

a LANGE medical book

1988

HARPER'S BIOCHEMISTRY

Twenty-first Edition

Robert K. Murray, MD, PhD

Professor of Biochemistry
University of Toronto

Daryl K. Granner, MD

Professor and Chairman
Department of Molecular Physiology and Biophysics
Professor of Medicine
Vanderbilt University Nashville,
Tennessee

Peter A. Mayes, PhD, DSc

Reader in Biochemistry
Royal Veterinary College
University of London

Victor W. Rodwell, PhD

Professor of Biochemistry
Purdue University West Lafayette,
Indiana

APPLETON & LANGE

Norwalk, Connecticut/San Mateo, California

**Марри Р.
Греннер Д.
Мейес П.
Родуэлл В.**

БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

**В 2-х томах
Том 2**

Перевод с английского
канд. биол. наук М. Д. Гроздовой,
канд. биол. наук Р. Б. Капнер,
канд. хим. наук А. Л. Остермана,
канд. биол. наук А. С. Серпинской
и Л. Г. Тер-Саркисян

под редакцией
д-ра хим. наук Л. М. Гиномана
и д-ра мед. наук В. И. Кандрора



МОСКВА «МИР» 1993

ББК 20.070
Б63
УДК 577.2

Б63 Авторы: Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.
Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ.:—
М.: Мир, 1993.—415 с., ил.
ISBN 5-03-001775-5

Настоящий учебник биологической и медицинской химии и молекулярной биологии широко известен в мире и переведен на многие языки. Авторы 21-го, переработанного издания — ученые из США, Великобритании и Канады. Благодаря энциклопедической полноте и четкости изложения книга может служить справочным пособием. На русском языке учебник выходит в 2-х томах. Во втором томе рассматриваются следующие темы: нуклеиновые кислоты и регуляция экспрессии генов, биохимия внутри- и межклеточных коммуникаций, специальные вопросы (питание, свертывание крови, рак, онкогены и факторы роста и др.).

Для биохимиков, клинических биохимиков, студентов и аспирантов биологов и медиков.

Б $\frac{1910000000-218}{041(01)-93}$ 87—91

ББК 20.070

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001775-5 (русск.)
ISBN 5-03-001773-9
ISBN 0-8385-3648-4 (англ.)

© 1988 by Appleton & Lange, a Publishing Division
of Prentice Hall
© перевод на русский язык, коллектив перевод-
чиков, 1993

Раздел IV

Структура, функция и репликация информационных макромолекул

Глава 34

Нуклеотиды

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеотиды принимают участие во множестве биохимических процессов. Пожалуй, наиболее известна роль пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в качестве мономеров-предшественников при биосинтезе РНК и ДНК. Помимо этого пуриновые рибонуклеотиды выполняют функции универсальных источников энергии (например, АТФ), регуляторных сигналов (сАМФ, сГМФ), входят в состав коферментов (FAD, NAD, NADP) и служат переносчиками метильных групп (S-аденозилметионин); пиримидиновые нуклеотиды функционируют в качестве макроэргических интермедиатов в углеводном обмене (UDP-глюкоза, UDP-галактоза) и в синтезе липидов (CDP-ацилглицерол).

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гетероциклические основания (пурины и пиримидины) являются исходными структурными элементами молекул нуклеозидов и нуклеотидов. Нуклеотиды присутствуют во всех без исключения живых клетках, выполняя целый ряд ключевых функций. В их числе построение нуклеиновых кислот из рибозо- и дезоксирибозонуклеозидмонофосфатных звеньев (РНК и ДНК соответственно); перенос энергии (АТФ); образование коферментов (АМФ), участие в роли акцепторов в окислительном фосфорилировании (АДФ), а также в качестве аллостерических регуляторов активности ряда ферментов и «вторичных посредников» (сАМФ и сГМФ). Синтетические аналоги природных нуклеотидов, способные замещать их в структуре нуклеиновых кислот и оказывать ингибирующее действие на синтез РНК и ДНК, находят применение в химиотерапии рака. Для подавления роста опухолевых клеток или определенных вирусов используют 5-фторурацил, 5'-ио-

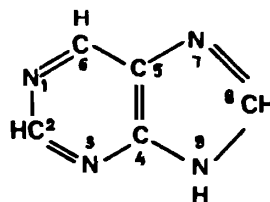
до-2-дезоксисуридин, 6-тиогуанин, 6-меркаптопурин, 6-азауридин и арабинозилцитозин. Аллопуринол — аналог пурина — весьма эффективен при лечении подагры.

СТРУКТУРА ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

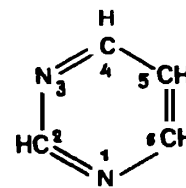
Пуриновые и пиримидиновые основания, входящие в состав нуклеотидов, представляют собой замещенные производные пурина и пиримидина (рис. 34.1). Положения атомов в ароматическом кольце пронумерованы в соответствии с принятой номенклатурой. Обратите внимание на то, что нумерация в пуриновом и пиримидиновом кольцах ведется в противоположных направлениях, при этом атом углерода под номером 5 в обеих молекулах находится в одном и том же положении. Сопряжение электронных облаков обуславливает плоскую структуру пуриновых и пиримидиновых оснований. Значение этого явления обсуждается в гл. 37.

Главные основания

Главные пиримидиновые основания и у прокариот, и у эукариот — это цитозин, тимин и урацил



Пурин



Пиримидин

Рис. 34.1. Структура пурина и пиримидина. Атомы пронумерованы согласно международной системе.

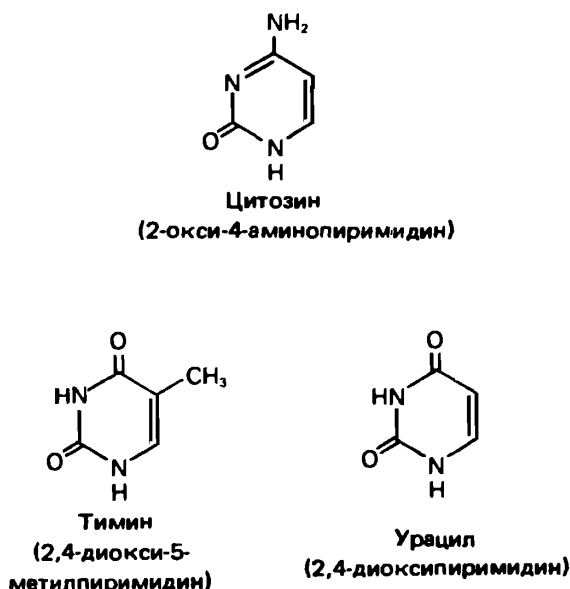


Рис. 34.2. Три главных пиримидиновых основания, входящие в состав нуклеотидов.

(рис. 34.2). Из пуриновых оснований чаще всего встречаются аденин и гуанин. Два других — ксантин и гипоксантин — являются интермедиатами в процессах их метаболизма (рис. 34.3). У человека в роли конечного продукта катаболизма пуринов выступает окисленное пуриновое основание — мочевая кислота (гл. 35).

Помимо пяти названных выше главных оснований известны и менее широко представленные минорные основания. Некоторые из них присутствуют только в нуклеиновых кислотах бактерий и вирусов, но многие также найдены в составе про- и эукариотических ДНК и транспортных РНК. Так, и бакте-



Рис. 34.3. Главные пуриновые основания, входящие в состав нуклеотидов.

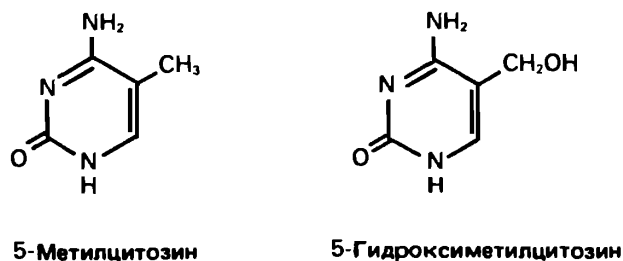


Рис. 34.4. Структура двух необычных природных пиримидиновых оснований.

риальная ДНК, и ДНК человека содержат значительные количества 5-метилцитозина; в бактериофагах обнаружен 5-гидроксиметилцитозин (рис. 34.4). Необычные основания выявлены в матричной РНК — N⁶-метиладенин, N⁶, N⁶-диметиладенин и N⁷-метилгуанин (рис. 34.5). У бактерий также обнаружен модифицированный урацил с присоединенной по N₃-положению (α-амино, α-карбокси)-пропильной группой. Функции этих замещенных пуринов и пиримидинов до конца не выяснены.

В клетках растений выявлена серия пуриновых оснований с метильными заместителями (рис. 34.6). Многие из них фармакологически активны. В качестве примера можно привести кофейные зерна, содержащие кофеин (1, 3, 7-триметилксантин), чайный лист, содержащий теofilлин (1, 3-диметилксантин), и какао-бобы, в состав которых входит теобромин (3, 7-диметилксантин). Биологические свойства этих веществ описаны в гл. 35 при обсуждении метаболизма циклических нуклеотидов.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Таутомерия

Благодаря феномену кето-енольной таутомерии нуклеотиды могут существовать либо в лактимной, либо в лактамной формах (рис. 34.7), причем в физиологических условиях лактамная форма превалирует у гуанина и тимина. Важность этого обстоятельства станет ясна при обсуждении процессов спаривания оснований и мутагенеза в гл. 38 и 40.

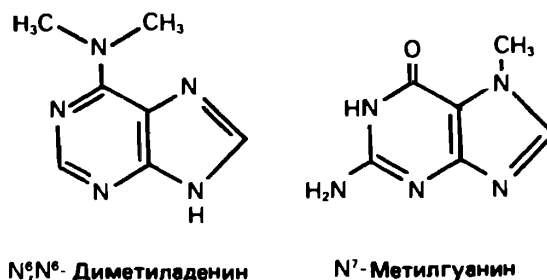


Рис. 34.5. Структуры двух необычных природных пуриновых оснований.

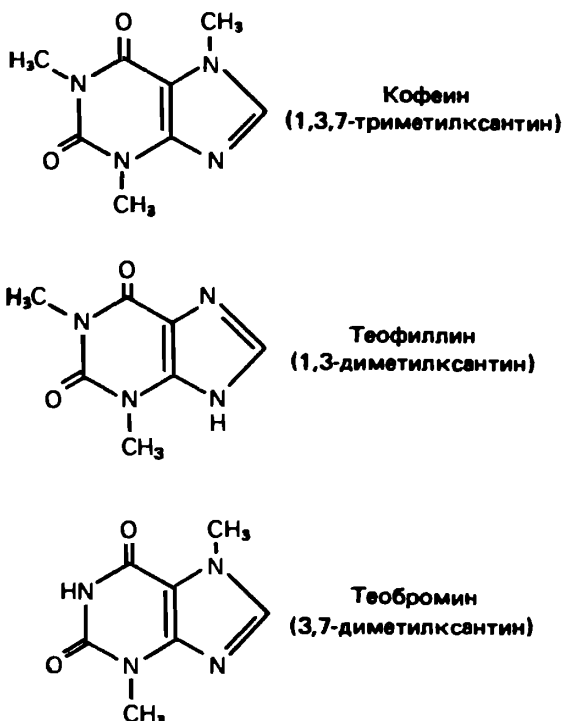


Рис. 34.6. Структура некоторых метилксантинов, часто встречающихся в пищевых продуктах.

Растворимость

При нейтральном pH наименьшей растворимостью обладает гуанин. Следующим в этом ряду стоит ксантин. Мочевая кислота в форме уратов сравнительно неплохо растворяется при нейтральном pH, но очень плохо растворима в жидкостях с более низкими значениями pH, таких, как моча. Гуанин в моче человека в норме отсутствует, а ксантин и мочевая кислота являются ее обычными компонентами. Последние два пурина часто входят в состав камней мочевого тракта.

НУКЛЕОЗИДЫ И НУКЛЕОТИДЫ

Свободные основания значительно менее распространены в природе, чем соответствующие нуклеозиды и нуклеотиды. Молекулы **нуклеозидов** (рис. 34.8) построены из пуринового или пиримидинового основания, к которому β-связью присоединен углевод (обычно D-рибоза или 2-дезоксирибоза) в N₉ или N₁-положении соответственно. Таким образом, адениновый рибонуклеозид (**аденозин**) состоит из аденина и D-рибозы, присоединенной в положении N₉; **гуанозин** — из гуанина и D-рибозы в положении N₉; **цитидин** — из цитозина и рибозы в положении N₁; **уридин** — из урацила и рибозы в положении N₁.

В состав 2'-дезоксирибонуклеозидов входят пуриновые или пиримидиновые основания и 2'-дезоксирибоза, присоединенная по тем же атомам N₁

и N₉. Присоединение рибозы или 2'-дезоксирибозы к кольцевой структуре основания происходит за счет относительно кислотолабильной N-гликозидной связи. Теоретически остаток сахара и пуриновое (или пиримидиновое) основание способны свободно вращаться вокруг оси гликозидной связи, однако в действительности существуют стерические препятствия этому. Конформация *анти* значительно более предпочтительна для природных нуклеозидов нежели *син* (рис. 34.9). Подробное объяснение этому феномену вы найдете в гл. 37. Здесь мы скажем лишь о том, что форма *анти* является необходимым условием для комплементации пуриновых и пиримидиновых оснований в двухцепочечной молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты В-формы. (Поскольку D-рибоза изображена в общепринятом виде на большинстве рисунков этой и других глав, пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды и нуклеотиды показаны в менее предпочтительной *син*-конформации.)

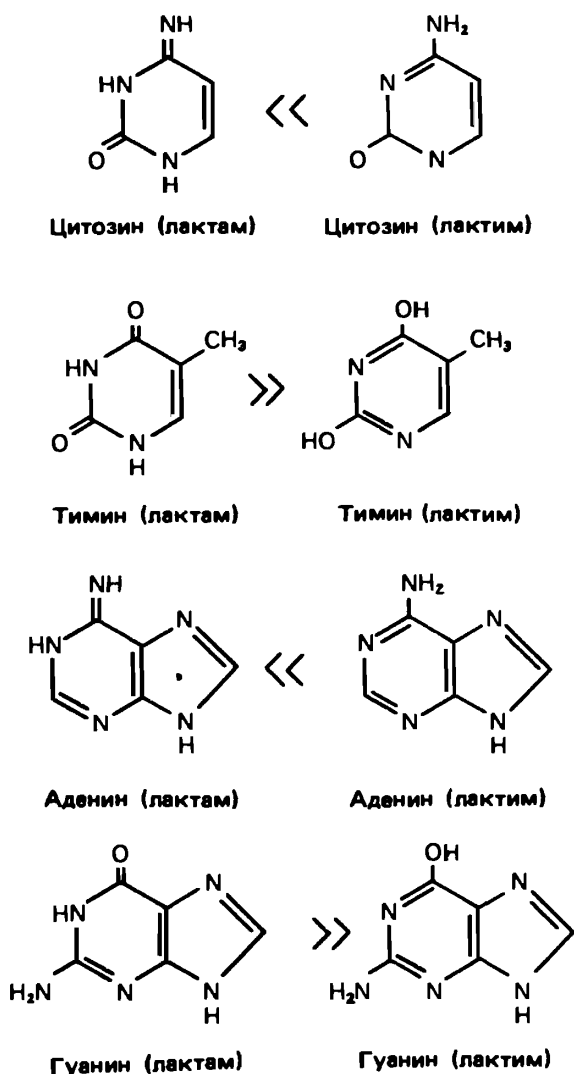


Рис. 34.7. Структура таутомеров цитозина, тимина, аденина и гуанина с указанием преобладающих форм.

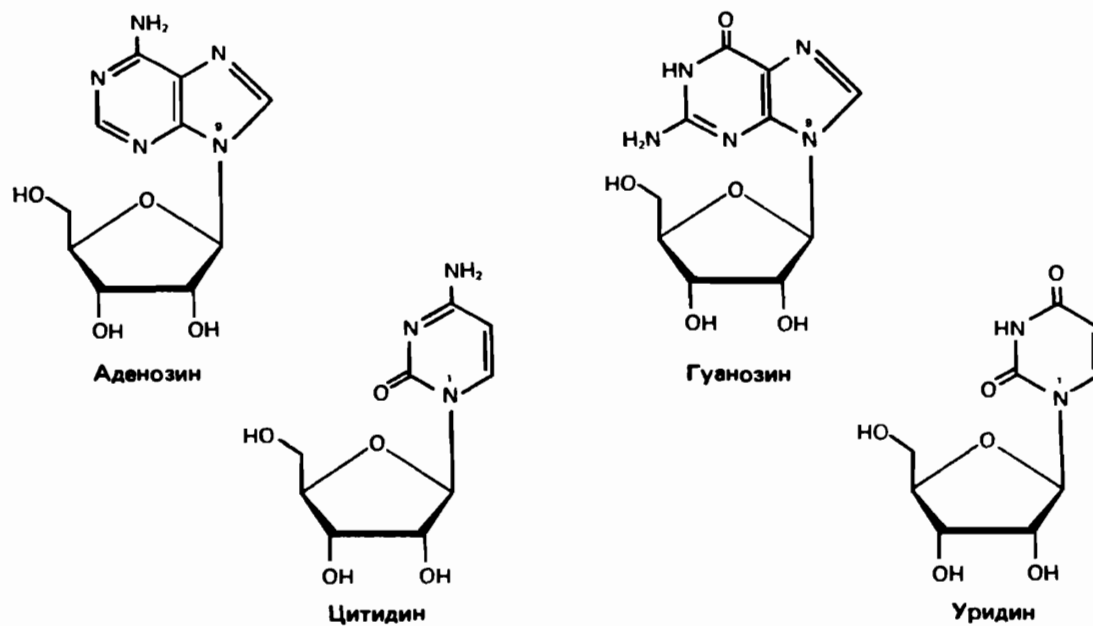


Рис. 34.8. Структура рибонуклеозидов.

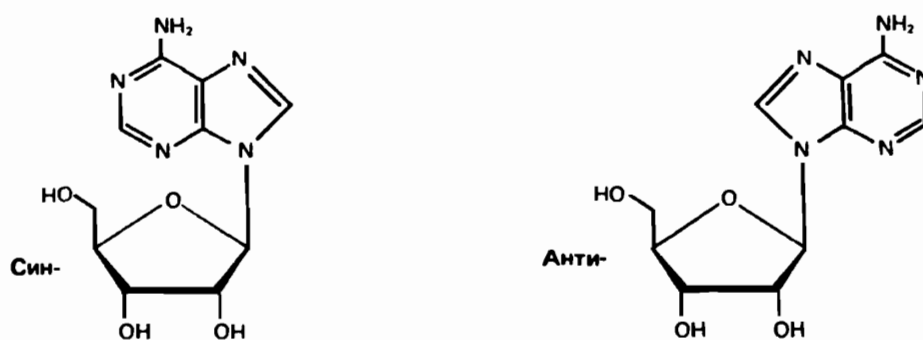


Рис. 34.9. Структура син- и анти-конфигураций аденозина.

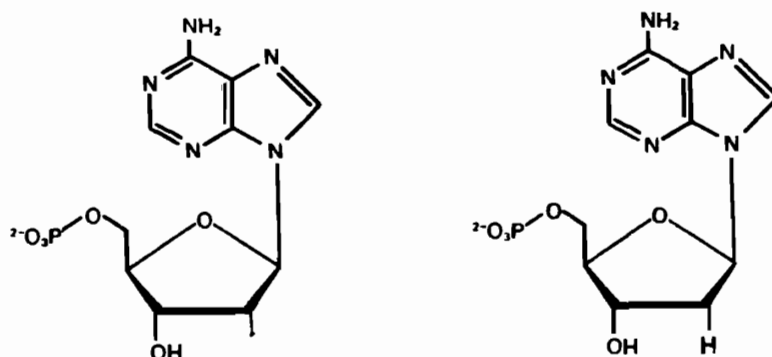


Рис. 34.10. Структура адениловой кислоты (AMP) (слева) и 2'-деоксиадениловой кислоты (dAMP) (справа).

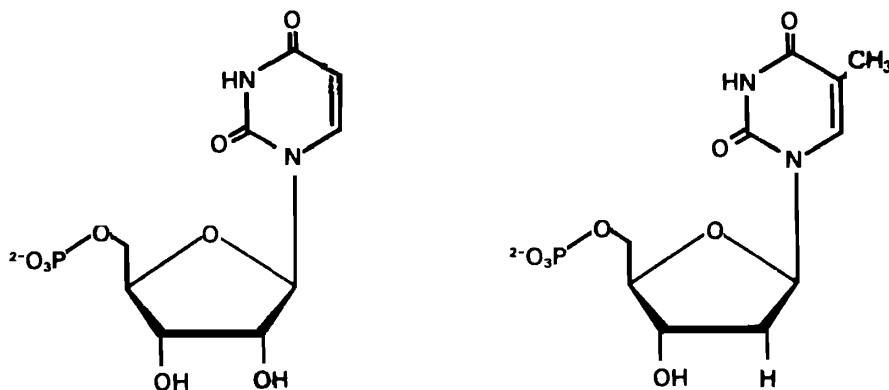


Рис. 34.11. Структура уридиловой кислоты (UMP) (слева) и тимидиловой кислоты (TMP) (справа).

Нуклеотиды — это производные нуклеозидов, фосфорилированные по одной или более гидроксильным группам остатка рибозы (или дезоксирибозы) (рис. 34.10). Так, аденозинмонофосфат (АМР или аденилат) построен из аденина, рибозы и фосфата. 2'-Дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP или дезоксиаденилат) представляет собой молекулу, состоящую из аденина, 2'-дезоксирибозы и фосфата. Обычно к урацилу присоединена рибоза, к тимину — 2'-дезоксирибоза. Поэтому тимидиловая кислота (TMP) состоит из тимина, 2'-дезоксирибозы и фосфата, а в состав уридиловой кислоты (UMP) входят урацил, рибоза и фосфат (рис. 34.11). ДНК представляет собой полимер тимидиловой, 2'-дезокситидиловой, 2'-дезоксиадениловой и 2'-дезоксигуаниловой кислот. РНК образуется в результате сополимеризации уридиловой, цитидиловой, адениловой и гуаниловой кислот.

Кроме вышеперечисленных форм нуклеотидов обнаружены и нуклеотиды необычной структуры. Так, в молекуле тРНК выявлен нуклеотид, в котором рибоза присоединяется к урацилу в пятом положении, т.е. не азот-углеродной связью, а углерод-углеродной. Продукт этого необычного присоединения назван псевдоуридином (ψ). Молекулы тРНК содержат и другую необычную нуклеотидную структуру — тимин, соединенный с рибозомонофосфатом. Этот нуклеотид образуется уже после синтеза молекулы тРНК путем метилирования остатка UMP S-аденозилметионином (см. ниже). Псевдоуридиловая кислота (ψ MP) тоже образуется в результате перегруппировки UMP после синтеза тРНК.

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

Положение фосфатной группы в молекуле нуклеотида указывается цифрой. Например, аденозин с фосфатной группой, присоединенной к 3-му углероду рибозы, должен быть обозначен как 3'-монофосфат. Штрих после цифры ставят для того,

чтобы отличить номер углерода в пуриновом или пиримидиновом основании от положения этого атома в остатке (дезокси)рибозы. При нумерации атомов углерода основания штрих не ставится. Нуклеотид 2'-дезоксиаденозин с фосфатным остатком при углероде-5 молекулы сахара обозначается как 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфат (рис. 34.12).

Нуклеозиды, содержащие аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, принято обозначать буквами А, G, C, T и U соответственно. Наличие буквы d перед сокращением обозначает, что углеводным компонентом нуклеозида является 2'-дезоксирибоза. Гуанозин, содержащий 2'-дезоксирибозу, может быть обозначен dG (дезоксигуанозин), а соответствующий ему монофосфат с фосфатной группой, присоединенной к третьему атому углерода дезоксирибозы, — dG-3'-MP. Как правило, в тех случаях, когда фосфат присоединен к углероду-5 рибозы или дезоксирибозы, символ 5' опускается. Так, гуанозин 5'-монофосфат принято обозначать GMP, а 5'-монофосфат 2'-дезоксигуанозина сокращают как dGMP. Если к углеводному остатку нуклеозида присоединены 2 или 3 остатка фосфорной кислоты,

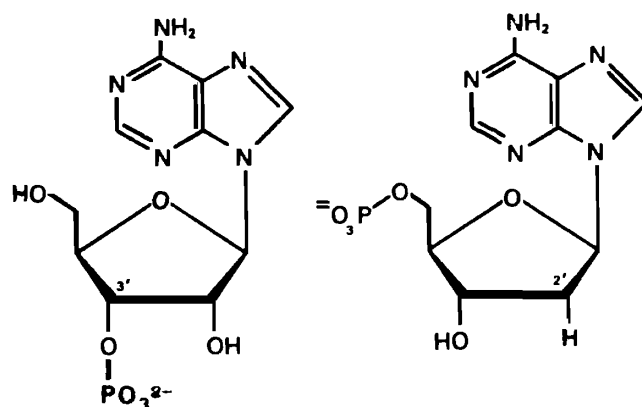


Рис. 34.12. Структура аденозин-3'-монофосфата (слева) и 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфата (справа).

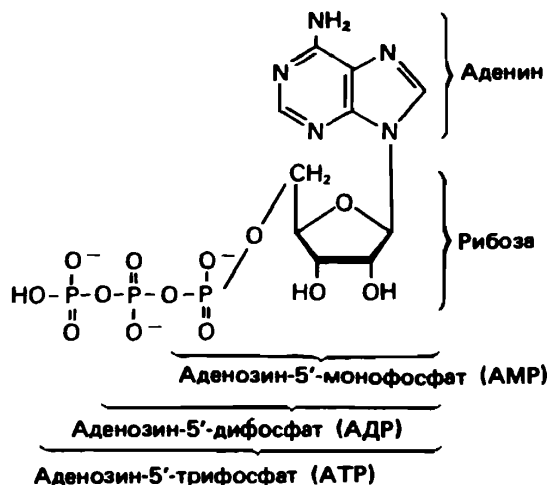


Рис. 34.13. Структура АТР и соответствующих ди- и монофосфатной форм.

используются аббревиатуры ДР (дифосфат) и ТР (трифосфат). Таким образом, аденозин + трифосфат с тремя фосфатными группами в 5'-положении углевода будет обозначаться АТР. Структура АТР, а также соответствующих ди- и монофосфатов изображена на рис. 34.13. Поскольку в молекулах нуклеотидов фосфаты находятся в виде ангидридов фосфорной кислоты, т. е. в состоянии с низкой энтропией, их называют макроэргами (обладающими большим запасом потенциальной энергии). При гидролизе 1 моля АТР до АДР высвобождается около 7 кКал потенциальной энергии.

ПРИРОДНЫЕ НУКЛЕОТИДЫ

Свободные нуклеотиды также выполняют важные функции в различных тканях организма (см. ниже).

Производные аденозина

АДР и АТР являются субстратом и продуктом окислительного фосфорилирования (гл. 3). АТР выполняет функцию основного внутриклеточного переносчика свободной энергии (гл. 11). Концентрация наиболее распространенного свободного нуклеотида в клетках млекопитающих — АТР — составляет около 1 ммоль/л.

Циклический АМР (3', 5'-аденозинмонофосфат, сАМР) — медиатор различных внеклеточных сигналов в клетках животных — образуется из АТР в результате реакции, катализируемой аденилатциклазой (рис. 34.14). Активность аденилатциклазы регулируется комплексом взаимодействий, многие из которых инициируются через рецепторы гормонов (гл. 43). Внутриклеточная концентрация сАМР (около 1 мкмоль/л) на 3 порядка ниже концентрации

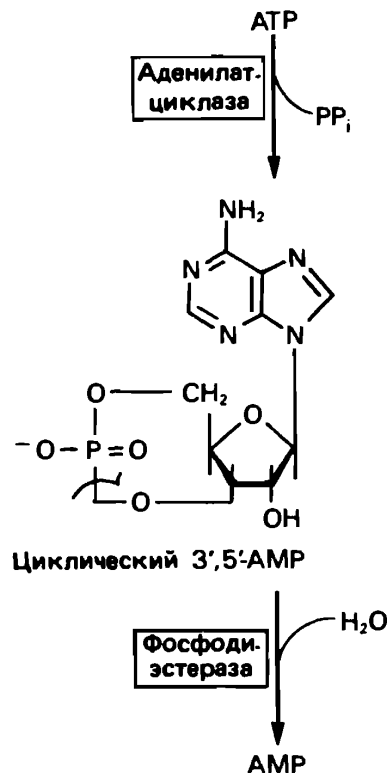


Рис. 34.14. Образование сАМР из АТР и гидролиз сАМР фосфодиэстеразой.

