органам и тканям с целью приспособления их функционального состояния к этим изменениям условий среды.

2) Эндокринная система (или более общая система гуморальной регуляции) регулирует метаболизм с помощью дистантно действующих химических биорегуляторов (рост, размножение, развитие, стресс-реакция и пр.). Относительно быстрые адаптивные реакции эндокринной системы способствуют поддержанию постоянства концентрации в крови таких веществ, как глюкоза, липиды, кальций, обеспечивают оптимальное соотношение между синтезом и распадом компонентов тканей в зависимости от энергетических потребностей.

3) Сердечно-сосудистая и лимфатическая системы, которые выполняют коммуникационные функции и служат для переноса всех химических соединений в организме. При помощи их транспортируются газы, пластические и энергетические молекулы, минеральные вещества из внешней среды в клетки тканей, между клетками и тканями и осуществляется выведение из организма проникших в него микроорганизмов, токсинов, ксенобиотиков, конечных продуктов обмена веществ.

Взаимосвязи обмена белков, жиров и углеводов. Между превращениями этих трех групп соединений в процессе обмена должны существовать целесообразные взаимосвязи. Существует несколько различных путей взаимодействия этих классов метаболитов. Это взаимодействие может осуществляться на уровнях общих

предшественников, общих промежуточных метаболитов (пункты переключения), сходных источниках энергетического обеспечения, наличии общего пути катаболизма и образования общих конечных продуктов обмена.

В качестве примера рассмотрим путь аэробного катаболизма глюкозы и отметим наиболее важные промежуточные метаболиты, являющиеся пунктами переключения: глюкоза $\rightarrow$ Г-6-Ф $\rightarrow$ Ф-6-Ф $\rightarrow$ Фосфоенолпируват $\rightarrow$ Пируват $\rightarrow$ Ацетил-КоА $\rightarrow$ Цикл трикарбоновых кислот $\rightarrow$ Митохондриальные цепи переноса электронов и протонов $\rightarrow$ Углекислота и вода. *Глюкозо-6-фосфат* образуется из проникшей в клетку глюкозы в реакции, катализируемой гексо- или глюкокиназой. Присоединение отрицательно-заряженной фосфатной группы не позволяет Г-6-Ф покинуть клетку. Г-6-Ф может превращаться по следующим направлениям:

1) Наличие глюкозо-6-фосфатазы в клетках печени и почек обеспечивает выделение этими органами глюкозы в кровеносное русло.

2) Г-6-Ф может превращаться в гликоген через Г-1-Ф и УДФ-глюкозу.

3) Г-6-Ф может превращаться в глюкозамин и глюкуроновую кислоту, которые необходимы для биосинтеза компонентов межклеточного вещества - гликозамингликанов, а глюкуроновая кислота участвует во второй фазе обезвреживания ксенобиотиков в виде УДФ-глюкуроновой кислоты (образование парных соединений для повышения гидрофильности).

4) Г-6-Ф может превращаться в реакциях пентозофосфатного пути обмена углеводов. При этом образуются пентозофосфаты и затем фосфорибозилпирофосфат, необходимый для биосинтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот (процессы физиологической и репаративной регенерации тканей). Кроме того образуемый НАДФН необходим для ряда биосинтезов (холестерина, жирных кислот и др.), а также используется в реакциях антиоксидантной защиты при свободнорадикальном повреждении клеток.

5) Г-6-Ф может превращаться в специфическом пути реакций от глюкозы до пирувата и затем в реакциях общего пути катаболизма.

Следующим важным пунктом переключения является *пируват*, который может превращаться по следующим направлениям:

1) Реакции карбоксилирования пирувата ведут к образованию щавелевоуксусной кислоты (ЩУК).

2) Реакции окислительного декарбоксилирования пирувата обеспечивают образование ацетил-КоА.

3) В реакции, катализируемой аланин-аминотрансферазой (АлАТ), из пирувата образуется аланин.

4) От пирувата начинается комплекс ферментативных реакций первого обходного пути глюконеогенеза, ведущий к образованию фосфоенолпирувата (обращение пируваткиназной реакции).

Наиболее интересным пунктом переключения является *ацетил-КоА*:

1) Ацетил-КоА образуется из пирувата (углеводы), из жирных кислот (β -окисление), из кетогенных аминокислот и из глицерина.

2) Ацетил-КоА, конденсируясь с ЩУК вступает в цикл трикарбоновых кислот, в котором молекула полностью "сгорает", поставляя атомы водорода в митохондриальные цепи переноса протонов и электронов, а также выделяя углекислый газ.