АТР. Гидролиз сАМР до 5'-АМР катализирует сАМР-фосфодиэстераза (рис. 34.14).

Включение остатка сульфата при образовании таких соединений, как сульфатированные протеогликаны (гл. 42), требует его предварительной активации (рис. 34.15). Сульфат активируется в реакции с АТР, образуя аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат. Активированный сульфат необходим также как субстрат реакции образования сульфатных конъюгатов.

S-Аденозилметионин (рис. 34.16) представляет собой «активную» форму метионина. S-аденозилметионин выполняет функцию донора метиль-

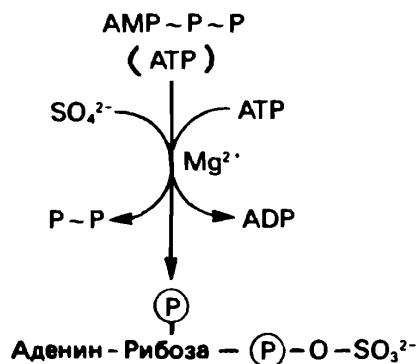


Рис. 34.15. Образование аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфата.

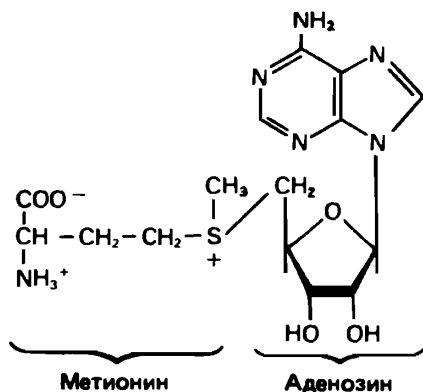


Рис. 34.16. S-Аденозилметионин.

ной группы во многих реакциях метилирования и, кроме того, является источником пропиламина для синтеза полиаминов.

Производные гуанозина

Нуклеотиды этого типа, в частности гуанозиндифосфат и гуанозинтрифосфат, участвуют в нескольких, требующих энергии, биохимических процессах, где они выступают функциональными аналогами ADP и ATP. Например, окисление α -кетоглутаровой кислоты до сукцинил-CoA в цикле трикарбоновых кислот сопровождается фосфорилированием GDP до GTP. GTP необходим для активации аденилатциклазы некоторыми гормонами; он выполняет функции как аллостерического регулятора, так и источника энергии в процессе синтеза белка на полирибосомах. Таким образом, GTP играет важную роль в поддержании внутриклеточного энергетического баланса.

Циклический GMP (3', 5'-гуанозинмонофосфат, cGMP) (рис. 34.17) служит внутриклеточным проводником внеклеточных сигналов. В некоторых случаях cGMP выступает в роли антагониста cAMP. cGMP образуется из GTP под действием **гуанилатциклазы** — фермента, имеющего много общего с аденилатциклазой. Гуанилатциклаза, как и аденилатциклаза, регулируется различными эффекторами,

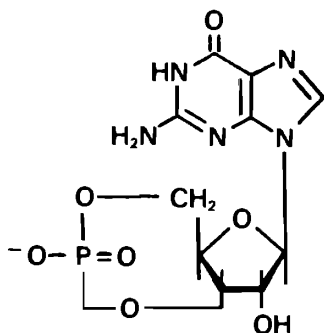


Рис. 34.17. Циклический 3'5'-гуанозинмонофосфат (cGMP).

в том числе и гормонами. Как и cAMP, cGMP гидролизруется фосфодиэстеразой до соответствующего 5'-монофосфата.

Производные гипоксантина

Гипоксантиновый рибонуклеотид, обычно называемый инозиновой кислотой (IMP или инозинат в солевой форме), — представляет собой предшественник всех пуриновых рибонуклеотидов, синтезируемых *de novo*. Инозинат может образовываться в реакции дезаминирования AMP. Эта реакция происходит главным образом в мышечной ткани и является частью цикла пуриновых нуклеотидов. Функционирование этой части цикла приводит в конечном итоге к образованию аммиака за счет аспартата (рис. 34.18). При удалении фосфатной группы из IMP образуется нуклеозидное производное инозина (гипоксантинрибозид) — промежуточное соединение цикла «реутилизации» пуринов (гл. 35).

Инозиндифосфат (IDP) и инозинтрифосфат (ITP) представляют собой аналоги ADP и ATP, у которых в качестве пуринового нуклеозида выступает инозин; они иногда принимают участие в реакциях фосфорилирования.

Производные урацила

Производные урациловых нуклеотидов участвуют в качестве коферментов в реакциях метаболизма гексоз и полимеризации углеводов, в частности при биосинтезе крахмала и олигосахаридных фрагментов гликопротеинов и протеогликанов (гл. 54). Субстратами в этих реакциях являются уридиндифосфатсахара. Например, уридиндифосфатглюкоза (UDPGlc) служит предшественником гликогена. Другой кофермент — уридиндифосфатглюкуроновая кислота (UDPGlcUA) — выполняет функцию «активного» глюкуронида в реакциях конъюгирования, например при образовании глюкуронида билирубина (гл. 33).

Урацил участвует в образовании макроэргических фосфатных соединений, аналогичных ATP,

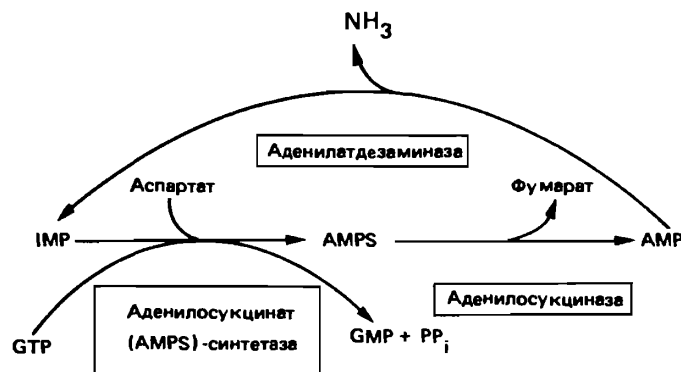


Рис. 34.18. Цикл пуриновых нуклеотидов.

GTP, ИТР. Уридинтрифосфат (UTP) используется, например, в реакции превращения галактозы в глюкозу; при этом образуются UDPGlc и UDPGal. Кроме того, UTP служит одним из мономерных предшественников РНК.

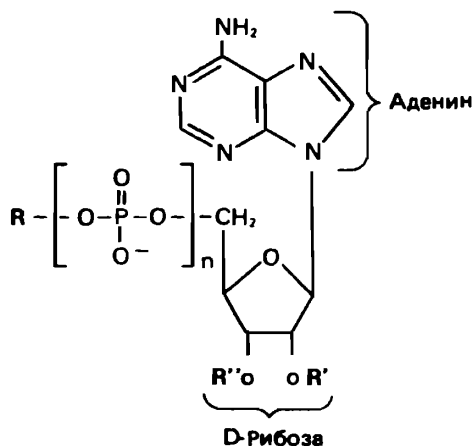
Производные цитозина

Цитидин (цитозинрибозид) может формировать высокоэнергетические фосфатные соединения — цитидиндифосфат (CDP) и цитидинтрифосфат (CTP). Последний выступает также в роли предшественника при включении СМР в состав нуклеиновых кислот. CTP необходим для биосинтеза некоторых фосфолипидов в тканях животных. Реакции с участием церамида и CDP-холина приводят к образованию сфингомиелина и других замещенных сфинголинов. Известны циклические производные цитидина, аналогичные вышеописанным циклическим производным аденозина и гуанозина.

Нуклеотиды в составе коферментов

Функциональными фрагментами многих коферментов являются нуклеотиды, структурно аналогичные пуриновым и пиримидиновым нуклеотидам (табл. 34.1).

Таблица 34.1. Многие коферменты и родственные им соединения являются производными аденозинмонофосфата



Кофермент	R	R'	R''	n
Активный метионин	Метионин ¹⁾	H	H	0
Аденилаты аминокислот	Аминокислота	H	H	1
Активный сульфат	SO ₃ ²⁻	H	PO ₃ ²⁻	1
3'-5'-сAMP	H	H	PO ₃ ²⁻	1
NAD	*	H	H	2
NADP	*	PO ₃ ²⁻	H	2
FAD	*	H	H	2
CoA:SH	*	H	PO ₃ ²⁻	2

¹⁾ Замещает фосфатную группу

* R — производное витамина B

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

Синтетические аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов широко применяются в научных исследованиях и клинической медицине. Их использование основано на роли нуклеотидов как компонентов нуклеиновых кислот, определяющих такие жизненно важные функции клетки, как ее рост и деление. Для деления необходим этап репликации ДНК. Это означает, что предшественники нуклеиновых кислот — нормальные пуриновые и пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды — должны быть легко доступны.

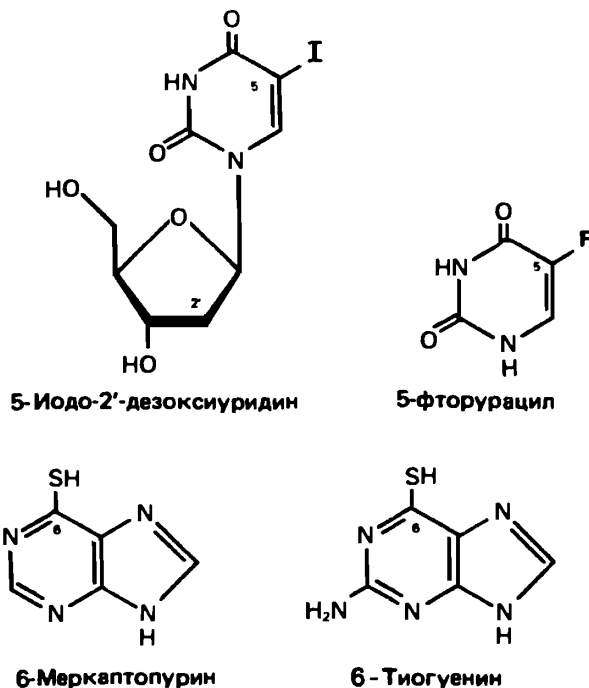


Рис. 34.19. Структура двух синтетических аналогов пиримидина (вверху) и двух синтетических аналогов пурина (внизу).

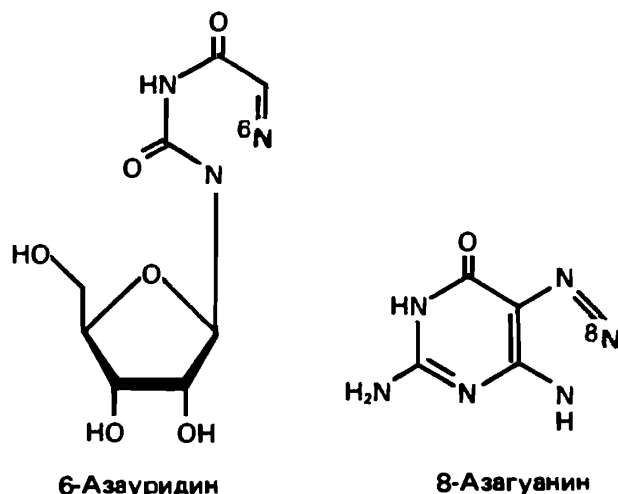


Рис. 34.20. Структура 6-азауридина (слева) и 8-азагуанина (справа).

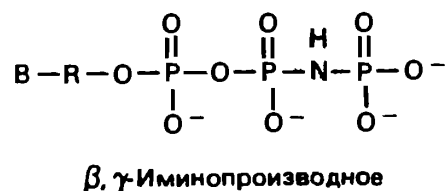
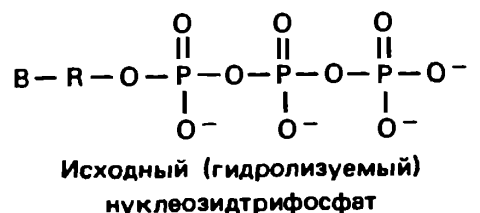
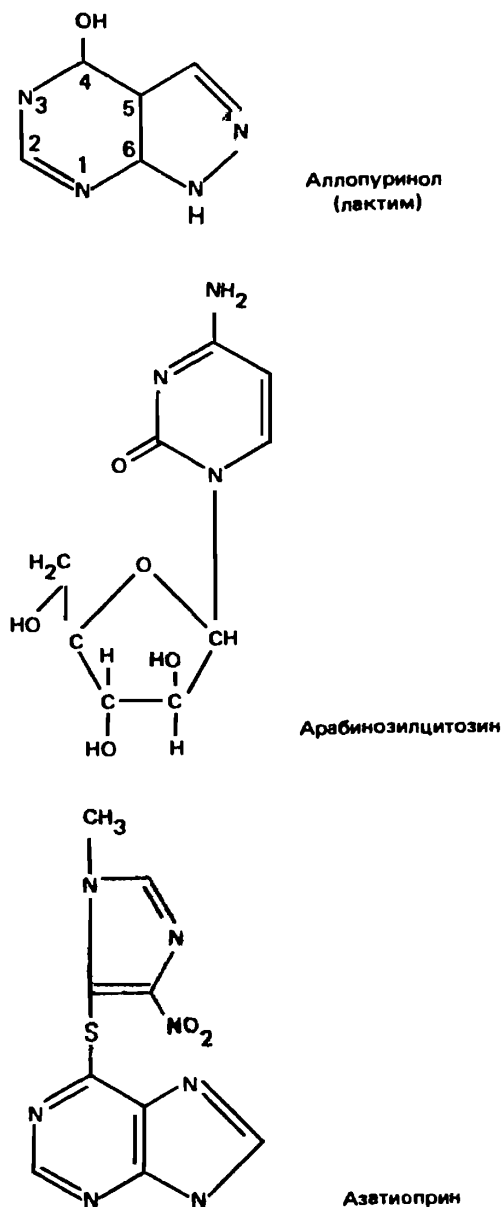


Рис. 34.22. Синтетические производные нуклеозидтрифосфата, не способные к гидролитическому освобождению концевой фосфатной группы. Обозначения: В — пуриновое или пиримидиновое основание; R — рибоза или дезоксирибоза. В верхней части рисунка изображен исходный (гидролизуемый) нуклеозидтрифосфат; в центре — β , γ -метиленовое производное, внизу — β , γ -иминопроизводное (обе формы негидролизуемые).

цила или дезоксиуридина. Первый является аналогом тимина, второй — тимидина (рис. 34.19). Широко используются в клинике также 6-тиогуанин и 6-меркаптопурин. В обеих молекулах гидроксильные группы в положении 6 замещены на тиольные. Клинические испытания успешно прошли также производные пуринов и пиримидинов, у которых гетероцикл содержит дополнительный атом азота, например 5- или 6-азауридин или азацитидин и 8-азагуанин (рис. 34.20).

Пуриновый аналог 4-гидроксипиразолпиримидин (аллопуринол) широко используется как ингибитор ксантиноксидазы и биосинтеза пуринов *de novo*. Он применяется для лечения гиперурикемии и подагры. Нуклеозиды, содержащие в качестве углеводного компонента арабинозу вместо рибозы, например цитарабин (арабинозилцитозин Ага-С), хорошо зарекомендовали себя при лечении рака и вирусных инфекций (рис. 34.21).

Азатиоприн, катаболизируемый *in vivo* в 6-меркаптопурин, успешно применяется при трансплантации органов в качестве агента, подавляющего реакцию иммунологического отторжения. В течение нескольких лет изучалась антивирусная активность целой серии аналогов нуклеозидов. Один из них — 5-иод-дезоксиуридин — оказался эффективным при местном лечении герпесного кератита.

Рис. 34.21. Структура 4-гидроксипиразолпиримидина (аллопуринол), арабинозилцитозина (цитарабин) и азатиоприна.

Одна из наиболее важных групп лекарственных препаратов в онкологии — синтетические аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеозидов. Больным вводят препараты аналогов, имеющих такие изменения в структуре гетероцикла или углеводного остатка молекулы, которые после встраивания соединения в соответствующие клеточные компоненты обуславливают выраженные цитотоксические эффекты. Эти эффекты либо являются результатом ингибирования определенных ферментов, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, либо связаны с искажением структуры ДНК при встраивании аналога. На последнем принципе основано действие 5-фтор- или 5-иод-производных ура-

К настоящему времени синтезировано значительное число негидролизуемых аналогов ди- и трифосфатов пуриновых и пиримидиновых рибонуклеозидов. Такие аналоги позволяют исследователю ответить на вопрос: связан ли наблюдаемый биохимический эффект ди- и трифосфатов нуклеозидов с их гидролизом или же он является результатом взаимодействия со специфическими нуклеотид-связывающими центрами ферментов или регуляторных белков. На рис. 34. 22 представлены два негид-

ролизуемых аналога гуанозинтрифосфата этого типа.

ЛИТЕРАТУРА

- Henderson J. F., Paterson A. R. P.* Nucleotide Metabolism: An Introduction, Academic Press, 1973.
Michelson A. M. The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press, 1963.
Prusoff W. H., Ward D. C. Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochem. Pharmacol.*, 1976, **25**, 1233.

Метаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Эта глава посвящена обсуждению метаболизма пуринов, пиримидинов, а также соответствующих нуклеозидов и нуклеотидов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ни сами нуклеотиды, ни исходные пуриновые и пиримидиновые основания, поступающие в организм человека с пищей, не включаются ни в нуклеиновые кислоты тканей человека, ни в пуриновые или пиримидиновые коферменты, такие, как АТР или NAD. Даже если пища богата нуклеопротеинами, клетки человека все равно синтезируют предшественники нуклеиновых кислот из амфиболических промежуточных соединений (интермедиатов). Путь синтеза *de novo* позволяет синтетическим аналогам пуринов и пиримидинов с антиканцерогенными свойствами включаться в состав ДНК.

Скорость синтеза пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов является объектом тонкой регуляции. Сформировались механизмы, обеспечивающие такой уровень продукции этих соединений во времени, который удовлетворяет постоянно меняющиеся физиологические потребности организма. Наряду с синтезом *de novo* включаются так называемые пути «спасения», благодаря которым происходит реутилизация пуриновых и пиримидиновых оснований высвобождаемых из нуклеиновых кислот при деградации *in vivo*. К заболеваниям, которые связаны с нарушениями обмена пуринов и пиримидинов, относятся подагра, синдром Леша—Найхана, синдром Рейе, недостаточность аденозиндеаминазы, недостаточность пурипуринфосфорилазы.

УСВОЕНИЕ

Млекопитающие и большинство низших позвоночных являются «прототрофами» в отношении пуринов и пиримидинов. Другими словами, они способны синтезировать пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды *de novo*. Хотя млекопитающие и потре-

бляют с пищей значительные количества нуклеиновых кислот и нуклеотидов, их жизнедеятельность не зависит от всасывания этих веществ или соответствующих продуктов распада.

Нуклеиновые кислоты поступают в организм с пищей главным образом в составе нуклеопротеинов и высвобождаются в результате действия протеолитических ферментов кишечника. Панкреатический сок содержит рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, гидролизующие нуклеиновые кислоты до нуклеотидов. Полинуклеотидазы или фосфоэстеразы кишечника, дополняя действие панкреатических нуклеаз, также гидролизуют нуклеиновые кислоты до мононуклеотидов. Далее, под воздействием нуклеотидаз и фосфатаз происходит гидролиз нуклеотидов до нуклеозидов, которые либо всасываются, либо под воздействием фосфатаз слизистой кишечника деградируют до пуриновых и пиримидиновых оснований. Основания могут подвергаться окислению: гуанин, например, окисляется до ксантина и затем до мочевой кислоты; аденозин превращается в инозин, затем в гипоксантин и далее в мочевую кислоту (рис. 35.1). Мочевая кислота всасывается в кишечнике и затем выделяется с мочой. В организме человека большая часть пуринов, высвободившихся из нуклеиновых кислот, которые поступают с пищей, превращается в мочевую кислоту (при этом не происходит их включения во вновь образующиеся молекулы нуклеиновых кислот). Свободные пиримидины, скормливаемые крысам, также в основном катаболизируются и выделяются без включения в нуклеиновые кислоты тканей организма. Таким образом, нуклеиновые кислоты пищи практически не выступают в роли поставщика непосредственных предшественников нуклеиновых кислот тканей организма.

Другие результаты получены при парентеральном введении нуклеотидов и нуклеозидов. Инъекционный тимидин может включаться в ДНК без всяких изменений. Этот факт послужил основой важного метода введения метки в ДНК различных биологических объектов (как *in vivo*, так и *in vitro*). Для этих целей применяют [³H]-тимидин, т. е. тимидин, содержащий тритий — радиоактивный изотоп водорода.

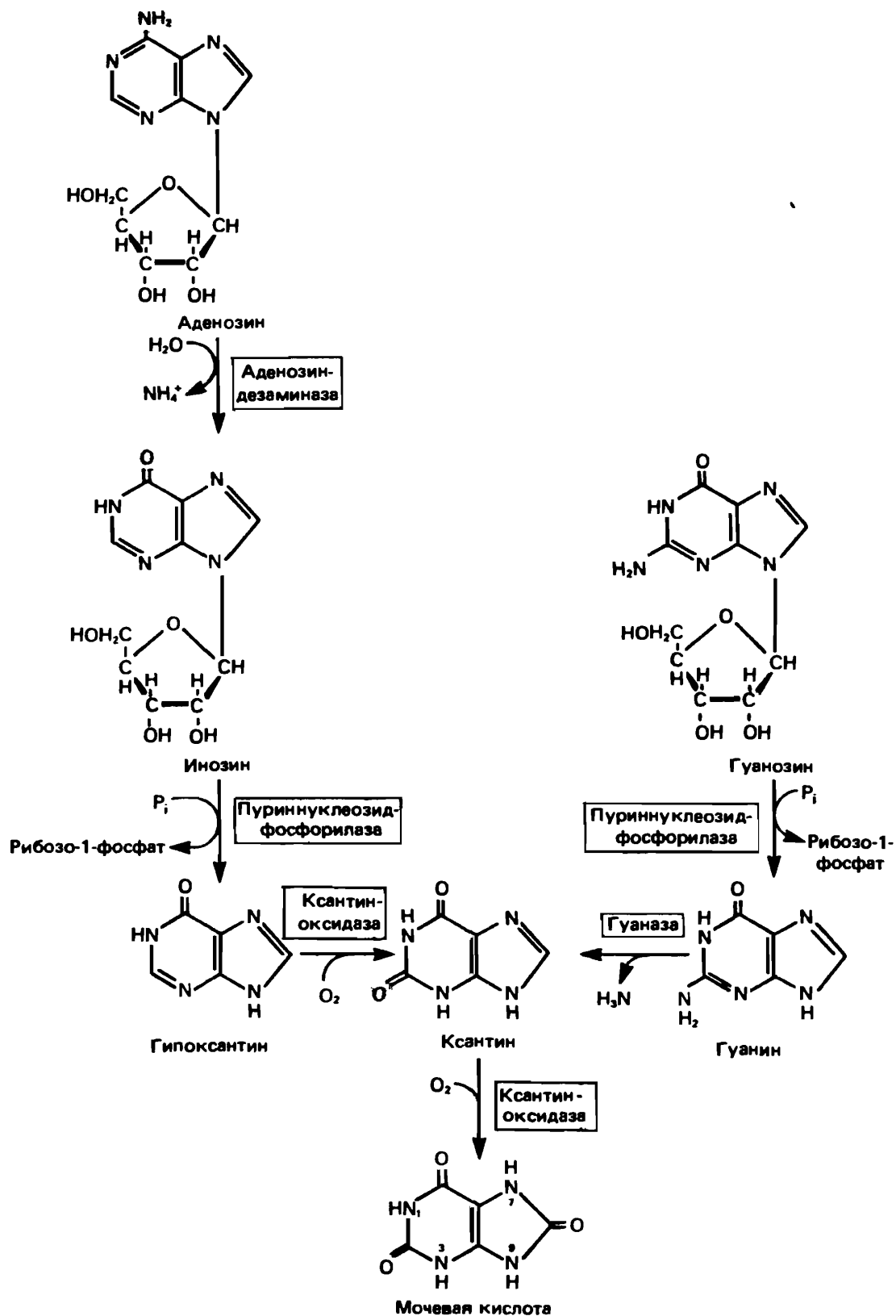


Рис. 35.1. Образование мочевой кислоты из пуриновых нуклеозидов. Промежуточные продукты этого пути — пуриновые основания (гипоксантин, ксантин и гуанин). Пуриновые дезоксирибонуклеозиды расщепляются с использованием тех же ферментов локализованных в слизистой желудочно-кишечного тракта млекопитающих.

ПУРИНЫ

Биосинтез пуриновых нуклеотидов

У человека и других млекопитающих пуриновые нуклеотиды синтезируются для обеспечения потребностей организма в мономерных предшественниках нуклеиновых кислот, а также в соединениях, выполняющих другие функции, описанные в гл. 34. У некоторых позвоночных (птицы, земноводные, рептилии) синтез пуриновых нуклеотидов несет дополнительную функцию—является частью механизма, с помощью которого выводятся излишки азота в виде мочевой кислоты; такие организмы называют **урикотелическими**. Организмы, у которых конечным продуктом азотистого обмена является мочевина (как у человека), называют **уреотелическими**. Поскольку урикотелические организмы удаляют «излишки» азота в виде мочевой кислоты, синтез пуриновых нуклеотидов у них идет более интенсивно, чем у уреотелических. В то же время пути синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* — общие для обеих групп организмов.

Информация о происхождении каждого из атомов в молекуле пуринового основания получена в процессе радиоизотопных исследований, проведенных на птицах, крысах и человеке (рис. 35.2). На рис. 35.3 представлена схема пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов. Первая стадия (*реакция 1*)— образование 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ). Эта реакция не уникальна для биосинтеза пуриновых нуклеотидов. ФРПФ служит также предшественником в синтезе пиримидиновых нуклеотидов (см. рис. 35.15), он необходим для синтеза NAD и NADP—двух коферментов, в состав которых входит никотиновая кислота.

В *реакции 2* (рис. 35.3), катализируемой **фосфори-**

бозил-пирофосфат-амидотрансферазой, из ФРПФ и глутамина образуются глутамат и 5-фосфорибозиламин. Хотя возможны и другие механизмы синтеза 5-фосфорибозиламина, реакция, катализируемая амидотрансферазой, имеет наиболее важное физиологическое значение в тканях млекопитающих.

Далее 5-фосфорибозиламин вступает в реакцию с глицином (*реакция 3*); при этом образуется глицинамид-рибозилфосфат (глицинамидориботид, ГАР). Амидная группа глутамина служит источником атома азота в положении 9 молекулы пурина (N-9), а глицин—источником атомов углерода в положениях 4 и 5 (C-4 и C-5) пуринового кольца. Эту реакцию катализирует **глицинамид-киносинтетаза**. В *реакции 4* атом азота N₇ молекулы глицинамид-рибозилфосфата формилируется N⁵, N¹⁰-метилентетрагидроfolатом. В результате этой реакции, катализируемой глицинамид-рибозилфосфат-формилтрансферазой, поступающий одноуглеродный фрагмент займет положение C-8 в формирующемся пуриновом основании. В *реакции 5* снова участвует глутамин—донор амидной группы. Амидирование происходит по атому C-4 формилглицинамид-рибозилфосфата и катализируется **формилглицинамидин-рибозилфосфатсинтетазой**. Присоединенный атом азота займет в молекуле пурина положение 3.