3) Ацетил-КоА может карбоксилироваться и превращаться в малонил-КоА и далее в жирные кислоты.

4) Три молекулы ацетил-КоА конденсируются и ведут к образованию ГМГ-КоА, а затем кетонных тел или через мевалонат-КоА обеспечивают синтез холестерина.

Следует отметить, что синтез жирных кислот и холестерина требует НАДФН, а синтез кетонных тел не требует восстановительных эквивалентов, т.е. НАДФН.

Среди метаболитов *цикла трикарбоновых кислот* большинство являются узлами переключения. Это неудивительно, исходя из того, что этот цикл является третьей стадией катаболизма и первой стадией анаболизма. Особый интерес представляет α -кетоглутаровая кислота (2-оксoglутарат). Восстановительное аминирование α -кетоглутарата ведет к образованию глутамата. Окислительное дезаминирование глутамата (фермент глутаматдегидрогеназа) ведет к образованию α -кетоглутарата. Если учесть, что глутамат в реакциях трансаминирования собирает аминокрупы от различных аминокислот, можно констатировать роль α -кетоглутарата как триггера в системе общий путь катаболизма $\leftrightarrow$ фонд аминокислот. *Щавелевоуксусная кислота (оксалацетат)* может получаться при карбоксилировании пирувата или при трансаминировании аспартата. Это соединение необходимо для включения ацетил-КоА в цикл трикарбоновых кислот или для превращений в реакциях глюконеогенеза. Как правило, ферменты, катализирующие превращения метаболитов в пунктах переключения, являются регуляторными. Их активность может регулироваться аллостерически (если фермент имеет аллостерический центр) методами форактизации или ретроингибирования, химической модификацией (чаще фосфорилированием-дефосфорилированием) гормонами и биорегуляторами. Кроме того может изменяться количество ферментов (например, глюкокортикоиды стимулируют биосинтез ключевых ферментов глюконеогенеза).

Различные метаболические процессы, обеспечивающие движение, трансмембранный транспорт и биосинтезы, требуют источников энергии. Известно, что ГТФ чаще используется в биосинтезе белков, ЦТФ - липидов и УТФ - углеводов. Однако универсальным источником и аккумулятором энергии является АТФ. Для многих восстановительных синтезов используется НАДФН.

Общим конечным путем для всех систем метаболизма являются цикл лимонной кислоты (ЦТК) и реакции цепей переноса электронов и протонов. Эти протекающие в митохондриях процессы используются для координации целого ряда метаболических реакций на различных уровнях. Цикл трикарбоновых кислот является в клетке главным источником двуокиси углерода для реакций карбоксилирования, с которых начинается синтез жирных кислот и глюконеогенез; та же двуокись углерода поставляет углерод для мочевины и некоторых звеньев пуриновых и пиримидиновых колец. Взаимосвязи между процессами углеводного и азотистого обмена также достигаются посредством промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот (α -кетоглутарат $\leftrightarrow$ глутамат; ЦУК $\leftrightarrow$ аспартат; сукцинат $\leftrightarrow$ гем). Участие аспартата в цепи метаболических реакций от цитруллина до аргинина и в образовании фумарата обеспечивает непосредственную связь между участком цикла трикарбоновых кислот от фумарата до ЦУК (продукция 3 АТФ) и цикла мочевины, использующего эти 3 АТФ для синтеза одной молекулы мочевины.

Для общего пути катаболизма особое значение имеют НАДН и адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ). Высокое содержание АДФ и низкое содержание АТФ свидетельствует о малом запасе энергии; при этом НАДН вовлекается в реакции цепей переноса протонов и электронов, обеспечивая усиление сопряженных реакций окислительного фосфорилирования. Обратное явление наблюдается при низком содержании АДФ и высоком содержании АТФ; ограничивая работу системы переноса электронов, они способствуют использованию НАДН в других восстановительных реакциях - таких, как синтез глутамата или глюконеогенез.

Внутриклеточные регуляторы метаболизма – витамины, являясь незаменимыми компонентами пищи, являются агентами, поддерживающими взаимосвязанные превращения веществ в интересах клетки и организма в целом.

Количественная характеристика взаимопревращений белков, жиров и углеводов



Рассматривая степень взаимопревращений белков, жиров и углеводов, необходимо, прежде всего, рассмотреть взаимопревращения аминокислот, жирных кислот и глюкозы. Рассмотрим возможные пути превращений: 1) синтез глюкозы из аминокислот (глюконеогенез) идет через фосфоенолпируват (гликогенные аминокислоты - арг, асп, асп, цис, глу, глн, гли, гис, мет, про, сер, тре, три, вал); глюконеогенез усилен при голоде, стрессе, диабете; 2) синтез жирных кислот из аминокислот идет через ацетил-КоА (кетогенные аминокислоты - лей, лиз, фен, тир); при этом возможен синтез кетонных тел через ацетоацетил-КоА; 3) синтез заменимых аминокислот из глюкозы путем восстановительного аминирования и трансаминирования с тремя кетокислотами (пируват, ЩУК и α -кетоглутарат); 4) синтез жирных кислот из глюкозы (через ацетил-КоА) и глицерина через 3-фосфоглицериновый альдегид, это путь депонирования энергии; 5) Жирные кислоты весьма слабо превращаются в углеводы; 6) Жирные кислоты практически не превращаются в аминокислоты. Важно отметить односторонность потока веществ в сторону липогенеза от углеводных или белковых источников через ацетил-КоА. Поскольку в организме человека не существуют механизмы, обеспечивающие превращение этого двухуглеродного фрагмента (ацетил-КоА) в трехуглеродные соединения, необходимые для глюконеогенеза или для образования заменимых аминокислот (аланин), обратный переход углерода жирных кислот в глюкозу или белки практически невозможен. Таким образом, можно ранжировать пути взаимопревращений глюкозы, аминокислот и жирных кислот $4 > 2 > 1 > 3 > 5, 6$.

Программные вопросы по биохимии с основами молекулярной биологии для студентов 3 курса биологического факультета

1. Предмет и задачи биологической химии. Важнейшие признаки живой материи. Проявления диалектических законов в организации и функциях живой материи.
2. Объекты биохимического исследования. Основные разделы и направления в биохимии. Место биохимии среди других биологических дисциплин. Биохимия и экология.

3. Важнейшие этапы истории биохимии. Ведущие отечественные и зарубежные ученые-биохимики, их вклад в развитие биохимии. Биохимия и развитие молекулярной биологии, физико-химической биологии и биотехнологии.
4. Белки - важнейшие компоненты организма: функции, классификация. Форма и размеры белковых молекул, молекулярная масса, физико-химические свойства.
5. Первичная структура белков, ее роль. Наследственные и приобретенные протеинопатии. Полиморфизм белков.
6. Конформация белковых молекул (вторичная и третичная структуры). Типы внутримолекулярных связей в белках. Нативная структура и денатурация белков. Структура белков и функция.
7. Четвертичная структура белков. Кооперативные изменения конформации протомеров (гемоглобин в сравнении с миоглобином). Способность белков к специфическим взаимодействиям. Самосборка многомолекулярных белковых структур.
8. Схема и методы выделения индивидуальных белков и характеристика гомогенности выделенного белка. Количественное определение белков.
9. История открытия и изучения ферментов. Особенности биокатализаторов. Специфичность действия ферментов. Особенности выделения ферментов. Классификация и номенклатура ферментов.
10. Структурная и функциональная организация ферментов. Активный и аллостерический центры. Изоферменты. Механизм и стадии ферментативного катализа. Единицы измерения активности ферментов.
11. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата, фермента, температуры и pH.
12. Активаторы и ингибиторы ферментов. Антиметаболиты.
13. Регуляция действия ферментов: аллостерические механизмы, кооперативные эффекты, химическая модификация. Примеры метаболических путей, регулируемых этими механизмами. Физиологическое значение регуляции действия ферментов.
14. Представление о биосинтезе и распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нарушения обмена нуклеотидов.
15. Нуклеопротеиды. ДНК, структурная организация, размеры молекул, способы укладки в хроматине и хромосомах. Репликация ДНК: механизм и биологическое значение. Репликация и фазы клеточного цикла. Повреждения ДНК. Репарация повреждений и ошибок репликации ДНК.
16. Первичная и вторичная структуры РНК. Типы РНК, строение, локализация в клетке, функции. Биосинтез РНК (транскрипция). Строение рибосом и полирибосом. Синтез аминокислот-т-РНК. Субстратная специфичность аминокислот-т-РНК-синтетаз.
17. Биосинтез белков. Биологический код. Основные компоненты белок-синтезирующей системы. Функционирование рибосом и последовательность реакций при синтезе полипептидной цепи. Адапторная функция т-РНК, роль иРНК.
18. Регуляция действия генов. Индукция и репрессия синтеза белков в организме человека. Роль гормонов в регуляции действия генов. Ксенобиотики - ингибиторы матричных синтезов у прокариот и эукариот. Основы генной инженерии.
19. Общая характеристика и функции мембран, компоненты мембран.
20. Модели строения мембран, трансмембранный транспорт.
21. Метаболизм и его функции, регуляция метаболизма в клетке. Введение в биохимию пищеварения, характеристика пищи, ферментов пищеварения. Регуляция пищеварения гормоноподобными веществами.
22. Катаболизм и анаболизм, их взаимосвязь. Эндергонические и экзергонические реакции в метаболизме. АТФ и другие высокоэнергетические соединения. Цикл АДФ-АТФ. Виды фосфорилирования АДФ и пути использования АТФ.