В результате замыкания имидазольного кольца, катализируемого **аминоимидазолрибозилфосфатсинтетазой**, образуется аминоимидазолрибозилфосфат (*реакция 6*). Далее синтез проходит через стадию образования аминоимидазолкарбоксилат-рибозилфосфата (*реакция 7*). В результате реакции формируется карбонильная группа, источником которой служит молекула CO₂, образующаяся в процессе дыхания.

Атом азота в положении 1 происходит из α-аминогруппы аспартата (*реакция 8*), остальная часть которого образует сукцинильный фрагмент в молекуле аминоимидазолсукцинилкарбоксиламид-рибозилфосфата (АИСКАР).

В *реакции 9* сукцинильная группа АИСКАР удаляется в виде fumarата. Оставшийся аминоимидазолкарбоксиламид-рибозилфосфат формилируется (*реакция 10*) N¹⁰-формилтетрагидроfolатом (N¹⁰-H₄folат) с образованием амидоимидазолкарбоксиламид-рибозилфосфата; реакция катализируется соответствующей формилтрансферазой. Вновь присоединенный атом углерода, подобно атому C-8, поступает из пула одноуглеродных фрагментов при участии тетрагидроfolата и занимает в молекуле пурина положение 2.

Замыкание кольца (*реакция 11*) происходит с помощью **ИМР-циклогидролазы**, в результате образуется первый пуриновый нуклеотид—инозиновая кислота (**инозинмонофосфат; ИМР**).

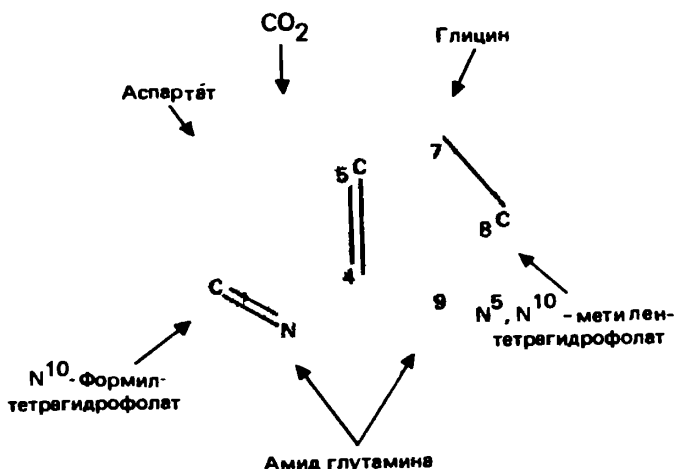


Рис. 35.2. Происхождение атомов азота и углерода пуринового кольца.

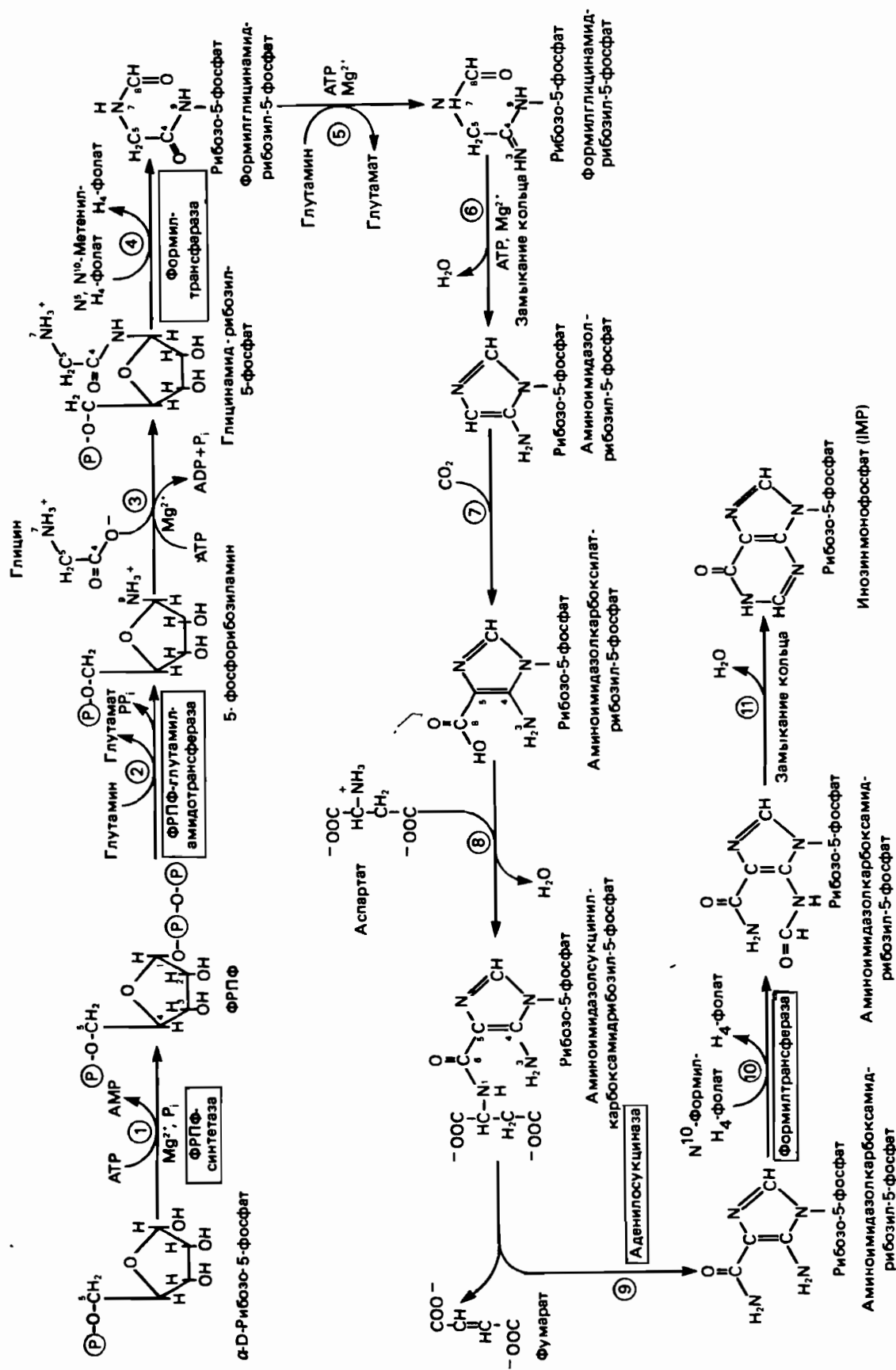


Рис. 35.3. Путь биосинтеза de novo пуринов из рибозо-5-фосфата и АТР (пояснения — в тексте). Р — PO_3^{2-} или PO_2^- .

Значение метаболизма фолатов

В процессе биосинтеза пуриновых нуклеотидов (рис. 35.3) атомы углерода в положениях 8 и 2 поступают соответственно от N^5 , N^{10} -метенилтетрагидрофолата и N^{10} -формилтетрагидрофолата. Последний образуется из N^5 , N^{10} -метенилтетрагидрофолата, который в свою очередь является продуктом NADP-зависимого дегидрогенирования N^5 , N^{10} -метилентетрагидрофолата. Если N^5 , N^{10} -метилентетрагидрофолат служит источником одноуглеродных фрагментов для многих акцепторов, то N^5 , N^{10} -метенилтетрагидрофолат поставляет одноуглеродную группу (либо непосредственно, либо через стадию образования N^{10} -формилтетрагидрофолата) только в пурины. Из приведенных сведений следует, что ингибирование процессов образования рассмотренных фолатов оказывает тормозящее влияние и на синтез пуринов *de novo*.

Образование AMP и GMP из IMP

Как показано на рис. 35.4 адениновые (реакции 12 и 13) и гуаниновые нуклеотиды (реакции 14 и 15) образуются путем аминирования и соответственно окисления и аминирования общего предшественни-

ка — **инозинмонофосфата (IMP)**. Аминирование IMP протекает через стадию образования промежуточного соединения, в котором аспарат присоединяется к инозиновой кислоте, образуя аденилосукцинат. Эта реакция напоминает реакцию 8 биосинтеза пуринов (рис. 35.3), в которой α -азот аспарагиновой кислоты поставляет атом N-1 пуринового кольца. Образование аденилосукцината катализируется аденилосукцинатсинтазой и происходит при участии GTP. Удаление остающейся части аспарагиновой кислоты в виде фумарата приводит к образованию адениловой кислоты (аденозинмонофосфат; AMP). Отщепление фумарата от аденилосукцината катализируется ферментом **аденилосукциназой**. Этот же фермент катализирует отщепление фумарата от аминокимидазолсукцинилкарбоксамидрибозилфосфата (реакция 9).

Так же, в две стадии, из IMP образуется гуанозинмонофосфат (GMP). В первой реакции на этом пути (реакция 14) при участии NAD и H_2O происходит окисление IMP с образованием ксантинмонофосфата (XMP). Затем XMP аминирован амидогруппой глутамина (реакция 15). Для этого процесса необходим ATP, что в какой-то мере напоминает потребность в GTP при превращении IMP в AMP.

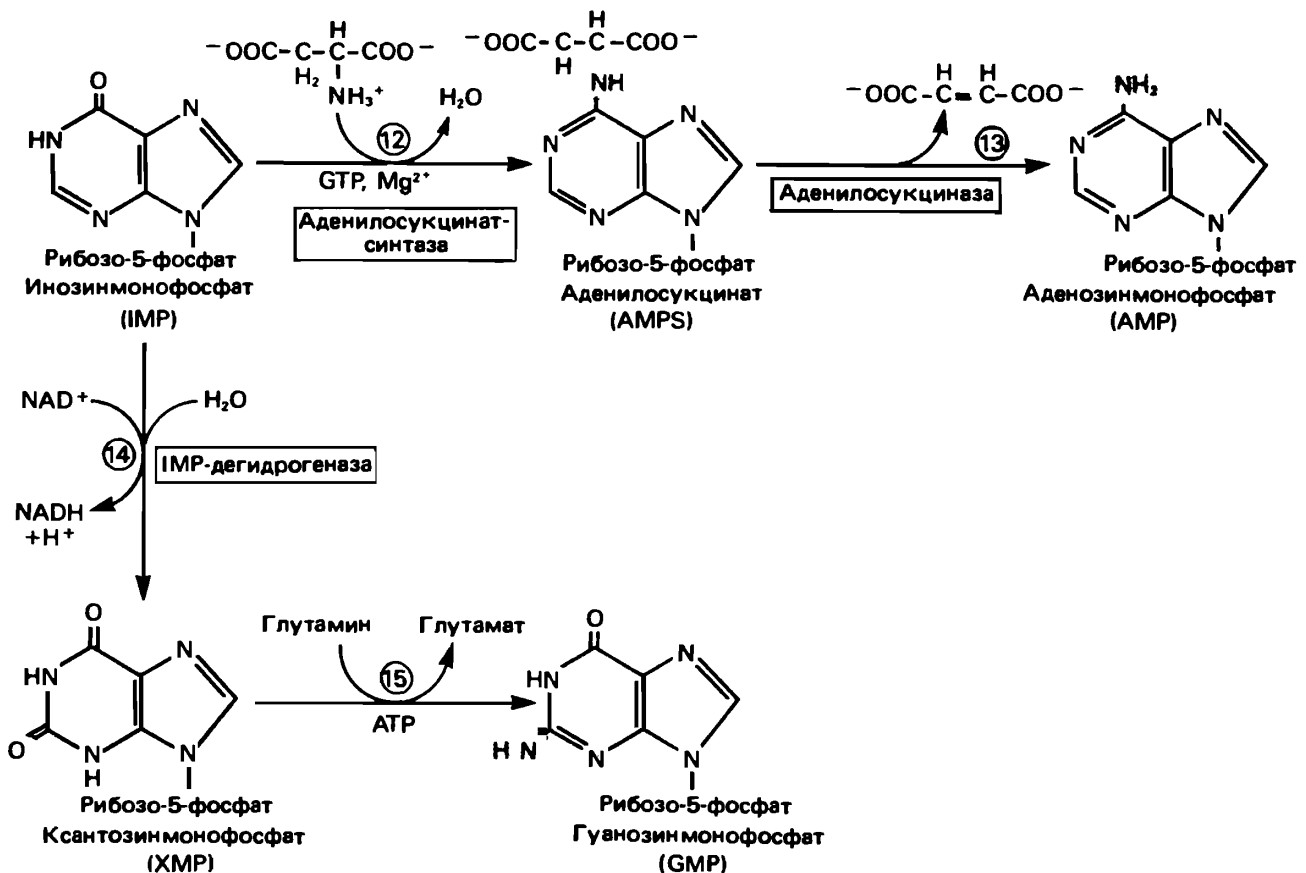


Рис. 35.4. Превращение IMP в AMP и GMP (пояснение в тексте).

Ингибиторы биосинтеза пуринов

Несколько антиметаболитов — аналогов глутамина оказывают сильное ингибирующее воздействие на биосинтез пуринов. **Азасерин** (О-диазоацетил-L-серин) выступает как антагонист глутамина, особенно в реакции 5. **Диазонорлейцин** ([6-диазо-5-оксо]-L-норлейцин) блокирует реакцию 2, а **6-меркаптопурин** наряду с другими эффектами ингибирует реакции 13 и 14 синтеза AMP и GMP соответственно. Микофеноловая кислота подавляет реакцию 14.

Образование ди- и трифосфатов пуриновых нуклеозидов

Превращение AMP и GMP в соответствующие ди- и трифосфаты осуществляется в две стадии (рис. 35.5). Реакции фосфорилирования — переноса фосфатных групп от АТР — осуществляются **нуклеозидмонофосфаткиназой** и **нуклеозиддифосфаткиназой**.

Синтез пуриновых дезоксирибонуклеотидов

Синтез пуриновых и пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов происходит путем прямого восстановления 2'-углерода рибозного остатка соответствующего рибонуклеотида, а не путем синтеза de novo из 2'-дезоксиналога ФРПФ. Восстановление 2-углеродного атома рибозы происходит только после превращения пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в соответствующие нуклеозиддифосфаты. У некоторых бактерий в этом восстановительном процессе участвует кобаламин (витамин B_{12}). У животных процесс восстановления идет и в отсутствие витамина B_{12} . Восстановление рибонуклеозиддифосфатов в дезоксирибонуклеозиддифосфаты катализируется **рибонуклеотидредуктазой** и требует участия **тиоредоксина** (белковый кофактор), **тиоредоксинредуктазы** (флавопротеиновый фермент) и **NADPH** (кофактор). Непосредственным донором электронов для нуклеотида является тиоредоксин, который предварительно восстанавливается NADPH. Обратимое окислительно-восстановительное превращение тиоредоксина катализируется **тиоредоксинредуктазой**. Восстановление рибонуклеозиддифосфата восстановленным тиоредоксином катализируется **рибонуклеотидредуктазой** (рис. 35.6). Эта сложная

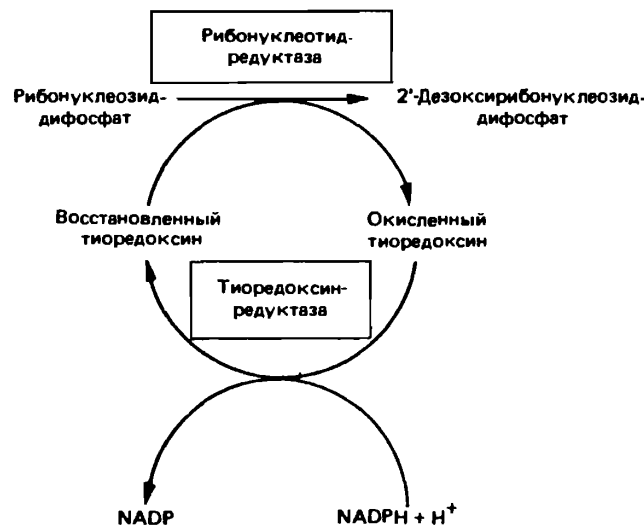


Рис. 35.6. Восстановление рибонуклеозиддифосфата до 2'-дезоксирибонуклеозиддифосфата.

ферментная система функционирует в клетках только в период активного синтеза ДНК и деления.

Тканевая специфичность биосинтеза пуринов

Не во всех тканях человека происходит синтез пуриновых нуклеотидов de novo. Эритроциты и полиморфноядерные лейкоциты не способны синтезировать 5-фосфорибозиламин, и поэтому для образования пуриновых нуклеотидов им необходимы экзогенные пурины. Периферические лимфоциты способны синтезировать небольшие количества пуринов de novo. Установлено, что в клетках мозга млекопитающих содержатся очень малые количества ФРПФ-амидотрансферазы, на этом основании был сделан вывод о зависимости синтеза пуриновых нуклеотидов в мозге от поступления экзогенных пуринов. Оказалось, что основным местом синтеза пуриновых нуклеотидов в организме млекопитающих является печень. Из нее свободные основания или нуклеозиды попадают в другие ткани, не способные к синтезу пуринов de novo.

Пути регенерации пуриновых нуклеотидов

Регенерацию пуриновых нуклеотидов обеспечивают два основных механизма. В количественном отношении наиболее важен механизм **фосфорилирования свободных пуриновых оснований** ферментами, использующими ФРПФ в качестве донора фосфорибозы. Второй общий механизм — это **фосфорилирование пуриновых нуклеозидов по 5'-гидроксильной группе**.

1. Фосфорилирование пуриновых оснований

В тканях человека фосфорилирование пури-

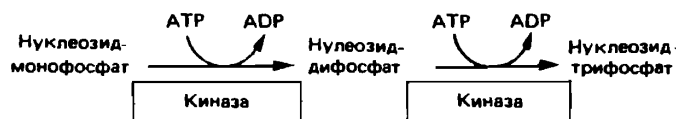


Рис. 35.5. Реакции фосфорилирования нуклеозидмонофосфата и нуклеозиддифосфата.

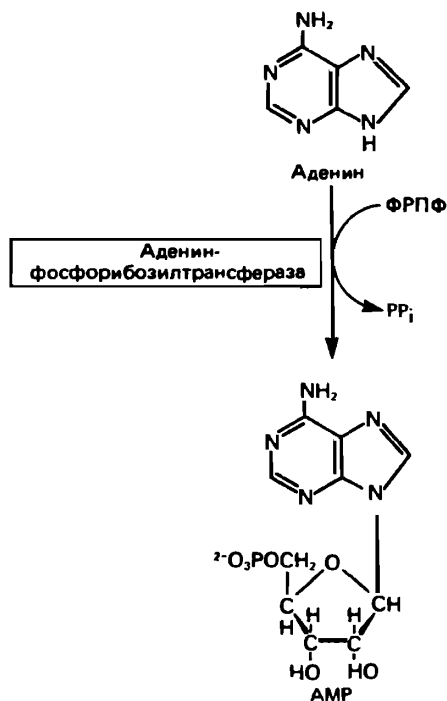


Рис. 35.7. Фосфорибозилирование аденина, катализируемое аденин-фосфорибозилтрансферазой.

новых оснований осуществляют два фермента. Первый — **аденин-фосфорибозилтрансфераза** — переносит фосфорибозу с ФРПФ на аденин. При этом образуется АМР (рис. 35.7). Второй — **гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза** — катализирует фосфорибозилирование ксантина и гуанина с образованием IMP и GMP соответственно (рис. 35.8). Процесс с участием второго фермента, как будет показано ниже, протекает более активно, чем синтез АМР из аденина.

2. Фосфорилирование пуриновых рибонуклеозидов

Превращение пуриновых рибонуклеозидов в пуриновые рибонуклеотиды у человека катализирует фермент **аденозинкиназа** (рис. 35.9). Аденозинкиназа, кроме того, фосфорилирует 2'-дезоксаденозин, она проявляет также некоторую активность по отношению к гуанозину, инозину и их 2'-дезоксипроизводным. Дезоксицитидинкиназа в дополнение к фосфорилированию 2'-дезоксцитидина катализирует фосфорилирование 2'-дезоксаденозина и 2'-дезоксигуанозина с образованием dAMP и dGMP.

Кроме того, в тканях человека функционирует цикл (рис. 35.10), в котором сначала IMP, GMP и их дезоксирибонуклеотидные аналоги при действии пу-

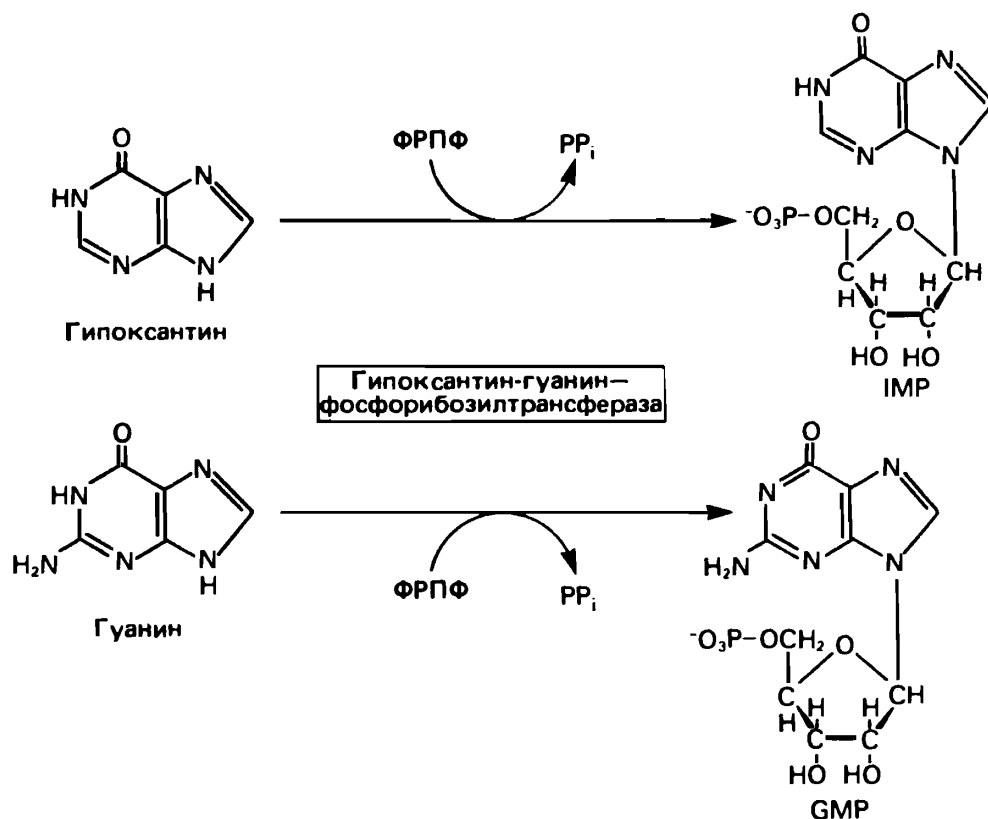


Рис. 35.8. Фосфорибозилирование гипоксантина и гуанина до IMP и GMP соответственно. Обе реакции катализируются гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазой.

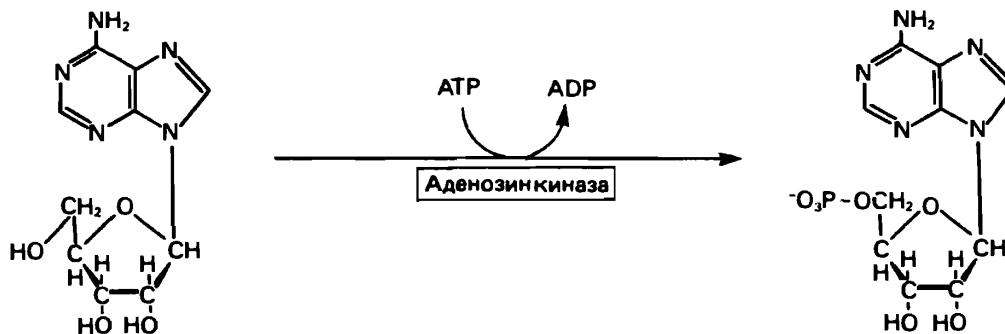


Рис. 35.9. Фосфорилирование аденозина до АМР аденозинкиназой.

рин-5'-нуклеотидазы превращаются в соответствующие нуклеозиды (инозин, дезоксинозин, гуанозин и дезоксигуанозин), а затем в результате реакции, катализируемой **пуриннуклеозидфосфорилазой**, образуются гипоксантин или гуанин и продукты фосфолиза — рибозо-1-фосфат или 2'-дезоксирибозо-1-фосфат. Далее при участии ФРПФ цикл завершается фосфорилированием образовавшихся оснований до IMP или GMP. Функция этого цикла неизвестна, однако не вызывает сомнений, что потребление ФРПФ в организме человека в данном цикле выше, чем при синтезе пуриновых нуклеотидов *de novo*.

Боковой путь этого цикла включает превращение IMP в АМР (реакция 12 и 13, рис. 35.4) и последующую реакцию образования аденозина из АМР. Эта реакция, по-видимому, катализируется той же пурин-5'-нуклеотидазой, которая гидролизует IMP до

инозина. Образовавшийся аденозин затем либо фосфорилируется **аденозинкиназой** до АМР, либо под действием **аденозиндезаминазы** превращается в инозин. В количественном отношении эта «инозиновая петля» менее значима, чем описанный выше цикл, однако реакция дезаминирования аденозина весьма важна для функционирования иммунной системы.

Регуляция биосинтеза пуринов

На синтез молекулы IMP затрачивается энергия гидролиза шести макроэргических фосфодиэфирных связей АТФ, при этом в качестве предшественников выступают глицин, глутамин, метилтетрагидрофолат и аспартат. Для экономии энергетических и питательных ресурсов важна эффективная регуляция процесса биосинтеза пуринов *de novo*. Важней-

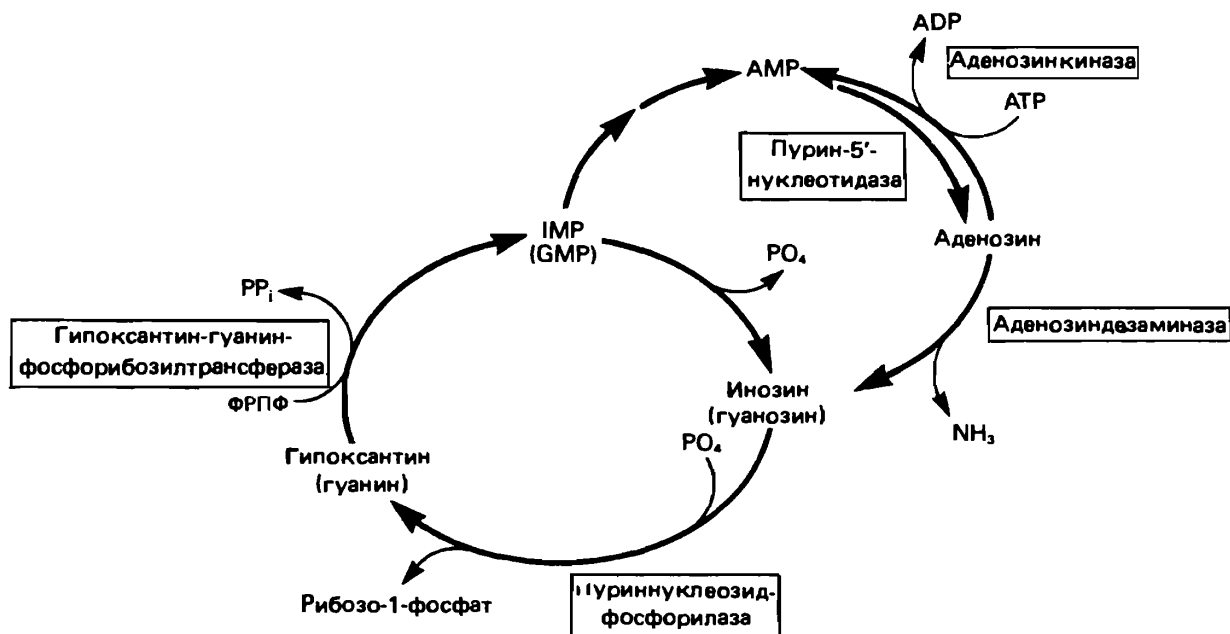


Рис. 35.10. Циклы реутилизации пуринов, включающие взаимные превращения АМР, IMP и, в меньшей степени, GMP; образование соответствующих рибонуклеозидов и их превращение в пуриновые рибонуклеотиды. Дезоксиаденозин, дезоксиинозин и дезоксигуанозин превращаются по тем же путям; дезоксиаденозин и дезоксигуанозин могут непосредственно фосфорилироваться до dAMP и dGMP соответственно.