23. Биологическое окисление и пути использования кислорода. Строение митохондрий и структурная организация цепи переноса электронов. Типы окисляемых субстратов. NAD-зависимые дегидрогеназы. FAD-зависимые дегидрогеназы: сукцинатдегидрогеназа и ацил-КоА-дегидрогеназа.
24. Внутренняя мембрана митохондрий и дыхательная цепь: NADH-дегидрогеназа, убихинон, цитохромы, их структура и механизм переноса протонов и электронов на кислород.
25. Окислительное фосфорилирование, коэффициент P/O. Гипотезы механизма окислительного фосфорилирования.
26. Сопряжение окисления с фосфорилированием в дыхательной цепи. H⁺-АТФ-синтетаза. Дыхательный контроль. Разобщение дыхания и фосфорилирования. Гипоэнергетические состояния.
27. Окислительные системы, не связанные с аккумуляцией энергии. Микросомальное окисление. Свободно-радикальное окисление. Роль в патологии клеток.
28. Общие и специфические пути катаболизма. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: строение пируватдегидрогеназного комплекса и последовательность реакций.
29. Цикл трикарбоновых кислот: последовательность реакций и характеристика ферментов, регуляция. Биологическая роль ЦТК.
30. Основные углеводы тканей человека, биологическая роль. Переваривание углеводов, характеристика ферментов. Схема источников и путей расходования глюкозы в организме. Ключевая роль глюкозо-6-фосфата.
31. Биосинтез и мобилизация гликогена: последовательность реакций, физиологическое значение. Регуляция активности фосфоорилазы и синтазы гликогена. Гликогенозы и агликогенозы.
32. Аэробный распад глюкозы: химизм, физиологическое значение. Челночные механизмы переноса восстановительных эквивалентов.
33. Анаэробный распад глюкозы: химизм, физиологическое значение. Центральная окислительно-восстановительная реакция гликолиза. Спиртовое брожение. Метаболизм этанола в организме.
34. Биосинтез глюкозы (глюконеогенез), физиологическое значение. Глюкозо-лактатный (цикл Кори) и глюкозо-аланиновый циклы.
35. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы: химизм, биологическая роль.
37. Пищевые жиры: переваривание, всасывание продуктов расщепления. Роль желчных кислот. Транспорт липидов в организме.
38. Важнейшие липиды тканей человека. Функции липидов. Депонирование и мобилизация жиров в жировой ткани. Регуляция. Транспорт и использование жирных кислот. Химизм окисления глицерола.
39. Активация и окисление высших жирных кислот: химизм, энергетика, физиологическая роль. Биосинтез и использование кетонных тел.
40. Биосинтез жирных кислот: синтез и роль малонил-КоА, характеристика пальмитатсинтазного комплекса, регуляция. Пути образования жирных кислот с более длинной углеродной цепью и ненасыщенных жирных кислот.
41. Транспортные липопротеины крови: характеристика, синтез, физиологическая роль. Липопротеинлипаза.
42. Биосинтез триацилглицеролов, глицерофосфолипидов.
43. Обмен и функции холестерина, прямой и обратный транспорт. Биосинтез холестерина: химизм, регуляция.
44. Основные патологические процессы, связанные с нарушениями превращений ацетил-КоА (голодание, ожирение, атеросклероз, желчно-каменная болезнь, диабет).