шую роль в этом процессе играет внутриклеточная концентрация ФРПФ. Она определяется соотношением скоростей его синтеза, утилизации и деградации. Скорость синтеза ФРПФ зависит от 1) наличия субстратов синтеза, особенно рибозо-5-фосфата, и 2) каталитической активности ФРПФ-синтазы, которая в свою очередь связана с внутриклеточной концентрацией фосфатов, а также с концентрацией пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов, выступающих в роли аллостерических регуляторов (рис. 35.11). Скорость утилизации ФРПФ в значительной степени зависит от интенсивности цикла реутилизации пуриновых оснований, в ходе которого ксантин и гуанин фосфорилируются до соответствующих рибонуклеотидов. В меньшей степени скорость утилизации ФРПФ зависит от интенсивности синтеза пуринов *de novo*. Этот вывод основан на следующем наблюдении: в эритроцитах и культивируемых фибробластах мужчин с наследственным нарушением активности гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы уровень ФРПФ повышается в несколько раз.

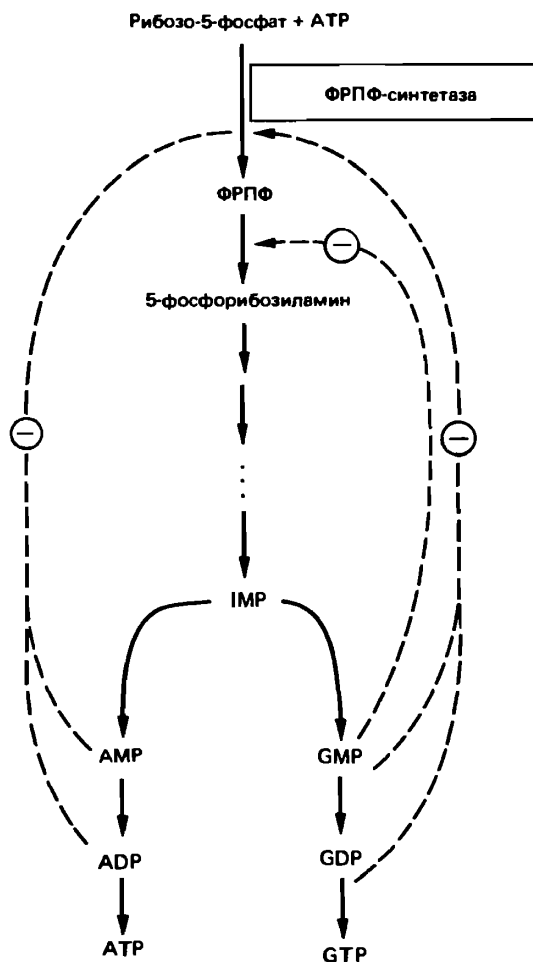


Рис. 35.11. Регуляция скорости синтеза пуринов *de novo*. Сплошные линии указывают путь химических превращений. Пунктирные линии обозначают ингибирование (⊖) конечными продуктами по принципу обратной связи.

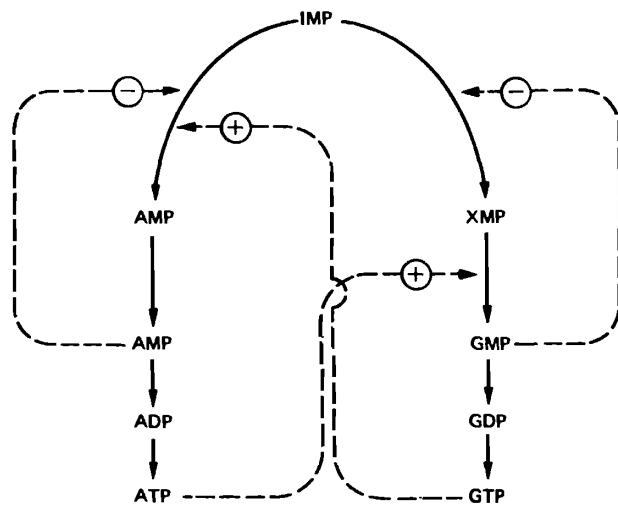


Рис. 35.12. Регуляция превращений IMP в аденозиновые и гуанозиновые нуклеотиды. Сплошные линии указывают путь химических превращений. Пунктирные линии обозначают положительную (⊕) и отрицательную (⊖) регуляцию по принципу обратной связи.

Показано, что ФРПФ-амидотрансфераза — первый из ферментов, участвующих в процессе синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, ингибируется *in vitro* пуриновыми нуклеотидами (особенно аденозинмонофосфатом и гуанозинмонофосфатом) по принципу обратной связи. Эти ингибиторы конкурируют с субстратом — ФРПФ, последний, как выяснилось, занимает центральное место в регуляции синтеза пуринов *de novo*. Многие косвенные данные свидетельствуют о том, что роль амидотрансферазы в этом процессе менее существенна, чем ФРПФ-синтазы.

Образование GMP или AMP из IMP регулируется двумя механизмами (рис. 35.12). AMP регулирует активность аденилосукцинатсинтетазы, влияя по принципу обратной связи на собственный синтез. GMP регулирует собственный синтез, действуя по тому же принципу на IMP-дегидрогеназу. Наряду с этим образование аденилосукцината из IMP на пути к AMP стимулируется GTP. Образование же GMP из ксантозинмонофосфата требует присутствия АТР. Таким образом, наблюдается существенная перекрестная регуляция дивергентных путей метаболизма IMP. Такая регуляция тормозит биосинтез одного из пуриновых нуклеотидов при недостатке другого. Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза, катализирующая образование из ксантина и гуанина IMP и GMP соответственно, весьма чувствительна к ингибирующему действию этих нуклеотидов.

Восстановление рибонуклеозиддифосфатов до дезоксирибонуклеозиддифосфатов является объектом сложной регуляции. Этот процесс (рис. 35.13) обеспечивает сбалансированное образование дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК.

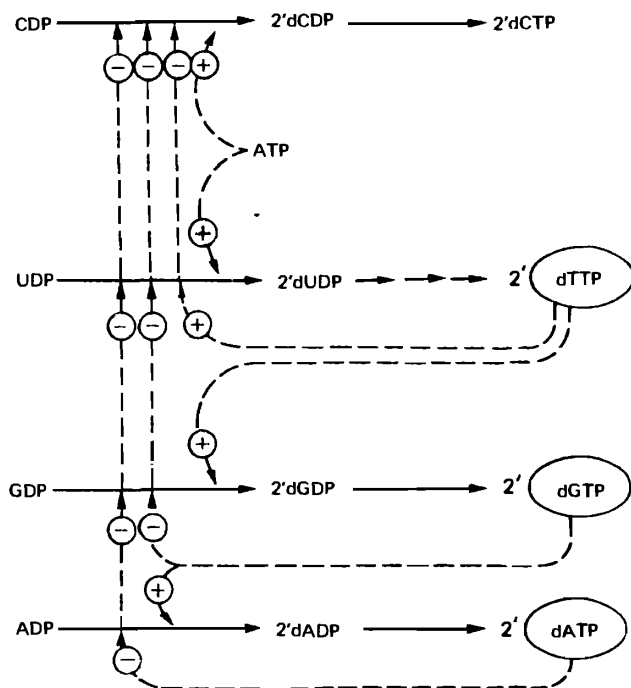


Рис. 35.13. Регуляция восстановления пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов до соответствующих 2'-дезоксирибонуклеотидов. Сплошные линии указывают путь химических превращений. Пунктирные линии обозначают положительную (⊕) и отрицательную (⊖) регуляцию по принципу обратной связи.

Катаболизм пуринов

Конечный продукт катаболизма пуринов у человека — мочевая кислота. При обследовании больных с наследственной формой недостаточности ферментных систем катаболизма пуринов установлено, что 99% мочевой кислоты образуется из субстратов нуклеозидфосфорилазы, функционирующей в цикле реутилизации пуринов. Пуриновые продукты нуклеозидфосфорилазной реакции — гипоксантин и гуанин — превращаются в мочевую кислоту; промежуточным продуктом является ксантин, образующийся в реакциях, катализируемых **гуаназой** и **ксантиноксидазой** (см. рис. 35.1) в печени, тонком кишечнике и почках.

Ксантиноксидаза представляет собой важную мишень для фармакологического вмешательства

при гиперурикемии и подагре. У низших приматов и других млекопитающих (но не у человека) мочевая кислота гидролизуется **уриказой** до аллantoина (рис. 35.14) — соединения, хорошо растворимого в воде. У птиц и наземных рептилий уриказа отсутствует; в качестве конечных продуктов метаболизма азота (белков) и пуринов они экскретируют мочевую кислоту и гуанин.

У этих организмов сформировалась урикотелическая система, позволяющая сохранить воду, ассоциированную с мочевой кислотой, при выделении последней в виде преципитата. Если бы конечным продуктом метаболизма азота у них была мочеви́на, сохранить гидратационную воду было бы невозможно, поскольку растворимость мочевины в воде достигает 10 моль/л (концентрация значительно выше той, которая может быть достигнута при концентрировании мочевины почками).

Метаболизм мочевой кислоты у человека (подагра)

Метаболизм мочевой кислоты у человека был изучен с применением изотопно-меченных мочевой кислоты, а также ее предшественников — глицина и формиата. [^{15}N]-Мочевую кислоту инъецировали внутривенно здоровым людям и больным подагрой, при которой в организме накапливаются значительные количества мочевой кислоты и ее натриевой соли. По разведению инъецированного изотопа рассчитывали общее количество мочевой кислоты, находящейся в водной фазе организма. Этот параметр получил название «растворимый уратный пул». Средняя величина данного показателя для 25 обследованных здоровых взрослых мужчин составляла 1200 мг (разброс 866—1578 мг), а у трех здоровых женщин он колебался от 541 до 687 мг. У больных подагрой растворимый уратный пул был значительно выше и варьировал от 2000 до 4000 мг для пациентов без подагрических узлов, т. е. без отложений урата натрия в мягких тканях. При тяжелой форме подагры, сопровождающейся образованием узлов, растворимый уратный пул достигал величины 31 000 мг. Скорость его обновления у здоровых людей составляет 600 мг за 24 ч. 18—20% удаляемой из организма мочевой кислоты распадается до CO_2 и ам-

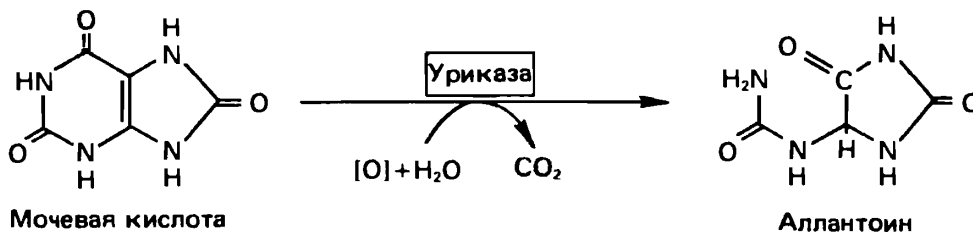


Рис. 35.14. Образование аллantoина из мочевой кислоты.

миака и выделяется через кишечник. Некоторое количество уратов экскретируется с желчью и подвергается деградации кишечной микрофлорой. Следует отметить, что распад мочевой кислоты до CO_2 и NH_3 у человека не связан с жизнедеятельностью кишечных бактерий.

Значение уратов для организма человека не ограничивается их ролью конечного продукта в метаболизме пуринов. Ураты могут функционировать как антиоксиданты, претерпевая неферментативное превращение в аллантоин. Предполагается, что эндогенный антиоксидант — урат — заменяет у приматов аскорбат, способность к синтезу которого у этих млекопитающих утрачена. Таким образом, вполне возможно, что в процессе эволюции утрата уриказы обеспечила определенные селективные преимущества для тех организмов, которые потеряли способность к восстановлению гулонолактона в аскорбат.

Урат натрия легко фильтруется почечными клубочками млекопитающих, интенсивно реабсорбируется и частично экскретируется в проксимальных канальцах, затем секретируется в петле Хенле и, вероятно, снова реабсорбируется в дистальных канальцах. За сутки здоровым человеком выделяется 400—600 мг мочевой кислоты. Большое количество фармакологических препаратов и природных соединений оказывает влияние на реабсорбцию урата натрия в почечных канальцах и его экскрецию. Аспирин в больших дозах ингибирует как экскрецию, так и реабсорбцию мочевой кислоты в почках.

ПИРИМИДИНЫ

Биосинтез пиримидинов

Структура ядра пиримидинов проще и путь их биосинтеза короче, чем у пуринов. В то же время оба пути имеют ряд общих предшественников. ФРПФ, глутамин, CO_2 и аспартат необходимы для синтеза всех пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов. Синтез тимидиновых нуклеотидов, а также всех пуриновых нуждается в присутствии производных тетрагидрофолата. Можно отметить одно существенное различие в путях биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. В первом случае синтез начинается с молекулы рибозофосфата как интегральной части будущей молекулы предшественника нуклеотида, во втором случае сначала синтезируется пиримидиновое основание и только на последних стадиях присоединяется остаток рибозофосфата.

Синтез пиримидинового кольца (рис. 35.15) начинается с образования карбамоилфосфата из глутамина, АТР и CO_2 в реакции, катализируемой в цитозоле карбамоилфосфатсинтазой (реакция 1). Отметим, что карбамоилфосфатсинтаза, ответственная за ранние стадии синтеза мочевины, локализована в митохондриях.

Первый уникальный для биосинтеза пиримидинов этап — образование карбамоиласпартата в реакции конденсации карбамоилфосфата и аспартата катализируется аспартаттранскарибамоилазой (реакция 2). Затем в реакции, катализируемой дигидрооротазой, выпляется H_2O и образуется кольцевая структура (реакция 3).

На следующем этапе происходит дегидрогенирование под действием дигидрооротатдегидрогеназы с использованием NAD в качестве кофактора, при этом образуется оротовая кислота (реакция 4).

В реакции 5 к оротовой кислоте присоединяется остаток рибозофосфата с образованием оротидилата (оротидинмонофосфат, ОМР). Этот процесс осуществляется оротат-фосфорибозилтрансферазой — ферментом, аналогичным гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе и аденин-фосфорибозилтрансферазе, которые участвуют в фосфорилировании пуриновых колец.

Первый истинный пиримидиновый рибонуклеотид — уридилат (уридинмонофосфат, УМР) образуется при декарбоксилировании оротидилата (реакция 6). Таким образом, только на предпоследней стадии образования УМР происходит фосфорилирование гетероцикла.

Дигидрооротатдегидрогеназа — митохондриальный фермент. Все остальные ферменты, участвующие в синтезе пиримидинов *de novo*, локализованы в цитозоле.

Фосфорилирование пиримидиновых нуклеозидмонофосфатов до соответствующих ди- и трифосфатов происходит аналогично тому, как это описано для пуриновых нуклеозидмонофосфатов (реакции 7—12). УТР аминирован до СТР; в реакции участвуют глутамин и АТР (реакция 9). Механизм восстановления пиримидиннуклеозиддифосфатов до соответствующих 2'-дезоксинуклеозиддифосфатов (реакция 10) также аналогичен тому, который описан для пуриновых нуклеозиддифосфатов (рис. 35.6 и 35.13).

Образование тимидилата (тимидинмонофосфат; ТМР) (реакция 12) — единственная реакция на пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов, требующая участия производного тетрагидрофолата в качестве донора одноуглеродного фрагмента. 2'-Дезокси-УМР метилируется тимидилатсинтазой, использующей N^5 , N^{10} -метилентетрагидрофолат как донор метильной группы. Метиленовая группа N^5 , N^{10} -метилентетрагидрофолата в ходе реакции восстанавливается до метильной и присоединяется к атому С-5 dUMP. Процесс сопровождается окислением тетрагидрофолатного переносчика до дигидрофолата. Можно считать, что в результате метилирования dUMP с образованием ТМР происходит полное восстановление гидроксиметильной группы серина (переносимой на тетрагидрофолат при образовании N^5 , N^{10} -метилентетрагидрофолата) до ме-

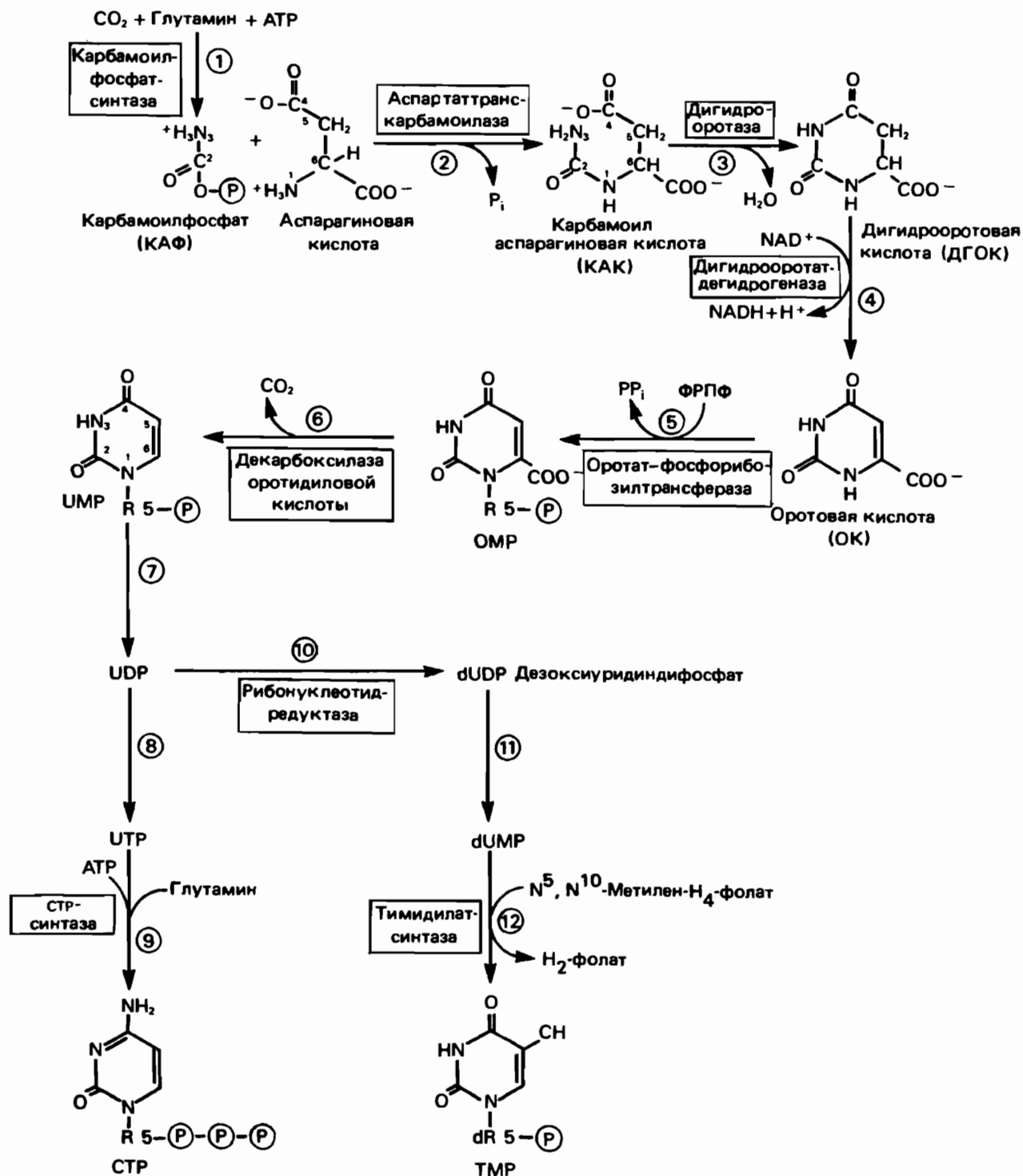


Рис. 35.15. Путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.

тильной с одновременным окислением тетрагидрофолата до дигидрофолата. Для того чтобы фолатный переносчик и далее мог функционировать, необходимо восстановить дигидрофолат до тетрагидрофолата. Эту реакцию катализирует дигидрофолатредуктаза. Именно поэтому делящиеся клетки, вынужденные синтезировать ТМР с образованием дигидрофолата, оказываются особенно чувствительны к ингибиторам дигидрофолатредуктазы. Один из таких ингибиторов — метотрексат (аметоптерин) широко используется как противоопухолевый препарат.

Пути регенерации пиримидиновых нуклеотидов

Клетки млекопитающих не располагают эффективными средствами использования свободных пиримидиновых оснований для синтеза нуклеотидов. В то же время они обладают способностью утилизировать пиримидиновые рубонуклеозиды уридин и цитидин, а также 2'-дезоксирибонуклеозиды тимидин и дезоксицитидин путем превращения их в соответствующие нуклеотиды (рис. 35.16). 2'-Дезоксицитидин фосфорилируется дезоксицитидинкиназой — ферментом, способным также фосфорилировать дезоксигуанозин и дезоксиаденозин.

Фермент **оротат-фосфорибозилтрансфераза**, необходимый для синтеза пиримидинов *de novo*, отвечает за фосфорибозилирование оротовой кислоты с образованием ОМР, хотя оротовая кислота, строго говоря, и не является истинным пиримидиновым основанием. Оротат-фосфорибозилтрансфераза не может использовать в качестве субстратов нормальные пиримидиновые основания, но способна фосфорибозилировать аллопуринол (4-гидроксипиразолопиримидин) до нуклеотидного производного, в котором рибозилфосфат присоединен к атому N-1 пиримидинового кольца этого лекарственного соединения. Противоопухолевый препарат 5-фторурацил также фосфорибозилируется этим ферментом.

Катаболизм пиримидинов

В результате катаболизма пиримидинов, протекающего в основном в печени, образуются хорошо растворимые конечные продукты (рис. 35.17). Именно этим они отличаются от конечных продуктов катаболизма пуринов (мочевая кислота и ее натриевая соль обладают слабой растворимостью). Выделение CO_2 , происходящего из уреидного углерода (C-2) пиримидинового кольца, представляет собой главный путь катаболизма урацила, цитозина и тимина. Основные конечные продукты катаболизма этих оснований — β -аланин и β -аминоизобутират.

Тимин выступает в роли предшественника β -

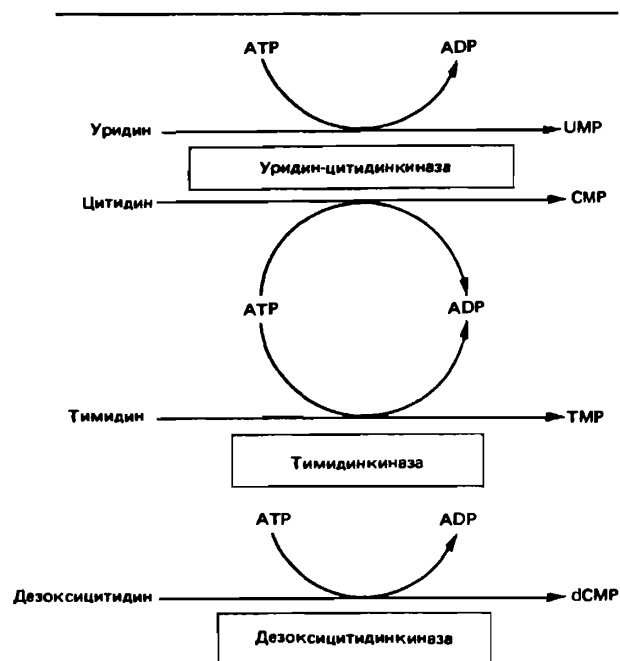


Рис. 35.16. Реакции образования пиримидиновых нуклеозидмонофосфатов из соответствующих пиримидиновых нуклеозидов, катализируемые нуклеозидкиназой.

аминоизобутирата у человека и обычных лабораторных животных. Экскреция β -аминоизобутирата увеличивается при лейкемии и после рентгеновского облучения, что, без сомнения, отражает ускорение гибели клеток и деструкцию их ДНК. Выделение аномально больших количеств β -аминоизобутирата может наблюдаться и у здоровых во всех остальных отношениях людей. Этот признак наследуется как рецессивный и, следовательно, проявляется только у гомозигот по соответствующему аллелю. Примерно у 25% обследованных индивидов (японцев и китайцев по происхождению) обнаружено повышение уровня экскреции β -аминоизобутирата. Сравнительно немного известно о механизме деградации β -аминоизобутирата в организме человека. Фермент, катализирующий обратимое трансаминирование этого соединения, обнаружен в почках свиньи. β -Аминоизобутират превращается в метилмалоновый полуальдегид, затем в пропионат, который в свою очередь преобразуется в сукцинат.

Начальные стадии деградации пиримидиновых нуклеотидов, включающие этап отщепления углевод-фосфатного фрагмента по N-гликозидной связи, весьма напоминают обращенные последние стадии пути биосинтеза. Для псевдоуридина, образующегося *in situ* в результате внутренней перестройки, не существует механизма гидролиза или фосфоролиза до урацила. Соответственно этот необычный нуклеотид у здоровых индивидов экскретируется с мочой неизмененным.

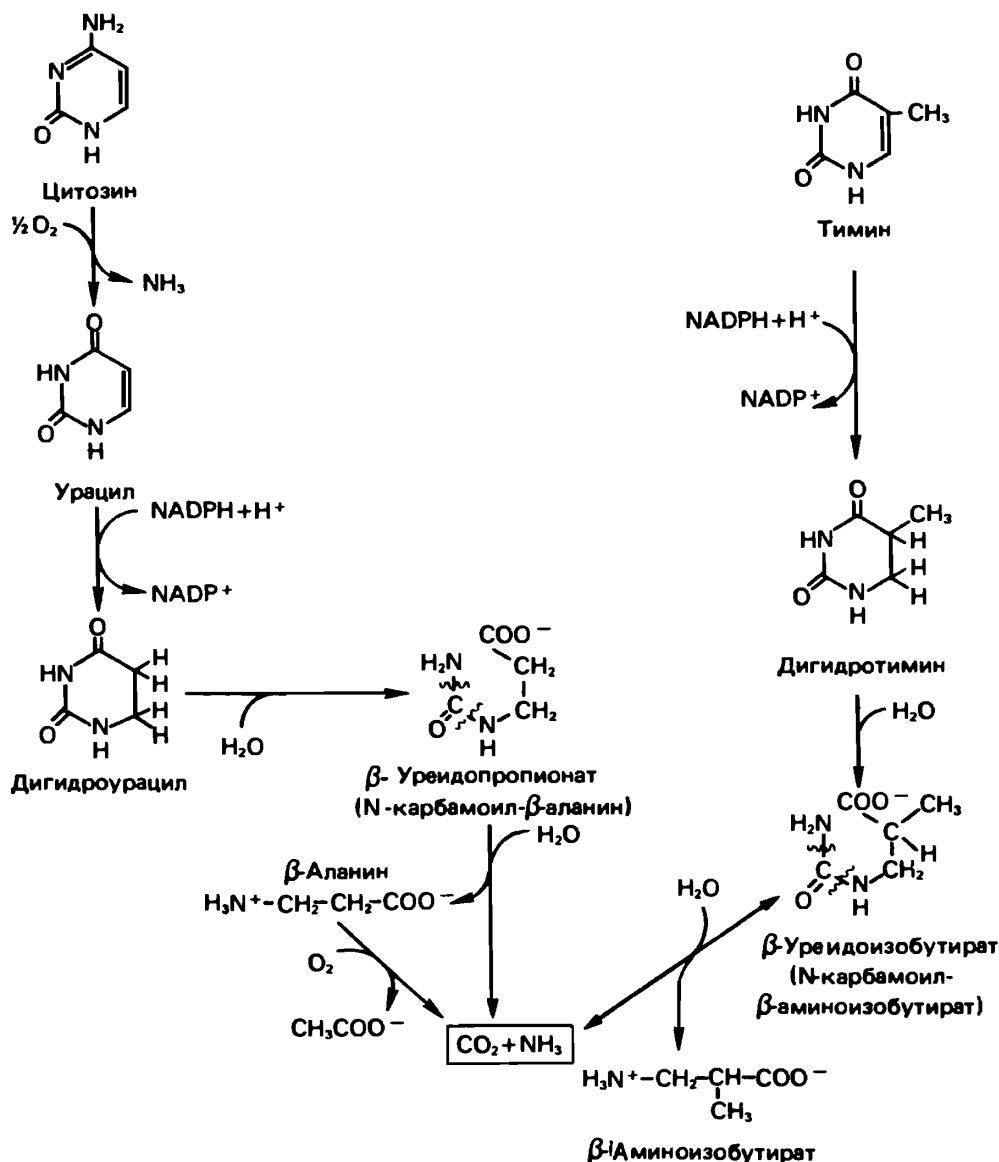


Рис. 35.17. Катаболизм пиримидинов.

Регуляция биосинтеза пиримидинов

Путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов регулируется двумя различными механизмами. Активность первых двух ферментов находится под контролем **аллостерических эффекторов**. Кроме того, три первых и два последних фермента являются объектами координированной **репрессии—дерепрессии**. **Карбамоилфосфатсинтаза** ингибируется УТР, пуриновыми нуклеотидами, но активируется ФРПФ (рис. 35.18). **Аспаргаттранскарбамоилаза** особенно чувствительна к ингибирующему влиянию СТР. Аллостерические свойства аспаргаткарбамоилазы микроорганизмов явились предметом интенсивных и ставших уже классическими исследований механиз-

мов аллостерической регуляции активности ферментов.

Скорость биосинтеза пиримидинов коррелирует со скоростью биосинтеза пуринов, что указывает на координированный контроль синтеза нуклеотидов обоих типов. ФРПФ-синтаза—фермент, катализирующий образование предшественника обоих путей биосинтеза,—ингибируется по принципу обратной связи как пуриновыми, так и пиримидиновыми нуклеотидами. Карбамоилфосфатсинтаза также подвержена ингибированию по принципу обратной связи нуклеотидами обоих типов, а ФРПФ активирует этот фермент. Таким образом, на нескольких этапах биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов осуществляется перекрестная регуляция.

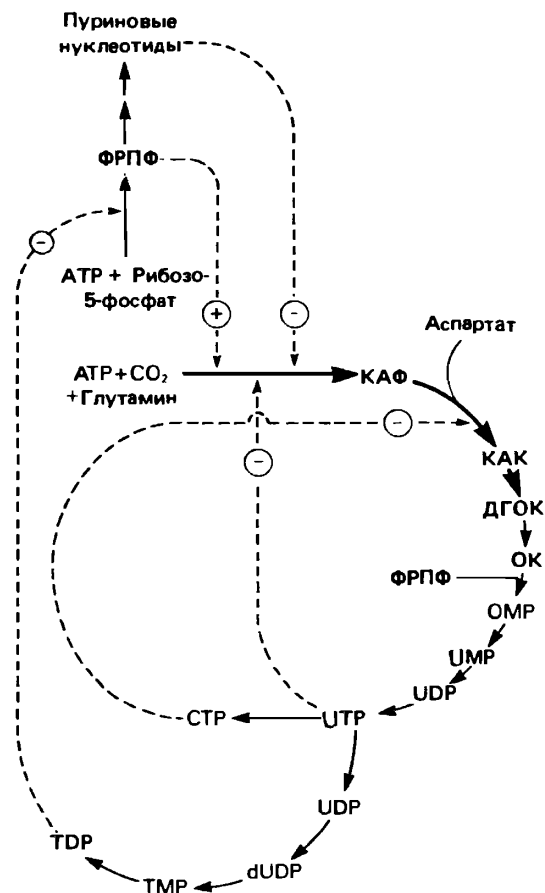


Рис. 35.18. Регуляция пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов. Сплошные линии указывают путь химических превращений. Пунктирные линии обозначают положительную (⊕) и отрицательную (⊖) регуляцию по принципу обратной связи. Сокращения расшифрованы на рис. 35.15.

КЛИНИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНОВ (ТАБЛ. 35.1)

Гиперурикемия и подагра

Доминирующая форма, в которой мочевая кислота находится в организме, зависит от pH соответствующей физиологической жидкости (кровь, моча, спинномозговая жидкость). Величина рК для протона N-9 составляет 5,75, а для протона N-1 — 10,3. Это означает, что в физиологических условиях, т.е. при нормальном pH физиологических жидкостей, можно обнаружить как саму мочевую кислоту, так и ее моноватерную соль (урат натрия). В жидкостях с pH ниже 5,75 основной молекулярной формой является мочевая кислота. При pH 5,75 кислота и ее соль присутствуют в эквивалентных количествах. При pH выше 5,75 доминирующая форма — натриевая соль мочевой кислоты.

О величине растворимого уратного пула можно судить по содержанию урата натрия в сыворотке крови. Когда этот показатель превышает раствори-

мость урата натрия в сыворотке (гиперурикемия), образуются кристаллы. Содержание урата натрия в сыворотке крови при 37°C составляет 2—6 мг%. Кристаллы могут отлагаться в мягких тканях, особенно в суставах или вокруг них. Эти отложения уратов называются «узлами». Накопление кристаллов урата натрия в тканях, их фагоцитоз полиморфноядерными лейкоцитами в суставной щели могут вызывать резкую воспалительную реакцию — **острый подагрический артрит**. Хронический подагрический артрит приводит к деформации сустава.

В водных растворах мочевая кислота (протонированная форма урата) в семнадцать раз менее растворима, чем ее натриевая соль. Моча при pH 5 становится насыщенной уратами при концентрации 15 мг%. Поскольку pH мочи здоровых людей в норме ниже рК мочевой кислоты (5,75), ураты в моче представлены в основном мочевой кислотой. Если pH мочи достигает 7, то в ней может раствориться 150—200 мг уратов на 100 мл.

Мочевая кислота становится основной формой уратов при pH мочи ниже pH 5,75. Такое значение pH характерно для дистальных канальцев и собирательных трубочек почек. Если кристаллы этого конечного продукта катаболизма пуринов образуются в системе выведения мочи, то в зоне, проксимальной от области закисления мочи, это будут кристаллы урата натрия; в самой же области закисления окажутся кристаллы мочевой кислоты. Поэтому большинство камней, образующихся в мочевыводящих путях, состоят из мочевой кислоты. Интенсивность образования камней мочевой кислоты можно в значительной мере уменьшить, смещая pH мочи в щелочном направлении (при этом будет доминировать более растворимая форма — урат натрия).

Игольчатые кристаллы урата натрия характеризуются отрицательным двойным лучепреломлением (они оптически анизотропны) и потому могут быть идентифицированы с помощью поляризационного микроскопа. Если в синовиальной или суставной жидкости обнаруживаются полиморфноядерные лейкоциты, содержащие кристаллы, окрашенные в желтый цвет при ориентации их длинной оси параллельно направлению поляризованного света и в голубой — при перпендикулярной ориентации, то это кристаллы урата натрия. Диагноз — подагра. Однако следует отметить, что в синовиальной жидкости присутствуют также кристаллы пирогосфата кальция, которые характеризуются положительным двойным лучепреломлением; они могут вызывать синдром, получивший название «псевдоподагры».

Нарушения пуринового обмена включают гиперурикемию, гипоурикемию и болезни иммунодефицита. Больных гиперурикемией можно разделить на две группы (табл. 35.2). Представители первой группы характеризуются нормальным количеством экскретируемых уратов; ко второй группе следует

Таблица 35.1. Наследуемые нарушения метаболизма пуринов и связанные с ними изменения активности ферментов

Клинический синдром	Дефектный фермент	Характеристика дефекта	Характеристика клинических проявлений	Тип наследования признака
Подагра	ФРПФ-синтетаза	Повышение активности (увеличение V_{max})	Избыточное образование и увеличение количества экскретируемых пуринов	Сцеплен с X-хромосомой; рецессивный
Подагра	ФРПФ-синтетаза	Устойчивость к ингибированию конечным продуктом	—”—	Сцеплен с X-хромосомой; рецессивный
Подагра	ФРПФ-синтетаза	Низкая K_m для рибозо-5-фосфата	—”—	Вероятно, сцеплен с X-хромосомой; рецессивный
Подагра	ГГФРТ ¹⁾	Частичная потеря активности	—”—	Сцеплен с X-хромосомой; рецессивный
Синдром Леша—Найхана	ГГФРТ ¹⁾	Полная потеря активности	Избыточное образование и увеличение количества экскретируемых пуринов; корковый паралич, членовредительство	Сцеплен с X-хромосомой; рецессивный
Иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Большая потеря активности	Комбинированный иммунодефицит (Т- и В-клетки); дезоксиаденозинурия	Аутосомный рецессивный
Иммунодефицит	Пуриннуклеозид-фосфорилаза	Большая потеря активности	Иммунодефицит (Т-клетки); инозинурия, дезоксиинозинурия, гаунозинурия, гипоурикемия	Аутосомный рецессивный
Почечнокаменная болезнь	Аденин-фосфорибозил-трансфераза	Полная потеря активности	2,8-дигидроксиадениновые камни в почках	Аутосомный рецессивный
Ксантинурия	Ксантиноксидаза	Полная потеря активности	Ксантиновые камни в почках; гипоурикемия	Аутосомный рецессивный

¹⁾ ГГФРТ (англ. HGPRT)— гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансфераза

отнести пациентов с повышенным количеством экскретируемых уратов.

Синдром Леша—Найхана и болезнь Гирке

В некоторых случаях гиперэкскреция уратов (более 600 мг мочевой кислоты за 24 ч) может носить вторичный характер, т. е. быть следствием заболеваний, характеризующихся усилением обмена в тканях (например, рак или псориаз).

У ряда пациентов идентифицированы дефекты ферментных систем, например ФРПФ-синтетазы (устойчивость к ингибированию конечными продуктами и повышенная активность), гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ) (уменьшение количества фермента или его полное отсутствие, синдром Леша—Найхана). К этой же категории можно отнести недостаточность глюкозо-6-фосфатазы (синдром Гирке). Имеется также группа больных с идиопатической гиперурикемией, которую следует рассматривать как гетерогенную до тех пор, пока не будет выяснена молекулярная основа метаболических дефектов.

Таблица 35.2. Классификация пациентов с гиперурикемией

- I. Нормальная экскреция уратов; нарушения функции почек, приводящие к повышению содержания уратов в сыроворотке.
- II. Увеличение количества экскретируемых уратов, обусловленное их избыточным образованием
 - A. Вторичное, обусловленное другими заболеваниями (рак, псориаз)
 - B. Недостаточность известных ферментов
 - 1) нарушения функционирования ФРПФ-синтетазы
 - 2) недостаточность гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансферазы
 - 3) недостаточность глюкозо-6-фосфатазы
 - B. Причины нарушений не установлены.

Синдром Леша—Найхана (полное отсутствие ГГФРТ) наследуется как сцепленный с X-хромосомой рецессивный признак. Болезнь характеризуется корковым параличом, сопровождающимся хореоатетозом, судорогами, стремлением к членовредительству и тяжелой гиперурикемией. Кроме того, наблюдается образование камней мочевой кислоты. Матери больных детей гетерозиготны и мозаичны в отношении ГГФРТАзной недостаточности, у них часто обнаруживается гиперурикемия, но без неврологических симптомов. Частичная недостаточность ГГФРТАзы, вызванная мутациями соответствующего гена, встречается и у мужчин. Для таких больных характерна тяжелая гиперурикемия, не сопровождающаяся существенными неврологическими нарушениями.

Избыточное образование пуринов у пациентов с недостаточностью ГГФРТ связано с увеличенной внутриклеточной концентрацией ФРПФ, что по видимому является результатом уменьшения потребления ФРПФ на пути регенерации пуриновых нуклеотидов. Биохимическая основа неврологических отклонений при синдроме Леша—Найхана неизвестна.

Избыточное образование пуринов и гиперурикемия при болезни Гирке—явление вторичное. Оно обусловлено повышением активности гексозомонофосфатного шунта и увеличением образования рибозо-5-фосфата, из которого синтезируется ФРПФ. Для больных с недостаточностью глюкозо-6-фосфатазы характерен хронический молочнокислый ацидоз, приводящий к повышению порога секреции уратов почками; это способствует накоплению уратов в организме.

Все известные дефекты ферментных систем (за исключением глюкозо-6-фосфатазной недостаточности, для которой соответствующих данных не получено) приводят к повышению внутриклеточной концентрации ФРПФ; избыточная продукция пуринов при глюкозо-6-фосфатазной недостаточности, вероятно, также обусловлена этим обстоятельством. Вполне возможно, что и другие нарушения обмена пуринов, приводящие к гиперурикемии, в конечном счете связаны с повышением внутриклеточного уровня ФРПФ.

Другие нарушения метаболизма пуринов

Гипоурикемия обусловлена либо усилением экскреции, либо снижением скорости образования уратов. Известно, что доги-далматинцы, хотя и обладают, как и другие породы собак, уриказной активностью, не способны эффективно реадсорбировать из клубочкового фильтрата мочевую кислоту. В связи с этим они экскретируют ураты и мочевую кислоту в количестве, которое является неадекватно большим по отношению к содержанию уратов

в плазме. Гипоурикемия у человека может быть связана с аналогичными нарушениями.

Недостаточность ксантиноксидазы, вызванная либо генетическим дефектом, либо тяжелым поражением печени, приводит к гипоурикемии и увеличению экскреции оксипуринов—гипоксантина и ксантина. При тяжелой недостаточности ксантиноксидазы у пациентов часто развивается **ксантинурия** и образование ксантиновых камней.

В последние годы описаны два иммунодефицитных заболевания, связанные с недостаточностью ферментов метаболизма пуринов. С недостаточностью **аденозиндезаминазы** связано тяжелое иммунодефицитное заболевание, при котором снижается количество и нарушается функция как тимусных лимфоцитов (Т-клеток), так и лимфоцитов костного мозга (В-клеток). С недостаточностью **пуриинуклеозид-фосфорилазы** связана более легкая форма иммунодефицита, при которой функции В-лимфоцитов остаются нормальными, но сильно нарушены функции Т-лимфоцитов. Оба заболевания наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Метаболические нарушения при рассмотренных иммунных дисфункциях связаны с накоплением дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dGTP и dATP), которые аллостерически ингибируют рибонуклеотидредуктазу, что, в свою очередь, приводит к снижению содержания в Т-лимфоцитах пула предшественников синтеза ДНК, главным образом dCTP. Пуринодефицитные состояния у человека встречаются редко. Часто они бывают связаны с недостатком фолиевой кислоты и, вероятно, витамина В₁₂, что приводит к снижению синтеза производных фолата.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА ПИРИМИДИНОВ (ТАБЛ. 35.3)

Как отмечалось выше, конечными продуктами метаболизма пуринов являются хорошо растворимые в воде соединения, такие, как СО₂, аммиак, β-аланин и пропионат. Вот почему при состояниях, характеризующихся избыточным образованием пиримидинов, клинические симптомы слабо выражены. В случаях гиперурикемии, обусловленной избыточной продукцией ФРПФ, наблюдаются повышенный синтез пиримидиновых нуклеотидов и соответственно увеличенная экскреция конечных продуктов метаболизма, в частности β-аланина. Поскольку для синтеза тимидилата необходим N⁵, N¹⁰-метилентетрагидрофолат, нарушения метаболизма фолата и витамина В₁₂ приводят к дефициту TMP (влияние недостатка витамина В₁₂ реализуется опосредованно).

Экскреция с мочой β-аминоизобутирата—аутосомный рецессивный признак. Он распространен главным образом среди жителей Востока. Это нару-

Таблица 35.3. Наследуемые нарушения метаболизма пиримидинов и связанные с ними изменения активности ферментов

Клинический синдром	Дефектный фермент	Характеристика дефекта	Характеристика клинических проявлений	Тип наследования признака
β-Аминоизобутиратацидурия	Трансаминаза	Недостаточность	Без симптомов; распространен на Востоке	Аутосомный рецессивный
Оротовая ацидурия тип I	Оротатфосфорибозилтрансфераза и оротидилатдекарбоксилаза	Недостаточность	Кристаллы оротовой кислоты в моче; отставание в развитии и мегалобластическая анемия (?) Иммунодефицит. Ремиссия при пероральном приеме уридина	Аутосомный рецессивный
Оротовая ацидурия тип II	Оротидилатдекарбоксилаза	Недостаточность	Оротидинурия и оротовая ацидурия, мегалобластическая анемия. Ремиссия при пероральном приеме уридина	Аутосомный рецессивный
Недостаточность орнитинтранскарбамоилазы	Орнитинтранскарбамоилаза	Недостаточность	Белковая нетолерантность, печеночная энцефалопатия, оротовая ацидурия	Сцеплен с X-хромосомой; рецессивный

шение не рассматривается как патологическое состояние (об этом уже шла речь при обсуждении катаболизма пиримидинов).

Описаны два типа первичной наследственной оротовой ацидурии. Более распространенная форма (хотя и встречающаяся весьма редко) связана с утратой во всех тестированных типах клеток функции двух ферментов — оротат-фосфорибозилтрансферазы и оротидилат(ОМР)-декарбоксилазы (рис. 35.19). Организм пациентов с этим типом оротовой ацидурии можно считать аутокотрофным по пиримидину. Заболевание легко поддается лечению уридином. В детском возрасте для больных характерны отставание в развитии, мегалобластическая анемия и «оранжевая кристаллоурия» (оротовая кислота). При отсутствии лечения пиримидиновыми нуклеозидами пациенты подвержены инфекциям. Второй тип наследуемой оротовой ацидурии (тип II) связан с недостатком только ОМР-декарбоксилазы (рис. 35.19). У пациентов, страдающих оротовой ацидурией первого типа, основным продуктом экскреции является оротовая кислота. При обследовании больного ацидурией второго типа оказалось, что у него экскретируется главным образом оротидин и лишь небольшое количество оротовой кислоты. В эритроцитах пациентов с оротовой ацидурией типа I были значительно повышены удельные активности аспартаттранскарбамоилазы и дигидрооротаза; они, однако, возвратились к норме при пероральном приеме пациентами уридина. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что конечные продукты пути биосинтеза пиримидинов регулируют активность рассматриваемых ферментов. В условиях недостатка конечных продуктов происходит дерепрессия, вероятно,

координированного характера, по крайней мере этих двух ферментов.

Данные по энзимологии пути биосинтеза пиримидинов позволяют предполагать, что в одной белковой молекуле локализованы активные центры карбамоилфосфатсинтазы, аспартаттранскарбамоилазы и дигидрооротаза, а в другой — активные центры оротат-фосфорибозилтрансферазы и ОМР-декарбоксилазы.

У больных с недостаточностью орнитинтранскарбамоилазы — митохондриального фермента клеток печени, ответственного за раннюю стадию синтеза мочевины и аргинина, наблюдается увеличение экскреции оротовой кислоты, урацила и уридина. По-видимому, в митохондриях этих пациентов в результате снижения активности орнитинтранскарбамоилазы накапливается карбамоилфосфат. Митохондриальный карбамоилфосфат диффундирует в цитозоль, где используется как субстрат для синтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo*. При избыточном образовании оротовой кислоты диагностируется оротовая ацидурия. Обычно она проявляется в легкой форме и не сопровождается образованием кристаллов. Синтез и экскреция оротовой кислоты у таких больных усиливаются при употреблении в пищу продуктов богатых азотом, таких, как мясо.

Оротовую ацидурию могут вызывать по крайней мере два лекарственных препарата. Аллопуринол (4-гидроксипиразолопиримидин) — пуриновый аналог, ингибирующий ксантиноксидазу. Этот препарат широко используется для лечения некоторых форм подагры. Аллопуринол может фосфорилироваться оротат-фосфорибозилтрансферазой, конкурентно ингибируя фосфорилирование оротовой

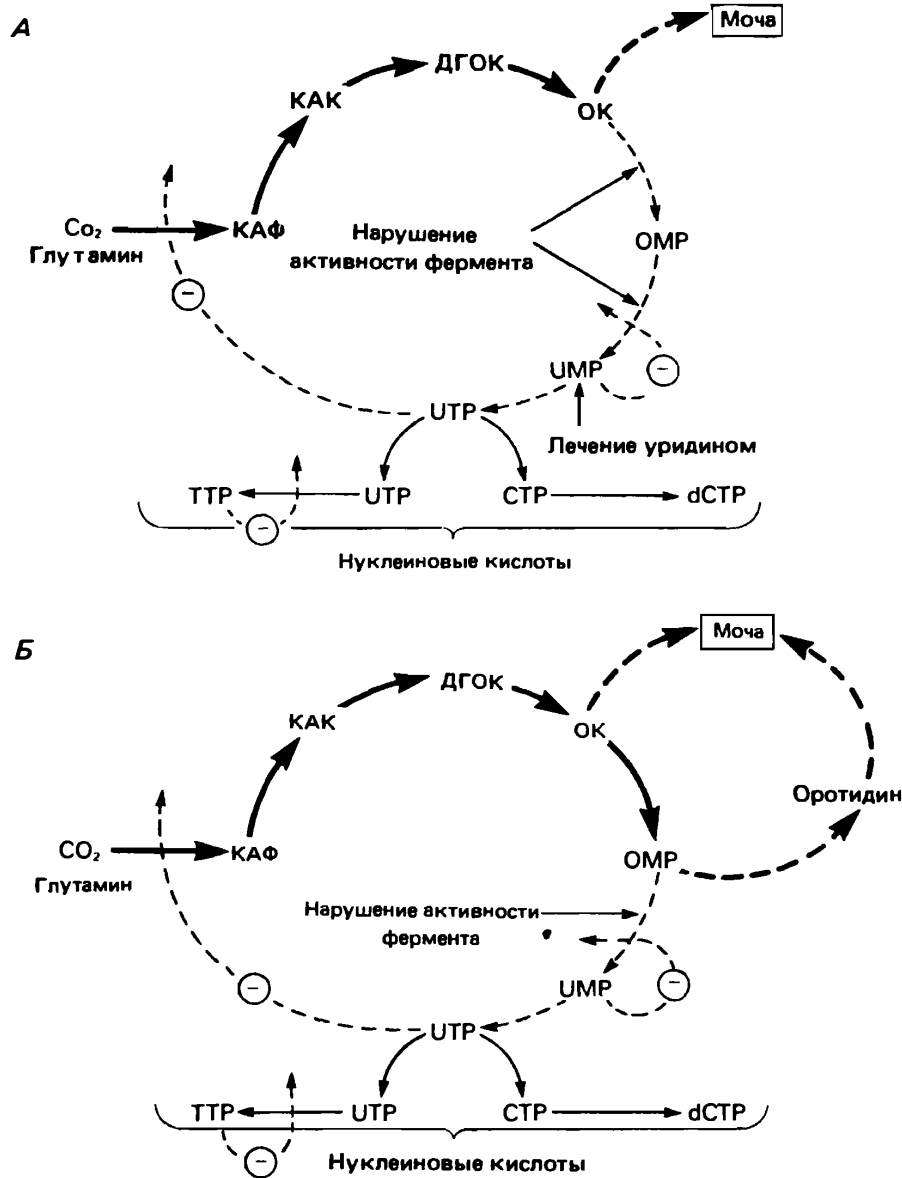


Рис. 35.19. А. Ферментные дефекты и их последствия при оротовой ацидурии типа I, которая характеризуется недостаточностью двух ферментов — оротат-фосфорибозилтрансферазы и оротидилат-декарбоксилазы. Б. Недостаточность оротидилат-декарбоксилазы, приводящая к оротовой ацидурии типа II. Пунктирные линии со знаком минус показывают пути ингибирования по принципу обратной связи в нормальных условиях. При оротовой ацидурии типа I с мочой экскретируется оротовая кислота. При оротовой ацидурии типа II в роли экскретируемых соединений выступают оротовая кислота и оротидин. Аббревиатуры расшифрованы на рис. 35.15. (Redrawn and reproduced, with permission, from Smith L. H. In: Pyrimidine metabolism in man. N. Engl. Med. 1973, 288, p. 764).

кислоты. Более того, образующийся необычный нуклеотид подавляет оротидилатдекарбоксилазу, вызывая тем самым оротовую ацидурию и оротидинурию. Однако путь биосинтеза пиримидинов, по крайней мере у человека, «приспосабливается» к такому ингибированию, и «пиримидиновое голодание» имеет место только на ранних стадиях лечения препаратом.

6-Азауридин после превращения в 6-азауридилат функционирует как конкурентный ингибитор ОМР-

декарбоксилазы, что приводит к увеличению экскреции оротовой кислоты и оротидина.

При специфическом поражении митохондрий клеток печени (**синдром Рейе**) имеет место вторичная оротовая ацидурия. Дело в том, что пораженные митохондрии оказываются неспособными утилизировать карбамоилфосфат, который, как и в случае наследуемой недостаточности орнитинтранскарамоилазы, вызывает избыточное образование оротовой кислоты.

ЛІТЕРАТУРА

- Ames B. N. et al.* Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 6858.
- Henderson J. F.* Regulation of Purine Biosynthesis, Monograph, No. 170, American Chemical Society, 1972.
- Henderson J. F., Paterson A. R. P.* Nucleotide Metabolism: An Introduction, Academic Press, 1973.
- Jones M.* Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animal cells, *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, **49**, 253.
- Kempe T. D. et al.* Stable mutants of mammalian cells that over-produce the first three enzymes of pyrimidine nucleotide biosynthesis, *Cell*, 1976, **9**, 541.
- Martin D. W. Jr., Gelfand E. W.* Biochemistry of diseases of immunodevelopment, *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 845.
- Smith L. H. Jr.* Pyrimidine metabolism in man, *N. Engl. J. Med.*, 1973, **288**, 764.
- Stanbury J. B. et al. (eds.)* The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.
- Thelander L., Reichard P.* Reduction of ribonucleotides, *Annu. Rev. Biochem.*, 1979, **48**, 133.
- Wyngaarden J. B., Kelley W. N.* Gout and Hyperuricemia, Grune and Stratton, 1976.

Технология рекомбинантных ДНК

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Технология рекомбинантных ДНК, чаще называемая **генной инженерией**, революционизировала биологию и оказала огромное влияние на клиническую медицину. До разработки методов рекомбинантных ДНК наследственные болезни человека изучали с помощью анализа родословных и исследуя аномальные белки. Однако во многих случаях, когда конкретный вид генетического повреждения установить не удастся, эти подходы оказываются малоэффективными. Новая технология позволяет адресоваться за нужной информацией непосредственно к молекуле ДНК. В настоящей главе рассмотрены основные концепции, на которых базируется технология рекомбинантных ДНК, ее применение в клинической медицине. В конце главы помещен краткий словарь-справочник.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Разобраться в сути технологии рекомбинантных ДНК важно по нескольким причинам.

1. Информационный взрыв в данной области поистине головокружителен. Для того чтобы следить за исследованиями в этом направлении, необходимо усвоить фундаментальные основы генной инженерии.

2. В настоящее время разработана стратегия изучения молекулярной природы ряда заболеваний, таких, как наследственная гиперхолестеролемия, муковисцидоз, талассемия, хорея Гентингтона, серповидноклеточная анемия.

3. С помощью методов генной инженерии можно получать белки человека в количествах достаточных для терапевтических целей (инсулин, гормон роста, активатор плазминогена).

4. Генная инженерия открыла новые возможности получения белковых вакцин (белки вируса гепатита В) и белковых препаратов для диагностических целей (СПИД и др.).

5. Технология рекомбинантных ДНК оказалась эффективной для решения диагностических задач

и при установлении степени риска развития ряда заболеваний.