45. Взаимосвязь обмена аминокислот, жиров и углеводов. Проявления взаимосвязи. Основные узлы переключения метаболизма (глюкозо-6-фосфат, пируват, ацетил-КоА, субстраты ЦТК).
48. Переваривание белков. Всасывание аминокислот. Динамическое состояние белков в организме. Азотистый баланс. Биологическая ценность пищевых белков и нормы белков в питании. Регуляция пищеварения гормоноподобными веществами.
49. Трансаминирование аминокислот: химизм, значение, характеристика трансаминаз. Непрямое дезаминирование аминокислот.
50. Окислительное дезаминирование аминокислот: химизм, характеристика ферментов. Восстановительное аминирование альфа-кетоглутарата, значение.
51. Декарбоксилирование аминокислот. Образование биогенных аминов, их роль в регуляции метаболизма и функций, обезвреживание.
52. Общее обезвреживание аммиака: синтез мочевины и аммонийных солей, значение процессов.
53. Трансметилирование. Метионин и S-аденозилметионин (участие в синтезе креатина, адреналина, фосфатидилхолина, метилировании чужеродных соединений). Участие тетрагидрофолиевой кислоты в метилировании.
54. Обмен фенилаланина и тирозина. Использование тирозина для синтеза катехоламинов, тироидных гормонов, меланинов. Распад тирозина до фумаровой и ацетоуксусной кислот. Наследственные нарушения обмена фенилаланина и тирозина.
55. Классификация гормонов по химическому строению и механизму действия. Основные механизмы регуляции метаболизма.
56. Центральная регуляция эндокринной системы: гормоны гипоталамуса и тропные гормоны гипофиза.
57. Инсулин: строение, синтез, биологическое действие. Характеристика нарушений обмена веществ при сахарном диабете.
58. Источники и пути расходования глюкозы крови. Регуляция содержания глюкозы в крови инсулином, глюкагоном, адреналином и глюкокортикоидами.
59. Адреналин и норадреналин: строение, синтез, влияние на обмен веществ.
60. Регуляция водно-солевого обмена. Строение, механизм действия вазопрессина и альдостерона. Ренин-ангиотензиновая система.
61. Обмен кальция и фосфатов: роль паратгормона, кальцитонина, витамина Д.
62. Йодтиронины: строение, синтез, метаболизм, влияние на обмен веществ. Гипо- и гипертиреозы. Особенности функции щитовидной железы в связи с аварией на ЧАЭС.
63. Гормоны коры надпочечников - глюко- и минералокортикостероиды. Строение, влияние на обмен веществ. Проявление гипер- и гипofункции.
64. Мужские половые гормоны: строение, влияние на обмен веществ. Анаболические препараты стероидной структуры. Женские половые гормоны: строение, роль в половом цикле, влияние на обмен веществ.
65. Простагландины и их роль в регуляции метаболизма и физиологических функций. Кининовая система и ее функции. Использование гормонов в клинической практике.
66. Витамины, общая характеристика, классификация, функции. Патологические состояния, возникающие при нарушениях обмена витаминов. Особенности жирорастворимых витаминов.
67. Витамины группы А: строение, биологическая роль, распространение, суточная потребность. Гипо-, а- и гипервитаминоз.
68. Витамины группы К: строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность, проявления недостаточности. Водорастворимый препарат витамина К.

69. Витамин Е: строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность. Проявление недостаточности.
70. Витамины группы Д. Строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность. Гипо-, а- и гипервитаминозы.
71. Витамины С и Р, строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность. Гипо- и авитаминозы.
72. Витамин В₁: строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность. Авитаминоз.
73. Витамины В₂ и РР: строение (коферментные формы), биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность.
74. Биотин. Пантотеновая кислота. Строение, биологическая роль (примеры реакций карбоксилирования), распространение в природе.
75. Фолиевая кислота. Строение, коферментные формы, биологическая роль, распространение в природе. Суточная потребность. Сульфаниламидные препараты как антиметаболиты.
76. Витамин В₁₂. Строение, биологическая роль, распространение в природе, суточная потребность. Пернициозная анемия.
78. Печень, функции. Особенности метаболизма печени. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков, аминокислот, витаминов.
79. Характеристика водно-солевого обмена: Распределение воды в организме, водный баланс. Натрий и калий, функциональная роль, нарушения обмена. Роль почек в регуляции водно-солевого обмена.
80. Молекулярные механизмы повреждения клеток. Апоптоз, некроз. Основные причины нарушения метаболизма факторами внешней среды.
81. Молекулярные механизмы защиты организма от действия неблагоприятных экологических факторов.