6. Появилась принципиальная возможность осуществления генной терапии таких заболеваний, как серповидноклеточная анемия, талассемия, недостаточность аденозиндезаминазы и др. Такой подход был, например, уже реализован в экспериментах на мышах (наследственный гипогонадизм удалось скорректировать с помощью инъекции в оплодотворенную яйцеклетку гена гонадолиберина).

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ДНК

Структура ДНК

ДНК представляет собой биополимер сложной структуры, организованный в двойную спираль. Ее основными элементами являются пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (тимин и цитозин) основания. Эти основания присоединены к атому С-1' углевода (дезоксирибозы). Сами углеводные остатки соединены между собой по 3'- и 5'-положениям фосфодиэфирными связями (рис. 37.1). Чередующиеся остатки дезоксирибозы и фосфатные группы образуют остов двойной спирали (рис. 37.2). Направление связей 3' → 5' определяет ориентацию данной цепи, и, поскольку ориентации двух комплементарных цепей противоположны, их называют антипараллельными.

Принцип комплементарных взаимодействий пар оснований (принцип спаривания оснований) лежит в основе построения и функционирования молекул ДНК. Аденин всегда образует пару с тиминном, а гуанин с цитозином. Эти пары оснований называются комплементарными. Содержание остатков гуанина в любом фрагменте ДНК всегда в точности соответствует содержанию цитозина. Так же равны друг другу количества аденина и тимина. Две цепи ДНК удерживаются друг возле друга за счет комплементарных взаимодействий пар оснований и гидрофобных «стэкинг»-взаимодействий. Эти взаимодействия могут быть нарушены при нагревании, приводящем

к денатурации (плавлению) ДНК. Законы образования пар предсказывают, что при ренатурации две комплементарные цепи ДНК должны вновь соединиться с образованием исходной структуры. Это и происходит в действительности при медленном остывании (отжиге) раствора ДНК, подвергнутой тепловой денатурации.

По температуре денатурации — ренатурации можно оценить степень комплементарности нуклеиновых оснований в цепях ДНК. Для денатурации сегментов ДНК, характеризующихся высоким уровнем комплементарности, требуются соответственно большие затраты энергии. Расхождение цепей таких фрагментов ДНК происходит соответственно при более высокой температуре. Это физическое явление используется на практике для определения степени родства (гомологии) различных нуклеиновых кислот и лежит в основе метода гибридизации (одного из главных в генной инженерии).

Гаплоидный набор человека состоит примерно из $3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов (п. н.). Если размер гена в среднем равен 3000 п. н., то, допустив, что гены не перекрываются, а транскрипция идет лишь в одном направлении, можно вычислить, что геном человека включает до 10^6 различных генов. Считается, что их в геноме человека не более 10^5 и лишь 10% геномной ДНК непосредственно кодируют белки. О функциональном значении остальных 90% известно крайне мало.

Двойная спираль упакована в компактную структуру, образованную за счет взаимодействий с целым рядом белков (главным образом основного характера), называемых **гистонами**. Такая компактизация может выполнять регуляторные функции и имеет также определенный «практический смысл». Дело в том, что ДНК ядра клетки при полном расплетании достигает длины 1 м. Хромосомные белки упаковывают гигантскую молекулу в ядро объемом всего лишь в несколько кубических микрон.

Организация гена

Как правило, прокариотические гены состоят из небольшого регуляторного участка (100—500 п. н.) и большого кодирующего белок сегмента (500—10 000 п. н.). Часто несколько генов контролируются одним и тем же регуляторным элементом. Большинство генов млекопитающих имеют более сложную структуру. Кодирующие области эукариотических генов прерываются и чередуются с некодирующими участками. Эти участки, будучи транскрибированными, удаляются в процессе созревания первичного транскрипта. Кодирующие области (остающиеся в зрелой мРНК) называются **экзонами**. Нуклеотидные последовательности ДНК, находящиеся между экзонами, называются **интронами** (рис. 36.1). Интроны удаляются из первичного транскрипта до того,

как происходит перенос РНК в цитоплазму. Процесс удаления интронов и сшивания (лигирования) значащих участков получил название «**сплайсинг РНК**». Неправильный сплайсинг может стать причиной болезни человека (см. ниже), что указывает на важность этой посттранскрипционной стадии. Регуляторные области эукариотических генов обычно располагаются с 5'-конца от точки инициации транскрипции (**5'-фланкирующая последовательность ДНК**). Иногда регуляторные последовательности находятся внутри самого гена или даже в 3'-фланкирующей области. В клетках млекопитающих каждый ген обладает собственным регуляторным элементом. Многие гены эукариот (а также некоторых вирусов, реплицирующихся в клетках млекопитающих) содержат специальные участки ДНК, называемые «**энхансерами**», которые повышают уровень транскрипции. Некоторые гены содержат также «**сайленсеры**» — участки, ослабляющие транскрипцию. Гены млекопитающих — это сложные, многокомпонентные структуры.

Транскрипция генов

Основное направление передачи генетической информации реализуется в цепочке ДНК → мРНК → белок (рис. 36.1, см. также гл. 41). Процесс этот жестко контролируется и состоит из ряда сложных этапов, каждый из которых регулируется одним или несколькими ферментами или факторами. Ошибка на любом этапе может приводить к заболеванию.

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В основе методологии генной инженерии лежит выделение ДНК и проведение различных манипуляций с ее молекулами, включая получение химер (например, молекулы ДНК, построенной из фрагментов ДНК человека и бактерий).

Ферменты рестрикции

Один из важнейших инструментов генной инженерии — **эндонуклеазы**, ферменты, расщепляющие ДНК по специфическим последовательностям нуклеотидов внутри цепи (в противоположность **экзонуклеазам**, которые расщепляют ДНК с концов молекулы). Эти ферменты получили название **рестриктаз**, поскольку их присутствие в бактериальной клетке ограничивает рост определенных бактериальных вирусов, называемых бактериофагами. Рестриктазы расщепляют ДНК на относительно небольшие фрагменты в участках последовательности строго определенной структуры. Этим их воздействие отличается от большинства других ферментативных, химиче-

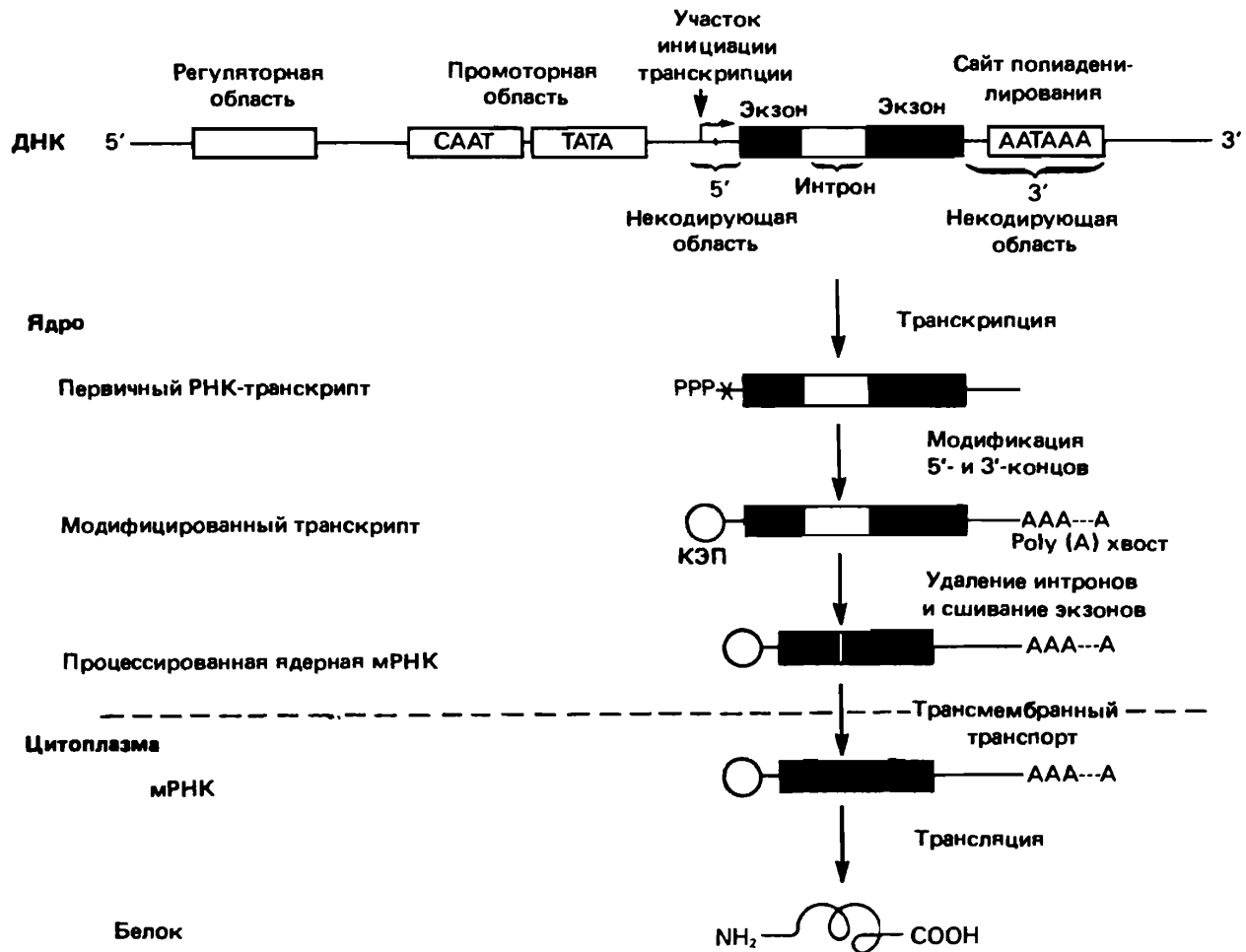


Рис. 36.1. Организация транскрипционной единицы и этапы экспрессии эукариотических генов. Эукариотические гены состоят из структурной и регуляторной областей. Структурная область представлена кодирующей ДНК и некодирующими 5'- и 3'-последовательностями. Кодирующая ДНК включает экзоны — участки ДНК, транскрипты которых остаются в составе зрелой мРНК, и интроны (транскрипты этих последовательностей удаляются из РНК в ходе процессинга). Структурная область гена ограничена с 5'-конца сайтом инициации транскрипции, а с 3'-конца — полиаденилатным сайтом или сайтом терминции. Промоторная область, содержащая специфические последовательности, взаимодействующие с белковыми факторами, рассмотрена в гл. 39 и 41. Первичный транскрипт имеет на 5'-конце специфическую структуру — КЭП и участок, богатый «А» на 3'-конце. После удаления интронов из первичного транскрипта образовавшаяся зрелая мРНК транспортируется в цитоплазму, где и транслируется с образованием белковой молекулы.

ских или физических воздействий, приводящих к случайным разрывам цепей ДНК. Рестриктазы (уже открыто более 200 типов ферментов этого класса) являются частью защитной системы бактерий, охраняющей собственный геном от чужеродной, главным образом вирусной, ДНК. Рестриктазы присутствуют только в таких клетках, которые содержат и специфические метилазы. Роль этих ферментов — метилирование собственной (хозяйской) ДНК клетки и защита ее таким образом от действия рестриктаз. Сайт-специфические метилазы и рестриктазы всегда присутствуют в бактериях одновременно.

Рестриктазы принято именовать по названию бактерий, из которых их выделяют (табл. 36.1). Так, название *EcoRI* свидетельствует о том, что этот фермент выделен из *Escherichia coli*, *BamHI* — из *Bacillus*

amiloquefaciens. Первая из трех букв аббревиатуры соответствует первой букве названия рода (*E*). Последующие две буквы являются начальными буквами видового названия (*co*). Буква *R* говорит о том, из какого штамма выделен фермент. Римская цифра соответствует порядковому номеру рестриктазы в ряду аналогичных ферментов, выделенных из этого микроорганизма (например, *EcoRI*, *EcoRII*). Каждый фермент узнает определенную 4—7-членную последовательность в двухцепочечной ДНК. Разрезание ДНК по этим сайтам приводит к образованию либо «тупых» (например, при действии рестриктазы *HpaI*), либо «липких», т. е. перекрывающихся (например, *BamHI*), концов (рис. 36.2). Для конструирования гибридных молекул особенно удобны липкие концы (см. ниже). Если допустить, что нуклеотиды распределены по молекуле ДНК совершенно случай-

Таблица 36.1. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности

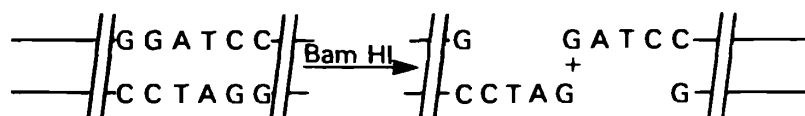
Рестриктаза	Расщепляемая посл.	Бактериальный источник
Bam HI	<pre> ↓ G G A T C C C C T A G G ↑ </pre>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bgl II	<pre> ↓ A G A T C T T C T A G A ↑ </pre>	<i>Bacillus globigii</i>
Eco RI	<pre> ↓ G A A T T C C T T A A G ↑ </pre>	<i>Escherichia coli</i> RY13
Eco RII	<pre> ↓ C C T G G G G A C C ↑ </pre>	<i>Escherichia coli</i> R245
Hind III	<pre> ↓ A A G C T T T T C G A A ↑ </pre>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
Hha I	<pre> ↓ G C G C C G C G ↑ </pre>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hpa I	<pre> ↓ G T T A A C C A A T T G ↑ </pre>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Mst II	<pre> ↓ C C T N A G G G G A N T C C ↑ </pre>	<i>Microcoleus</i> strain
Pst I	<pre> ↓ C T G C A G G A C G T C ↑ </pre>	<i>Providencia stuartii</i> 164
Taq I	<pre> ↓ T C G A A G C T ↑ </pre>	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

А — аденин; С — цитозин; G — гуанин, I — тимин. Стрелки указывают на сайты расщепления. В результате рестрикции могут формироваться «липкие» (*Bam* HI) или «тупые» (*Hpa* I) концы. Длина узнаваемой последовательности варьирует и составляет 4 п. н. для *Taq* I, 5 п. н. для *Eco* RII, 6 п. н. для *Eco* RI и 7 п. н. для *Mst* II. Согласно принятым правилам, верхняя цепь последовательности-мишени представлена в ориентации 5'→3', а нижняя — в ориентации 3'→5'. Обратите внимание, что большинство последовательностей является палиндромами (т.е. читаются одинаково в противоположных направлениях по разным цепям). Остаток, обозначенный N, означает любой нуклеотид.

ным образом, можно рассчитать частоту встречаемости участка узнавания для данной рестриктазы. В каждой нуклеотидной позиции молекулы ДНК с одинаковой вероятностью может оказаться один из 4-х нуклеотидов (A, G, C, T). Поэтому фермент,

узнающий четырехзвенную последовательность, будет находить одну мишень на 256 пар оснований (4⁴). В то же время фермент, различающий шести-звенную последовательность, будет находить специфический участок узнавания 1 раз на 4096 пар осно-

А "Липкие" концы



Б "Тупые" концы

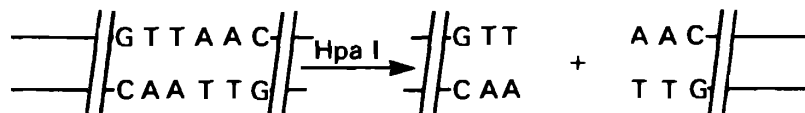


Рис. 36.2. Расщепление ДНК рестрицирующими эндонуклеазами (рестриктазами). В результате рестрикции образуются фрагменты (рестрикты) либо с «липкими» (А), либо с «тупыми» (Б) концами.

ваний (4⁶). Любой фрагмент ДНК обладает характерным расположением сайтов узнавания различных рестриктаз, что позволяет строить так называемые рестриктазные карты. При расщеплении ДНК какой-либо одной рестриктазой получают смесь фрагментов, каждый из которых имеет одни и те же концевые участки. Такие фрагменты можно разделить методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле (о методах блоттинга см. ниже). Эта процедура, основанная на применении рестриктаз, представляет собой важнейший этап клонирования генов.

Другие ферменты

Ряд других ферментов, использующих ДНК в качестве субстрата, также имеет важное значение для генной инженерии. На некоторых из них мы остановимся в этой и последующих главах (табл. 36.2).

Конструирование химерных молекул ДНК

Ковалентное соединение (в дальнейшем мы будем пользоваться термином «лигирование») липких концов фрагментов ДНК — процедура технически не

Таблица 36.2. Ферменты, используемые в работе с рекомбинантными ДНК. (Adapted and reproduced, with permission, from Emery A. E. H. Page 41 in: An introduction to Recombinant DNA, Wiley, 1984.)

Фермент	Реакция	Область приложения
Щелочная фосфатаза	Дефосфорилирует 5'-концы РНК и ДНК	Удаление 5'-PO ₄ групп перед введением метки методом кинирования, а также для предотвращения лигирования молекул вектора по типу «сам на себя»
BAL-31 нуклеаза	Деградация как 5'-, так и 3'-концов ДНК	Введение концевых делеций в молекулы ДНК
ДНК-лигаза	Катализирует образование связей между молекулами ДНК	«Сшивание» молекул ДНК
ДНК-полимераза I	Синтез двухцепочечной ДНК по ДНК-матрице	Синтез двухцепочечной кДНК; ник-трансляция
ДНК-полимераза I	В соответствующих условиях вносит одноцепочечные разрывы в ДНК	Ник-трансляция, картирование гиперчувствительных участков в ДНК
Эксонуклеаза III	Удаляет нуклеотиды с 3'-концов ДНК	Секвенирование ДНК, картирование ДНК-белковых взаимодействий
λ-Эксонуклеаза	Удаляет нуклеотиды с 5'-концов ДНК	Секвенирование ДНК
Полинуклеотидкиназа	Переносит терминальный (в γ-положении) фосфат АТФ на 5'-ОН-группы ДНК и РНК	Введение ³² P в ДНК и РНК
Обратная транскриптаза	Синтезирует ДНК по РНК-матрице	Синтез кДНК по мРНК; картирование РНК (с 5'-конца)
Нуклеаза S1	Деградирует одноцепочечную ДНК	Удаление шпильки при синтезе кДНК; РНК-картирование (как с 5'-, так и с 3'-конца)
Терминальная трансфераза	Добавляет нуклеотиды к 3'-концу ДНК	Создание гомополимерных «хвостов»

сложная, однако при этом могут возникать определенные проблемы. Так, липкие концы вектора могут лигироваться сами на себя без включения клонируемого фрагмента. Кроме того, может произойти отжиг липких концов двух различных фрагментов, что приведет к образованию гетерогенной вставки. Не все интересующие исследователя участки ДНК содержат удобно расположенные сайты узнавания для рестриктаз, дающих липкие концы. Для преодоления этих трудностей иногда используют рестриктазы, образующие тупые концы, после чего с помощью специфического фермента (терминальной трансферазы) генерируют новые концы. Так, присоединение к 3'-концам вектора гомополимерной цепочки, состоящей из dG, а к 3'-концам клонируемого фрагмента ДНК — цепочки polyd(C) — обеспечивает исключительно межмолекулярный отжиг. В ходе этой процедуры, получившей название «присоединение гомополимерного хвоста», образуется также сайт для рестриктазы *SmaI*, что обеспечивает возможность последующего вырезания клонированного фрагмента. Иногда к тупоконечной ДНК присоединяют синтетические олигонуклеотидные линкеры, содержащие участки узнавания для определенной рестриктазы. С использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 может проводиться и непосредственное лигирование фрагментов с тупыми концами. Этот метод, менее эффективный, чем лигирование по липким концам, имеет однако то преимущество, что с его помощью возможно сшивание любых пар фрагментов. К недостаткам его следует отнести невозможность легко проконтролировать ориентацию вставки и число встроенных фрагментов, а также «вырезать» клонированный фрагмент из рекомбинантной молекулы ДНК.

Клонирование

Понятие «клон» определяется как большая популяция идентичных молекул, бактерий или клеток — потомков одного предка. Клонирование позволяет получать большое количество идентичных молекул ДНК, которые можно охарактеризовать и использовать в каких-то целях. Метод клонирования основан на том факте, что химерные или гибридные молекулы ДНК могут быть сконструированы в составе **векторов для клонирования**, к которым относятся бактериальные плазмиды, фаги или космиды, способные к репликации в хозяйских клетках под контролем своих собственных регуляторных элементов. Таким путем добиваются амплификации химерной ДНК. Общая схема процесса клонирования представлена на рис. 36.3.

Бактериальные плазмиды — это небольшие кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, в функции которых входит, например, обеспечение устойчивости к антибиотикам для несущих их хозяйских кле-

ток. Плазмиды обладают несколькими свойствами, которые делают их чрезвычайно удобными для использования в качестве векторов для клонирования: 1) в бактериальной клетке они могут существовать в одной или множестве копий; 2) реплицируются плазмиды независимо от хозяйской ДНК. В настоящее время для многих плазмид уже известна полная нуклеотидная последовательность. Это делает возможным точную локализацию сайтов рестрикции для клонирования фрагментов ДНК. Плазмиды значительно меньше хозяйской хромосомной ДНК и поэтому могут быть легко отделены от нее. Клонированный фрагмент легко выделяется из рекомбинантной плазмиды посредством ее расщепления той же рестриктазой, по сайту которой проводили лигирование.

Фаги обычно содержат линейную ДНК, в которую могут быть встроены фрагменты чужеродной ДНК по какому-либо из доступных сайтов рестрикции. Химерную ДНК выделяют обычно после завершения рекомбинантным фагом литического цикла и выхода зрелых инфекционных фаговых частиц. Основным преимуществом фаговых векторов перед плазмидными является то, что в отличие от плазмид, способных нести фрагменты ДНК до 6—10 т. п. н., в фаговые частицы удается встраивать фрагменты размером до 10—20 т. п. н. Величина клонируемого фрагмента определяется общим количеством ДНК, способным упаковываться в головку фага.

Фрагменты еще большего размера могут быть клонированы в космидах — векторах, объединяющих преимущества плазмид и фагов. **Космиды** — это плазмиды, содержащие специфические участки, называемые **cos-сайтами**, которые необходимы для упаковки ДНК фага λ в капсид. Эти вектора могут поддерживаться в бактериальной клетке в плазмидной форме, но так как большая часть ДНК фага из космиды удалена, то соответственно увеличивается и возможная длина клонируемого фрагмента. Довольно обычными для космид являются вставки размером 30—50 т. п. н. Свойства векторов трех типов сравниваются в табл. 36.3.

Когда решается вопрос о том, в какую область вектора ввести клонируемый фрагмент, необходимо учитывать, что вставка в функционально важную последовательность неизбежно нарушит какое-либо из свойств вектора. Впрочем, такое нарушение может быть использовано в целях селекции рекомбинантных молекул. Например, широко распространенный плазмидный вектор **pBR322** несет гены устойчивости к двум антибиотикам — **ампициллину** и **тетрациклину**. Для клонирования часто используется уникальный **PstI**-сайт в гене устойчивости к ампициллину. Встраивание чужеродного фрагмента ДНК приводит к инактивации гена ампициллинустойчивости, и бактерии, несущие такую рекомбинантную плаз-

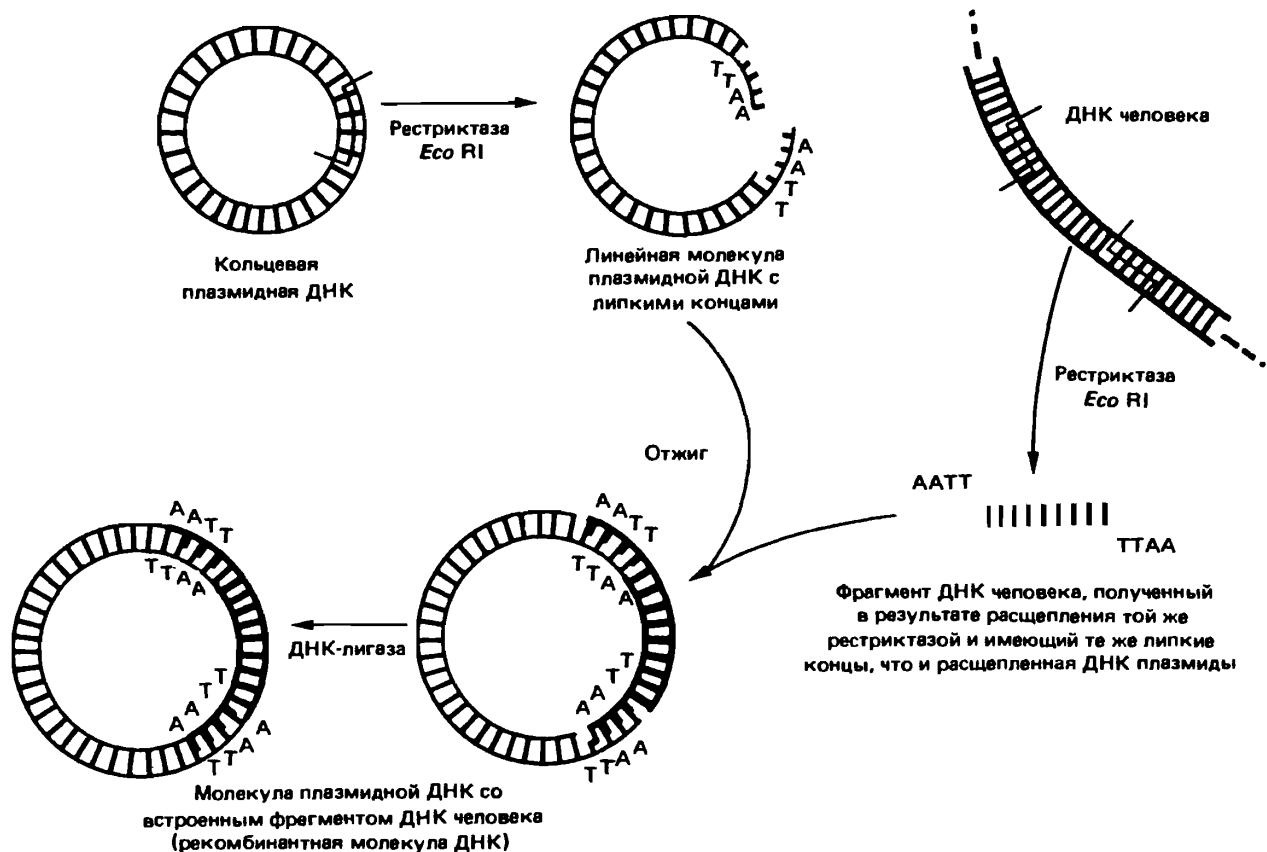


Рис. 36.3. Использование рестриктаз для конструирования рекомбинантных или химерных молекул ДНК. Введенная обратно в бактериальную клетку (при трансформации) плазмида реплицируется, а вместе с ней реплицируется и последовательность-вставка. Поскольку воссоединение липких концов реконструирует сайт узнавания рестриктазы, клонированный фрагмент может быть легко выделен из рекомбинантной плазмиды при помощи той же рестриктазы. Если при этом использовать смесь всех фрагментов, образованных в результате расщепления тотальной ДНК человека одной и той же эндонуклеазой, то при помощи клонирующих плазмид можно получить около миллиона различных рекомбинантных молекул ДНК, каждая из которых дает начало индивидуальному бактериальному клону. (Modified and reproduced, with permission, from Cohen SN: The manipulation of genes. Sci. Am. [July] 1975; 233: 34.)

Таблица 36.3. Широко распространенные векторы для клонирования

Вектор	Размер клонируемого фрагмента ДНК (вставки)
Плазмида pBR322	0,01—10 т. п. н.
Лямбда Харон 4А	10—20 т. п. н.
Космиды	35—50 т. п. н.

миду, становятся чувствительными к этому антибиотику (рис. 36.4). Это позволяет легко отличить исходную плазмиду, обеспечивающую устойчивость бактерии-хозяина к обоим антибиотикам, от рекомбинантной формы. Чтобы получить еще более четкие доказательства того, что плазмидная ДНК действительно является химерной (несет вставку), можно сравнить размеры сконструированной плазмиды с исходной методом гель-электрофореза. Рекомбинантная плазмида, естественно, будет иметь больший молекулярный вес.

Геномные библиотеки и их конструирование

Подобрав соответствующие условия клонирования, можно добиться того, что в наборе клонированных фрагментов будут содержаться практически все гены данного генома. Такие коллекции клонов, полученные для конкретного генома, называют **геномными библиотеками**. Геномная библиотека готовится из тотальной ДНК клеточной линии или ткани. В отличие от геномной библиотеки библиотека кДНК представляет популяцию мРНК в ткани. Геномная библиотека готовится методом частичного расщепления тотальной ДНК какой-либо «мелкощепящей» рестриктазой (например, *SauIII*A). Смысл такой обработки заключается в том, чтобы получить популяцию больших фрагментов ДНК, содержащих полноразмерные гены. Для конструирования геномных библиотек предпочтительно использовать фаговые векторы, так как они позволяют клонировать очень протяженные фрагменты ДНК (до 20 т. п. н.). Число независимо полученных фаговых клонов, тре-

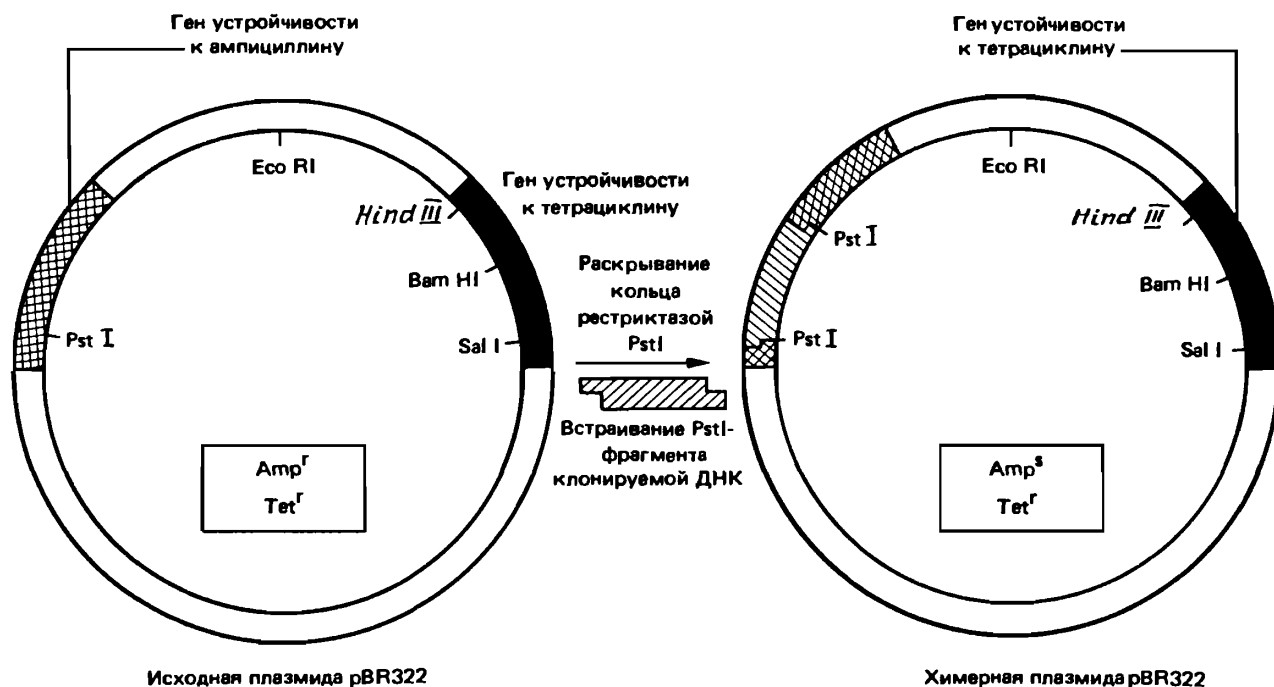


Рис. 36.4. Метод выявления рекомбинантных молекул ДНК. Фрагмент ДНК встроен в уникальный Pst I-сайт плазмиды pBR322. «Вставка» инактивирует ген, кодирующий белок, который обеспечивает устойчивость бактерии-хозяина к ампициллину. Следовательно, бактериальные клетки, несущие рекомбинантную ДНК, не способны формировать колонии на среде, содержащей этот антибиотик. Используя для анализа трансформантов среды с тетрациклином и ампициллином, можно отобрать клоны, несущие рекомбинантные плазмиды.

буемых для создания представительной библиотеки, обратно пропорционально размеру клонируемых фрагментов, но прямо пропорционально размеру генома (табл. 36.4). Библиотека генома человека, состоящая из 10^6 клонов со встроенными достаточно протяженными фрагментами, с вероятностью около 99% содержит любой уникальный ген. Получение такой библиотеки обеспечивает высокую вероятность выявления интересующего гена.

Библиотека кДНК готовится в несколько этапов. Сначала выделяют тотальную мРНК ткани, а затем с помощью обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы проводят обратную транскрипцию мРНК в двухцепочечную ДНК. По техническим причинам редко удается получить полноразмерную копию мРНК (кДНК). Как правило, клонируются более короткие ее фрагменты. Для этой работы обычно используют плазмиды, так как работать с ними легче, чем с фаговыми и космидными векторами. Впрочем, существует целый класс векторов — лямбдоидные фаги, — специально предназначенных для клонирования кДНК (см. ниже).

Векторы, обеспечивающие синтез белка, кодируемого клонированным геном, называют экспрессирующими. Такие векторы широко используют для выявления специфических кДНК молекул в кДНК-библиотеке, а также для наработки генно-инженерных белков. Специально сконструированные экспрессирующие векторы имеют, как правило, сильный индуцибельный промотор, кодоны инициа-

Таблица 36.4. Состав представительных геномных библиотек ¹⁾

Источник	Представительная геномная библиотека
<i>E. coli</i>	1500 фрагментов
Дрожжи	4500 фрагментов
Дрозофила	50 000 фрагментов
Млекопитающие	800 000 фрагментов

¹⁾ Число фрагментов (независимых клонов), необходимое для создания библиотеки, гарантированно представляющей все уникальные гены, обратно пропорционально среднему размеру клонируемых фрагментов и прямо пропорционально общему количеству генов данного организма. Числа, приведенные выше, даны для библиотек с 99%-ной вероятностью представляющих полный геном при размере клонируемых фрагментов $2 \cdot 10^4$ пар нуклеотидов. Различия в необходимом числе индивидуальных клонов отражают различную степень сложности геномов соответствующих организмов.

Число необходимых клонов рассчитывается по формуле

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)},$$

где P — желаемая вероятность, а f — доля тотального генома в индивидуальном клоне. Для млекопитающих, характеризующихся сложностью гаплоидного генома $3 \cdot 10^9$, это уравнение будет выглядеть следующим образом:

$$N = \frac{\ln(1 - 0,99)}{\ln\left(1 - \left[\frac{2 \cdot 10^4}{3 \cdot 10^9}\right]\right)}.$$

Преимущество библиотек, сконструированных на основе «вставок» большого размера, становится очевидным, если произвести соответствующие вычисления для гипотетической вставки со средним размером $5 \cdot 10^3$ вместо $2 \cdot 10^4$.

ции трансляции для всех возможных рамок считывания, терминаторы транскрипции и трансляции и, если необходимо, определенные сигналы процессинга белка. Некоторые экспрессирующие векторы содержат гены ингибиторов протеаз, что увеличивает выход продукта экспрессируемого гена. Для конструирования библиотек кДНК весьма часто используется вектор λ gt 11. Этот вектор позволяет клонировать достаточно длинные фрагменты кДНК и вместе с тем обеспечивает транскрипцию и трансляцию клонированных генов. Для скрининга кДНК-библиотек, полученных на основе вектора λ gt 11, пригодны как кДНК-зонды, так и специфические антитела.

Зонды

Для выявления специфического клона в составе геномных или кДНК-библиотек, а также при количественном определении ДНК или РНК используются различные типы молекулярных зондов. Как правило, зонды (пробы) — это фрагменты ДНК или РНК, содержащие меченые ^{32} Р-нуклеотиды. Работа с зондами основана на способности последних «узнавать» комплементарные последовательности в молекулах ДНК или РНК. кДНК, синтезированная на матрице специфической мРНК, может быть использована в качестве зонда при скринировании библиотеки кДНК и геномной библиотеки. Один из наиболее распространенных методов поиска специфических последовательностей основан на применении синтетических олигонуклеотидов, последовательность нуклеотидов в которых подбирается по аминокислотной последовательности небольшого участка искомого белка с учетом вырожденности кода. При условии точного совпадения последовательности, длины олигонуклеотидного зонда в 15–20 звеньев оказывается достаточно для достоверной гибридизации и обнаружения уникального гена. кДНК-зонды используются также для выявления после электрофореза специфических фрагментов ДНК или РНК и переноса их на нитроцеллюлозный фильтр (методы «Саузерн-блоттинга» и «Нозерн-блоттинга» соответственно).

Блоттинг и техника гибридизации

Для визуализации специфического фрагмента ДНК или РНК среди тысяч других «примесных» молекул используется комбинация целого ряда экспериментальных приемов, которые в совокупности получили название «блоттинг». На рис. 36.5 показаны схемы проведения Саузерн-блоттинга (для визуализации фрагментов ДНК), Нозерн-блоттинга (для РНК) и Вестерн-блоттинга (для белков). Первая процедура названа по имени автора методики, остальные возникли как лабораторный жаргон, но со вре-

менем стали общепринятыми терминами. Первая методика полезна при определении количества копий гена (копийности) в данной ткани или при выявлении значительных структурных изменений в генах (делеции, вставки или перегруппировки). Иногда даже удается выявить точковую мутацию, если она затрагивает сайт рестрикции. Нозерн- и Вестерн-разновидности блоттинга используются для определения молекулярных размеров и количества специфических РНК и белковых молекул.

Для идентификации и выделения интересующих исследователя клонов разработан метод гибридизации в бактериальных колониях или фаговых бляшках. На колонии бактерий, выращенные на твердой среде, сначала накладывают нитроцеллюлозный фильтр. Бактерии прилипают к фильтру. После лизиса и денатурации под действием NaOH и фиксирования денатурированной ДНК прогреванием фильтр инкубируют в растворе с радиоактивно меченным зондом. По окончании гибридизации фильтр отмывают от избытка зонда и выявляют образовавшийся меченый гибридный комплекс путем контакта с рентгеновской пленкой. Сравнивая положение пятен на радиоавтографе с положением колоний на чашке, выбирают ту из них, которая дала положительный сигнал. Аналогичным образом поступают и при идентификации клонов на основе фаговых векторов. Результатом этих манипуляций является выделение искомым индивидуальных клонов (бактериальные колонии или фаговые бляшки).

Все разновидности методов гибридизации, рассмотренные в этой главе, базируются на вышеупомянутых специфических взаимодействиях пар оснований комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Точное соответствие последовательностей гибридизующихся фрагментов приводит к быстрому образованию прочного комплекса, устойчивого к высокой температуре в ходе гибридизации и отмывки. Такие комплексы устойчивы также и при низкой концентрации соли. Комплексы, образующиеся при относительно более слабом соответствии структуры цепей, в «жестких» условиях (высокая температура или низкая концентрация соли) менее устойчивы. При этом гибридизация либо не происходит вовсе, либо гибридный комплекс разрушается при отмывке. Генные семейства, у которых наблюдается некоторая степень гомологии, можно выявить варьированием условий гибридизации и отмывки. Этот же подход применяется и при сравнении аналогичных генов разного видового происхождения.

Определение последовательности ДНК (секвенирование)

В настоящее время разработаны методы определения полной нуклеотидной последовательности ДНК (рис. 36.6). При решении этой задачи необходи-

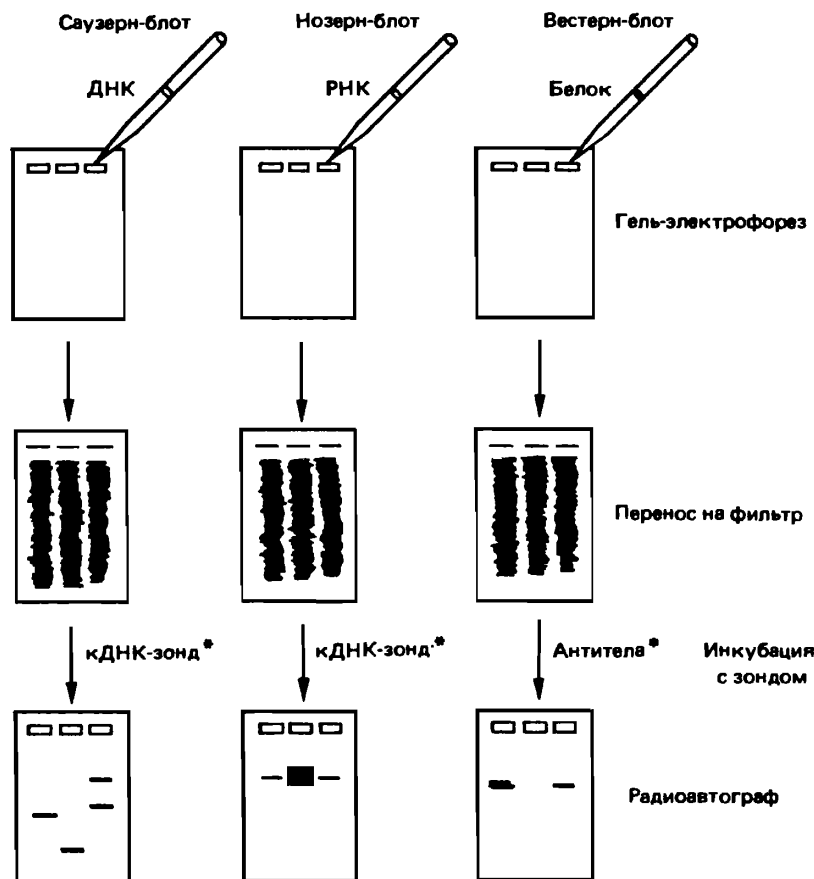


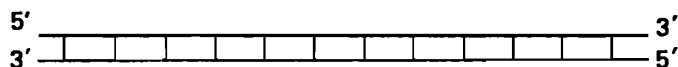
Рис. 36.5. Блоттинг-перенос. По методу Саузерна тотальную ДНК, выделенную из культуры клеток или ткани, обрабатывают одной или несколькими рестриктазами и полученную смесь фрагментов подвергают электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле. ДНК, несущая отрицательный заряд, мигрирует к аноду. Небольшие фрагменты движутся быстрее крупных. После окончания электрофореза разделенные фрагменты ДНК подвергают мягкой денатурации, инкубируя гель в растворе щелочи. На следующем этапе гель накладывают на нитроцеллюлозный фильтр. Фрагменты ДНК переносят на нитроцеллюлозу с помощью методических приемов, разработанных Саузерном, и фиксируют полученную нитроцеллюлозную реплику тепловой обработкой. Далее реплику инкубируют с меченым кДНК-зондом, гибридизующимся с соответствующим комплементарным фрагментом ДНК на нитроцеллюлозном фильтре. После интенсивной промывки фильтр помещают на рентгеновскую пленку. Фиксируемые на радиоавтографе сигналы соответствуют расположению фрагментов ДНК, комплементарных последовательности зонда. Метод Нозерн-блот (для анализа РНК) принципиально не отличается от метода переноса по Саузерну (Саузерн-блот анализа). Тотальную РНК подвергают электрофорезу. Сама процедура переноса РНК из геля на фильтр несколько отличается от метода Саузерна, поскольку молекулы РНК менее стабильны, чем молекулы ДНК. Метод Вестерн-блот применяется для выявления определенных белков с помощью специфических антител или других молекулярных зондов.

мо иметь большое количество идентичных молекул ДНК. Нарработку интересующей последовательности можно осуществить клонированием соответствующего фрагмента. Проиллюстрированный на рис. 36.6 метод секвенирования по Максаму-Гилберту основан на химическом расщеплении ДНК по определенному основанию. Другой ферментативный метод — метод Сэнгера — базируется на применении аналогов нуклеотидов, прерывающих синтез комплементарной цепи ДНК по одноцепочечной матрице в месте встраивания в цепь соответствующего аналога.

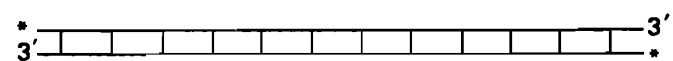
НЕКОТОРЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

Выделение специфического гена из целого генома требует методики, с помощью которой можно среди миллиона сходных элементов найти один, нужный исследователю. Идентификация регуляторной последовательности длиной в 10 нуклеотидов требует чувствительности, соответствующей выявлению 1 элемента из 3×10^8 . Серповидноклеточная анемия вызвана заменой только 1 основания в геноме, т. е.

Этап 1. Выделение популяции ($\sim 10^{12}$) идентичных молекул ДНК. (Идентичные молекулы, естественно, обладают идентичными концевыми участками, нуклеотидной последовательностью и длиной.) Очевидно, что молекулярное клонирование и рестрикция являются наиболее эффективными методами получения такой популяции молекул.



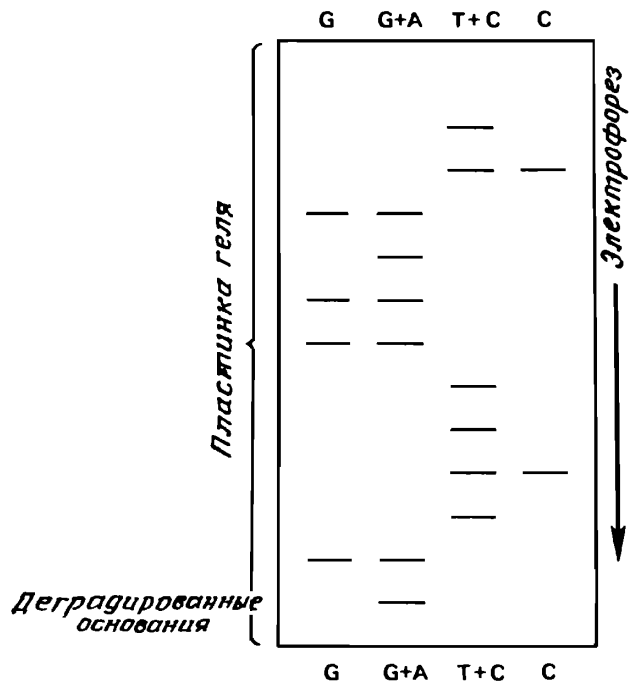
Этап 2. Введение радиоактивной метки в 5'-или 3'-концы каждой цепи.



Этап 3. Плавление ДНК и выделение популяций одноцепочечных ДНК.

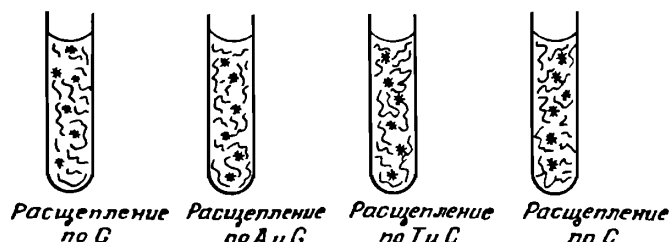


Этап 5. Разделение компонентов смеси по размеру с помощью электрофореза в пластине полиакриламидного геля. Короткие фрагменты мигрируют быстрее длинных. По завершении электрофореза гель помещают на рентгеновскую пленку, на которой проявляются полосы, соответствующие распределению по длинам меченых фрагментов в каждой реакционной смеси.



Отрезки в правой части рисунка представляют длину фрагментов расщепленной исходной последовательности ДНК. Зная, какое из оснований разрушается данным реагентом, можно определить последовательность расположения нуклеотидов в направлении от меченого конца к немеченому, считывая радиоавтограф снизу вверх. Правила комплементарных взаимодействий нуклеиновых оснований по Уотсону и Крику (A—T; G—C) позволяют восстановить также и последовательность комплементарной цепи.

Этап 4. Полученную ДНК распределяют по 4 пробиркам. В каждую пробирку добавляют химический реагент, специфически разрушающий 1 или 2 определенных нуклеиновых основания. В результате ДНК-цепь разрывается в месте нахождения данного нуклеотида. Это расщепление должно контролироваться так, чтобы оно было неполным и чтобы только часть цепей разрывалась по всем участкам, в которых находится разрушаемое основание.



Эта процедура генерирует смесь радиоактивно меченных (и множества немеченых) фрагментов одноцепочечной ДНК различной длины. Длина меченых фрагментов соответствует числу нуклеотидов между меченым концом цепи (*) и положением в ней нуклеинового основания, подвергшегося химической атаке.

Исходная последовательность

*—A—G—T—C—T—T—G—G—A—G—C—T—3'

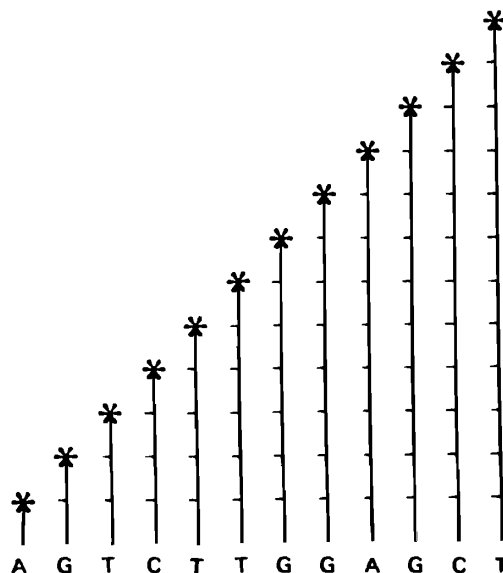


Рис. 36.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование ДНК) по Максому—Гилберту.

1 элемента из 3×10^9 . Достигнутый сегодня уровень развития методов генной инженерии достаточен для работы на таком уровне чувствительности.

Генетическое картирование

Под этим термином подразумевается совокупность подходов и методов, с помощью которых можно каждый ген отнести к определенной хромосоме, т.е. составить генетическую карту организма. Например, у человека благодаря применению двух основных методов — гибридизации соматических клеток и гибридизации *in situ* — установлена хромосомная локализация ряда генов, ответственных за некоторые заболевания. При гибридизации *in situ* препарат метафазных хромосом на поверхности стеклянной пластины инкубируют с радиоактивно меченым зондом. Точную область гибридизации определяют с помощью радиоавтографии (фотографическую эмульсию наносят непосредственно на пластинку). Образование зерен над гистологически идентифицированной хромосомой позволяет сделать вывод о принадлежности данного гена к конкретной хромосоме, а часто и к определенному ее участку. Некоторые гены человека, локализованные методом гибридизации *in situ*, представлены в табл. 36.5.

Нет сомнения, что в ближайшие годы карта генома человека станет полной: более того, обсуждается принципиальная возможность определения полной нуклеотидной последовательности человеческого генома. Однако уже сейчас, опираясь на имеющиеся данные, можно сделать ряд существенных заключений.

1. Гены, кодирующие белки со сходными функциями, могут находиться в разных хромосомах (α - и β -глобины).

2. Гены, относящиеся к одному семейству, также могут локализоваться в разных хромосомах (гормон роста и пролактин).

3. Гены, детерминирующие многие наследственные патологии, вызванные недостаточностью специ-

фических белков (в том числе сцепленные с X-хромосомой), действительно расположены в совершенно определенных сайтах хромосом.

Благодаря использованию клонированных фрагментов установлена хромосомная локализация многих генетических нарушений, для которых не удавалось выявить недостаточности по каким-либо специфическим белкам. К таким заболеваниям относятся: хорей Гентингтона (хромосома 4); муковисцидоз (хромосома 7); поликистозная нефропатия взрослых (хромосома 16); мышечная дистрофия Дюшенна (X-хромосома). Если область ДНК, в которой локализован дефект, имеет характерную структуру гена (рис. 36.1), то можно синтезировать этот ген, ввести в соответствующий вектор, добиться экспрессии и изучать функцию. Кроме того, можно синтезировать олигопептид, последовательность аминокислот в котором определяется согласно установленной открытой рамке считывания в кодирующей области. Антитела, полученные против этого пептида, представляют собой инструмент для выявления экспрессии данного пептида (или констатации ее отсутствия) у здоровых и больных людей.

Получение белков

Одно из практических применений технологии рекомбинантных ДНК — получение медико-биологической продукции. Генная инженерия дает возможность получать в больших количествах белки, которые не могут быть выделены применением обычных методов очистки (интерферон, плазминоген-активирующий фактор); кроме того, с помощью рекомбинантных ДНК можно нарабатывать специфические белки человека для замены используемых в клинической практике аналогичных белков животных (инсулин, гормон роста). Достоинства обеих технологий очевидны.

Первоначально цели генной инженерии ограничивались получением веществ (как правило, белков)

Таблица 36.5. Локализация генов человека

Ген	Хромосома	Заболевание
Инсулин	11p15	
Пролактин	6p23-q12	
Гормон роста	17q21-qter	Недостаточность гормона роста
α -Глобин	16p12-pter	α -Талассемия
β -Глобин	11p12	β -Талассемия, серповидные клетки
Аденозин-деаминаза	20q13-qter	Недостаточность аденозин-деаминазы
Фенилаланин-гидроксилаза	12q24	Фенилкетонурия
Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза	Xq26-q27	Синдром Леша—Найхана
Сегмент ДНК G8	4p	Хорей Гентингтона

В таблице представлены хромосомные локализации нескольких генов и болезни, вызванные нарушениями в продуктах этих генов. Первой (выделенной) цифрой или буквой указана хромосома. Остальные цифры и буквы детализируют внутрихромосомную локализацию по McKusick V. A. "Mendelian Inheritance in Man" 6th ed. Johns Hopkins Univ. Press. 1983.

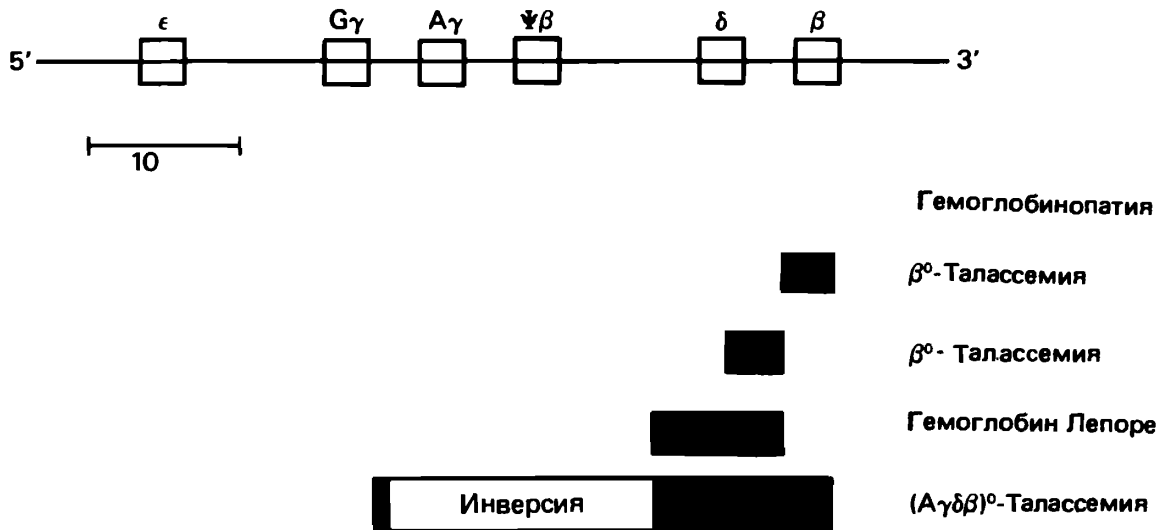


Рис. 36.7. Схема кластера генов β -глобина и некоторые генетические нарушения, приводящие к заболеваниям. Ген β -глобина расположен в 11-й хромосоме в непосредственной близости от двух генов γ -глобинов и гена δ -глобина. Семейство β -генов организовано в последовательность 5'- ξ -G γ -A γ - $\Psi\beta$ - δ - β -3'. Лocus ξ экспрессируется на ранних этапах жизни эмбриона ($\alpha_2\xi_2$). Гены γ экспрессируются на стадии плода, образуя фетальный гемоглобин (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). Гемоглобин взрослых состоит из HbA ($\alpha_2\beta_2$) или HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). Ген $\Psi\beta$ является псевдогеном; его последовательность гомологична последовательности β -гена, но включает мутации, препятствующие экспрессии. Делеции (затемненные участки) β -локуса вызывают β -талассемию (недостаточность или отсутствие [β°] β -глобина). Делеции δ - и β -генов приводят к образованию гемоглобина Лепоре (образуется только α -гемоглобин). Инверсия ($A_{\gamma\delta\beta}$) $^\circ$ этой области (незатемненный участок) полностью ингибирует функцию гена и обуславливает талассемию (тип III). Каждый тип талассемии характерен для определенных этнических групп. Так ($A_{\gamma\delta\beta}$) $^\circ$ -талассемия встречается в основном у выходцев из Индии. В этой области генома картированы и многие другие делеции, вызывающие определенный тип талассемии.

для лечения (инсулин), диагностики (тест на СПИД) и профилактики (вакцина против вируса гепатита В) болезней человека. В настоящее время представления о возможностях биотехнологии значительно расширились. Так, уже осуществляются попытки сконструировать растения, устойчивые к засухе и экстремальным температурам, а также более эффективно фиксирующие азот.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПРИРОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Нормальные генетические варианты

Существуют нормальные варианты последовательностей ДНК человека (**полиморфизм**). Такие варианты встречаются примерно 1 раз на 500 нуклеотидов или 10^7 раз на геном. Сюда входят делеции, вставки, а также единичные замены нуклеотидов. У здоровых людей эти изменения либо не затрагивают кодирующих последовательностей, либо происходят в функционально несущественных участках кодирующих областей ДНК. Полиморфизм структуры ДНК может быть прямо связан и с определенными заболеваниями. В последние годы феномен полиморфизма все чаще используется для идентификации соответствующих специфических генов.

Генетические изменения, вызывающие заболевания

На более ранних этапах развития медицинской генетики существовало представление, что большинство наследственных болезней вызвано точковыми мутациями, которые проявляются в функциональном несовершенстве соответствующего измененного белка. Роль точковых мутаций в возникновении наследственных патологий действительно велика, к этому следует добавить только, что генетические заболевания могут быть вызваны нарушениями на любой стадии процесса, представленного на рис. 36.1. Это положение хорошо иллюстрируется исследованием гена β -глобина, имеющего кластерную организацию и картированного на одиннадцатой хромосоме (рис. 36.7, 36.8). Биосинтез дефектного β -глобина служит причиной целого ряда заболеваний. Патологические симптомы могут быть связаны с нарушениями как в самом гене, так и в его окружении (табл. 36.6).

Точковые мутации

Классический пример заболевания, связанного с точковой мутацией,—серповидноклеточная анемия. Болезнь вызывается заменой всего лишь одного из 3×10^9 оснований, составляющих полный геном человека: в шестом кодоне β -глобинового гена

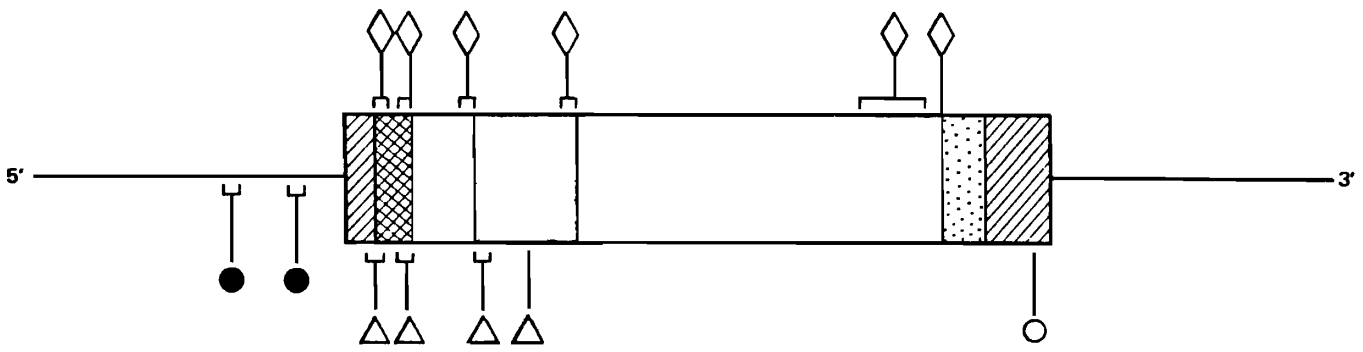


Рис. 36.8. Мутации гена β -глобина, обуславливающие β -талассемию. Ген представлен в ориентации 5' $\rightarrow$ 3'. Заштрихованы нетранслируемые 5'- и 3'-области. При чтении в направлении 5' $\rightarrow$ 3' затемненные участки — экзоны 1–3, светлые участки — интроны 1 и 2. Мутации, затрагивающие контроль транскрипции (●), локализованы в 5'-фланкирующей области. Идентифицированы отмеченные на рисунке некоторые *nonsense*-мутации (△), мутации, влияющие на процессинг (◇) и расщепление РНК (○). В некоторых областях выявлено большое количество мутаций. Такие участки помечены квадратными скобками.

Таблица 36.6. Структурные изменения в гене β -глобина

Изменение	Затронутая функция	Заболевание
Точковые мутации	Сворачивание белковой глобулы	Серповидноклеточная анемия
	Контроль транскрипции	β -Талассемия
	Сдвиг рамки и мутации	β -Талассемия
Делеция	Образование мРНК	β^0 -Талассемия Гемоглобин Лепоре
Перестройка	Образование мРНК	β -Талассемия тип III

аденин заменяется на тимин. С измененного кодона считывается не глутаминовая кислота, а валин, что приводит к структурным нарушениям молекулы β -глобина. Некоторые точковые мутации вызывают снижение либо полную остановку синтеза β -глобина. Результатом таких нарушений является β -талассемия (талассемии — класс заболеваний, связанных с нарушениями синтеза глобина). На рис. 36.8 представлены позиции точковых мутаций, нарушающих какую-либо из многочисленных стадий процесса образования нормальной β -глобиновой мРНК и, следовательно, вызывающих β -талассемию.

Делеции, вставки и перестройки ДНК

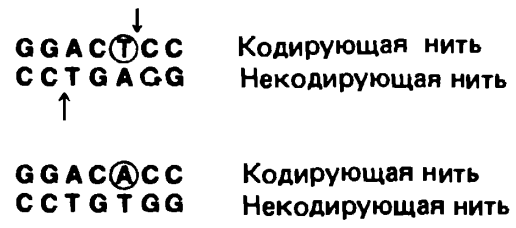
Исследования геномов бактерий, вирусов, дрожжей и дрозофилы показывают, что отдельные участки ДНК могут менять свое положение в геноме. Утрата функционально важного участка ДНК, перестановка фрагментов ДНК внутри гена, вставка в его кодирующий или регуляторный участок, как правило, вызывают изменения в уровне экспрессии данного гена, приводящие к заболеванию. Молекулярный анализ β -талассемии выявляет большое число подобных случаев (особенно делеций) Создае-

тся впечатление, что кластеры глобиновых генов весьма подвержены повреждениям. Делеции в α -глобиновом кластере, локализованном в 16-й хромосоме, приводят к α -талассемии. Для большинства таких делеций отмечена четкая взаимосвязь с этническим происхождением. Жители севера Европы, филиппинцы, негроиды и представители средиземноморских популяций имеют нарушения различного типа, но все они ведут к утрате гемоглобина А и α -талассемии.

Подобный анализ можно провести и для многих других заболеваний. Обычно точковые мутации идентифицируют путем определения нуклеотидной последовательности изучаемого гена, но, если мутация затрагивает сайт рестрикции, для ее выявления достаточно рестрикционного анализа. Делеции и вставки ДНК-фрагментов больших чем 50 пар оснований определяют методом блоттинга по Саузерну.

Анализ родословных

На примере серповидноклеточной анемии можно убедиться в том, насколько эффективен генно-инженерный подход при изучении болезней человека. Замена основания в кодирующей цепи ДНК гена гемоглобина приводит к изменению последовательности, соответствующей шестому кодону:



При этом исчезает сайт рестриктазы *Mst* II (CCT-NAGG; стрелками указаны места расщепления, см. табл. 36.1). Другие *Mst* II-сайты (рис. 36.9) остаются

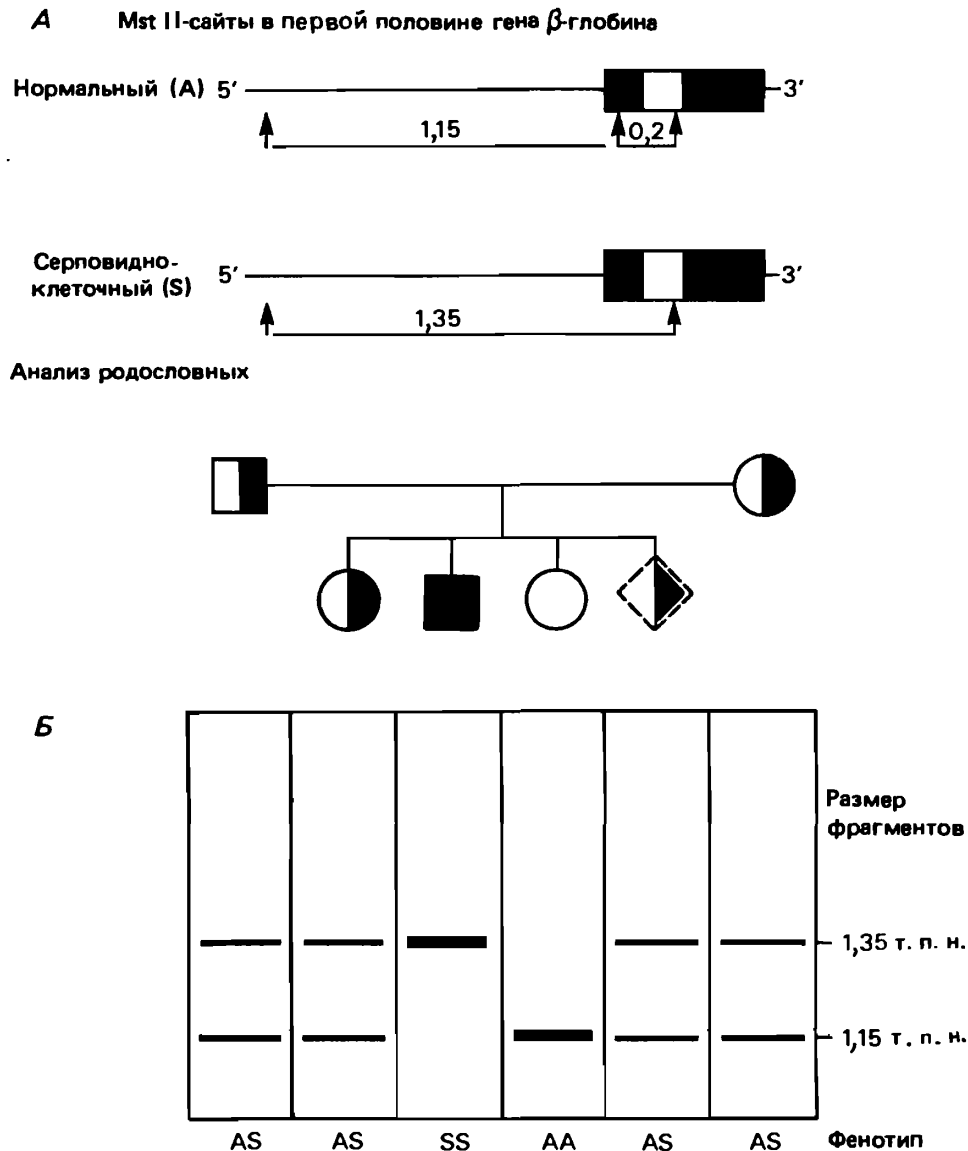


Рис. 36.9. Анализ родословных в случае серповидноклеточной анемии. В верхней части рисунка (A) показано начало гена β -глобина с сайтами расщепления рестриктазой Mst II (↑) у нормального (A) и серповидноклеточного (S) β -глобина. В результате расщепления ДНК здоровых индивидуумов рестриктазой Mst II образуются специфические фрагменты ДНК размером 1,15 и 0,2 т. п. н. Замена одного основания у больных серповидноклеточной анемией приводит к потере одного из трех Mst II-сайтов в области гена и соответственно к появлению только одного специфического Mst II-фрагмента размером 1,35 т. п. н. Это различие в длине легко обнаруживается методом Саузерн-блоттинга (Б). (На данном рисунке положение фрагмента длиной 0,2 т. п. н. не указано.) Анализ родословных демонстрирует три возможных генотипа. AA-норма (○), AS-гетерозигота по гену серповидноклеточности (◐◑) и SS-гомозигота по гену серповидных эритроцитов (■). Этот подход позволяет осуществлять пренатальную диагностику заболевания серповидноклеточной анемией и выявлять гетерозиготных носителей соответствующего гена (◐◑).

неизменными и могут быть расщеплены этой рестриктазой. Поэтому Саузерн-блоттинг обработанных ферментом образцов ДНК нормальных (AA), гетерозиготных (AS) и гомозиготных (SS) пациентов дает три типа распределения фрагментов (рис. 36.9). Этот пример показывает, как на уровне ДНК можно провести анализ родословной с использованием описываемых в этой главе принципов и подходов. Такой анализ весьма эффективен при изучении ряда генетических заболеваний, вызванных делециями, вставками и (реже) точковыми мутациями с изменением

сайтов рестрикции (как в только что рассмотренном примере).

Пренатальная диагностика

Дородовая диагностика наследственных заболеваний возможна, если известна природа генетического нарушения и имеется соответствующий зонд. Анализ по Саузерну можно подвергнуть ДНК клеток, собранных из 10 мл амниотической жидкости (или полученных с помощью биопсии ворсинок хо-

риона). Плод с рестрикционным вариантом AA (рис. 36.9) нормален и не является носителем серповидноклеточной анемии. В случае варианта SS можно с уверенностью предсказать развитие болезни. Уже сейчас существуют зонды для подобного анализа многих заболеваний.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Изменения в последовательностях ДНК, вызванные описанными выше причинами, могут обуславливать изменения в расположении сайтов рестрикции и поэтому сказываться на длине рестрикционных фрагментов. Устойчивое наследуемое изменение в распределении длин рестрикционных фрагментов (наблюдаемое для более чем 1% численности популяции) называют **полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)**. Этот феномен может быть результатом либо точковых замен (серповидноклеточная анемия), либо делеций и вставок (талассемия). В последнее время ПДРФ стали с успехом использовать в диагностических целях. Рестрикционный полиморфизм обнаружен как в последовательностях известных генов, так и в участках ДНК с неизвестной функцией. ПДРФ может нарушать биологическую функцию, а может и не иметь никаких биологических последствий; в любом случае соответствующие измененные локусы наследуются в соответствии с законами Менделя. Основная область использования этого феномена (а известно уже около 350 случаев ПДРФ)—диагностика наследственных заболеваний, функциональная природа которых неизвестна. Вначале с помощью ПДРФ устанавливают группу сцепления, а затем методом последовательной гибридизации определяют локус, ответственный за заболевание. Согласно методу последовательной гибридизации, фрагмент, представ-

ляющий один из концов длинной цепи ДНК, используют в качестве зонда для выявления другого фрагмента, который перекрывается с первым и в то же время выходит за его пределы. Применение этого подхода, называемого «прогулка по хромосоме» (рис. 36.10), обеспечивает «передвижение» по цепи ДНК вплоть до интересующей области. Направление передвижения контролируется по рестрикционной карте. «Прогулка по хромосоме» особенно удобна при изучении X-сцепленных болезней, поскольку в данном случае экспрессируется только один из двух аллелей. 20% выявленных случаев ПДРФ относятся именно к X-хромосоме, и именно для нее составлена практически полная карта. Используя феномен ПДРФ, можно локализовать ген любой X-сцепленной болезни (например, мышечной дистрофии Дюшенна). С помощью ПДРФ удалось установить, что генетический дефект при хорее Гентингтона затрагивает конец короткого плеча хромосомы 4, а ген, вызывающий поликистоз почек, сцеплен с локусом α -глобина на хромосоме 16.

Генная терапия

Заболевания, вызванные функциональной недостаточностью продукта того или иного гена, можно лечить с помощью «заместительной» терапии (табл. 36.5). Стратегия подхода заключается в клонировании гена (например, гена, кодирующего аденозиндеаминазу) в векторе, способном включиться в геном клетки хозяина. Весьма перспективным представляется использование для этого предшественников клеток костного мозга. Можно надеяться, что такие клетки «приживутся» и будут размножаться, синтезируя трансгенный продукт. Конечно, ген, перенесенный в соматические клетки, потомкам не передается.

В последнее время ведутся интенсивные поиски

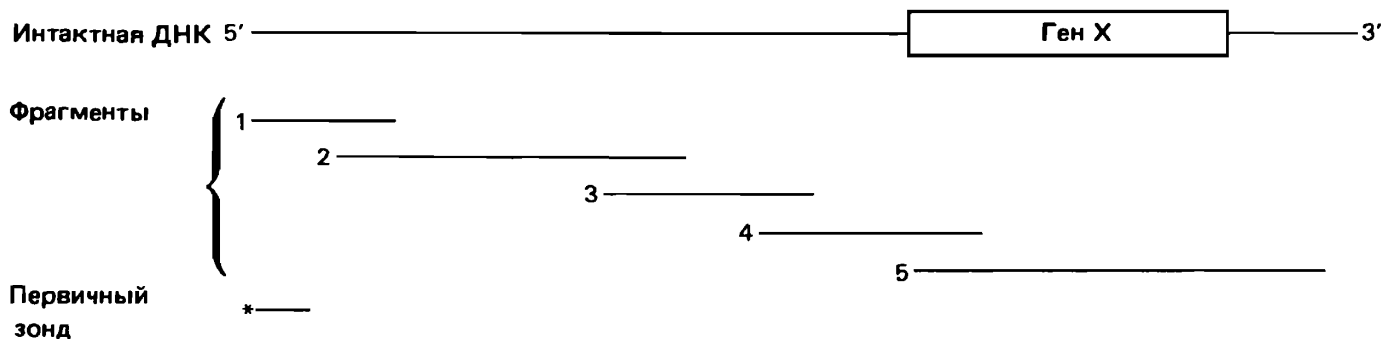


Рис. 36.10. Метод «прогулка по хромосоме». Пусть необходимо обнаружить ген X в рамках протяженного фрагмента ДНК. Точное положение гена неизвестно, однако имеется первичный зонд (*), соответствующий некоему участку генома (показан в данном случае на 5'-конце исследуемого фрагмента ДНК). Кроме того, имеется библиотека перекрывающихся фрагментов генома. (Для упрощения на рисунке изображены только пять фрагментов.) Первичный зонд гибридизуется только с клонми, содержащими фрагмент 1. Этот фрагмент можно использовать далее в качестве зонда для выявления фрагмента 2. Процедура последовательной гибридизации повторяется вплоть до обнаружения фрагмента 4, который гибридизуется с фрагментом 5, содержащим искомым ген X.

путей генно-инженерного воздействия на половые клетки. Соответствующие эксперименты проводят на лабораторных животных. Гены, инъецированные в оплодотворенные яйцеклетки мыши, в некоторых случаях встраиваются в геном. Полученных **трансгенных животных** используют для изучения характера экспрессии генов в разных тканях, а также для выявления специфических генов онтогенеза. Трансгенный подход недавно с успехом был использован для коррекции генетического дефекта у мышей. В оплодотворенные яйцеклетки мыши с наследственным гипогонадизмом (гл. 55) инъецировали ДНК, содержащую кодирующую последовательность предшественника гонадолиберина. У части развившихся из таких яйцеклеток мышей этот ген нормально экспрессировался. Фенотипически эти мыши были нормальными во всех отношениях. Их потомство также не проявляло недостаточности по гонадолиберину. Приведенный пример свидетельствует о принципиальной возможности экспрессии трансгенов в соматических клетках и их передачи потомству.

СЛОВАРЬ-СПРАВОЧНИК

Бактериофаг. Вирус, инфицирующий бактерии.

Библиотека. Коллекция клонированных фрагментов, представляющих какой-либо геном. Различают геномные библиотеки (включают последовательности и интронов, и экзонов) и кДНК-библиотеки (только экзоны).

Вектор. Плазмида или бактериофаг, в которые может быть введена чужеродная ДНК с целью клонирования.

Вестерн-блоттинг. Метод переноса белков на нитроцеллюлозный фильтр с последующей идентификацией интересующего исследователя белка с помощью соответствующего зонда (например, антител).

Вставка. Дополнительный фрагмент ДНК, который вводят в исходную молекулу методами генной инженерии.

Зонд (проба). Молекула, используемая для выявления специфических фрагментов ДНК, РНК или белка при блот-анализе. (Например, при скрининге геномных библиотек). Зондами могут служить молекулы кДНК, синтетические олигонуклеотиды или специфические антитела.

Интрон. Участок последовательности гена, который транскрибируется, но удаляется из структуры мРНК-предшественника до начала трансляции (не входит в состав зрелой мРНК).

кДНК. Одноцепочечная молекула ДНК, комплементарная мРНК и синтезируемая на ней как на матрице с помощью обратной транскриптазы.

Клон. Большое число клеток (или молекул), полностью идентичных исходной родительской клетке (или молекуле).

Космида. Плазмида, в которую введен специфический сайт фага λ (*cos*-сайт), необходимый для упаковки *in vitro* плазмидной ДНК.

Лигирование. Катализируемое ферментом соединение (сшивка) двух фрагментов ДНК или РНК в один путем образования фосфодиэфирной связи. Соответствующие ферменты называются ДНК-(или РНК)-лигазами.

Липкие концы ДНК. Комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие на противоположных концах двухцепочечной молекулы.

Ник-трансляция. Метод введения метки в ДНК; основан на том, что ДНК-полимераза *Escherichia coli* способна осуществлять деградацию одной из цепей ДНК, в которой до этого был сделан разрез («ник»), и тут же строить новую цепь, используя неповрежденную в качестве матрицы. Если в реакционную смесь ввести меченые нуклеозидтрифосфаты, то вновь образуемая цепь окажется радиоактивной, что дает возможность ее использования в качестве зонда.

Нозерн-блоттинг. Метод переноса РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр, на котором положение определенной молекулы РНК выявляют с помощью гибридизации с радиоактивным зондом.

Обратная транскрипция. РНК-зависимый синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой.

Палиндром. Участок двухцепочечной ДНК, в которой последовательность одной из цепей идентична последовательности другой цепи, прочитанной в обратном направлении.

Плазмида. Небольшая экстрахромосомная кольцевая молекула ДНК, реплицирующаяся независимо от хромосомы хозяина.

Псевдоген. Функционально неактивный участок ДНК, возникший в результате мутаций в родительском гене.

Радиоавтография. Выявление радиоактивно меченых молекул (ДНК, РНК или белков), основанное на их способности воздействовать на фотопленку.

Рекомбинантная ДНК. Молекула ДНК со встроенным участком чужеродной ДНК.

Рестриктаза. Эндонуклеаза, расщепляющая обе цепи ДНК в строго определенных сайтах со специфической последовательностью оснований.

Саузерн-блоттинг. Метод переноса фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр с последующей гибридизацией с меченым зондом.

Сигнал. Конечный этап визуализации определенного фрагмента ДНК (клона). Например, при радиоавтографии — темное пятно на рентгеновской пленке, соответствующее месту нахождения гибридного дуплекса, одна из цепей которого является радиоактивно меченым зондом.

Сплайсинг. Завершающий этап процессинга РНК — соединение экзонов с образованием зрелой мРНК.

Тандем. Множество копий одной и той же последовательности, соединенных в протяженную линейную молекулу.

Терминальная трансфераза. Фермент, присоединяющий нуклеотиды одного типа к 3'-концам молекулы ДНК.

Трансгенный организм. Организм, развившийся из зародышевой клетки, в ядро которой с помощью инъекции была введена чужеродная ДНК.

Трансляция. мРНК-зависимый синтез белка.

Транскрипция. ДНК-зависимый синтез РНК.

Тупые концы ДНК. Концы двухцепочечной ДНК, не имеющие выступающих одноцепочечных 3'- или 5'-участков.

Химерная молекула. Молекула (ДНК, РНК, белок), состоящая из фрагментов, которые имеют разное происхождение.

Шпилька. Двухцепочечная область (элемент вторичной структуры), образованная за счет спаривания оснований соседних комплементарных участков последовательности, которые расположены в одной и той же цепи ДНК или РНК.

Экзон. Кодированная часть последовательности гена; представлена в зрелой мРНК.

Экзонуклеаза. Фермент, отщепляющий нуклеотиды с 3'- или 5'-конца молекулы ДНК или РНК.

Эндонуклеаза. Фермент, расщепляющий фосфо-

диэфирные связи во внутренних областях цепей ДНК или РНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Beaudet A. L.* Bibliography of cloned human and other selected DNAs, *Am. J. Hum. Genet.*, 1985, **37**, 386.
- DNA in medicine, *Lancet*, 1984, **2**, 853, 908, 966, 1022, 1086, 1138, 1194, 1257, 1329, 1380, 1440.
- Gusella J. F.* Recombinant DNA techniques in the diagnosis and treatment of inherited disorders, *J. Clin. Invest.*, 1986, **77**, 1723.
- Kan Y. W. et al.* Pages 275—283. In: *Thalassemia: Recent Advances in Detection and Treatment*, Cao A., Carcassi U., Rowley P. (eds.), AR Liss, 1982.
- Lewin B.* *Genes II*, Wiley, 1985.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
- Martin J. B., Gusella J. F.* Huntington's disease: Pathogenesis and management, *N. Engl. J. Med.*, 1986, **315**, 1267.
- Maxam A. M.*, Sequencing the DNA of recombinant chromosomes, *Fed. Proc.*, 1980, **39**, 2830.
- Orkin S. H. et al.* Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis: Application to prenatal diagnosis, *N. Engl. J. Med.*, 1982, **307**, 32.
- Watson J. D., Tooze J., Kurtz D. T.* *Recombinant DNA: A short Course*, Freeman, 1983.
- Weatherall D. J.* *The New Genetics and Clinical Practice*, 2nd ed., Oxford Univ. Press, 1986.
- Yuan R.* Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases, *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 285.

Структура и функция нуклеиновых кислот

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

К числу важнейших научных событий нашего века следует отнести открытие того факта, что генетическая информация кодируется полимерной молекулой ДНК, образованной лишь четырьмя типами мономерных единиц. Именно ДНК служит химической основой наследственности. Ее молекула содержит в своей структуре множество генов. Гены функционируют не автономно: их репликация и транскрипция строго контролируются петлями обратной связи, в которых ключевая роль принадлежит продуктам экспрессии. Знание структуры и функции нуклеиновых кислот необходимо для понимания сути генетических процессов, происходящих в клетке.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Как уже говорилось, химическая основа наследственности заключена в ДНК, следовательно, причиной наследственных болезней является изменение ее структуры. Установлены основные пути передачи информации (ДНК направляет синтез РНК, которая в свою очередь определяет синтез белка). Знание этих механизмов позволяет ответить на вопрос, что такое нормальная физиология и патофизиология заболевания на молекулярном уровне.

ДНК

В 1944 г. в экспериментах, проведенных Эвери, Маклеодом и Маккарти, было продемонстрировано, что способность к образованию капсулы у мутантного бескапсульного штамма пневмококков может быть восстановлена посредством введения в его клетки очищенной ДНК пневмококков, способных к синтезу капсулы. Авторы назвали агент (ДНК), ответственный за это изменение, — «трансформирующим фактором». Очень скоро метод трансформации стал широко использоваться в генетических исследованиях. Относительно недавно были проведены эксперименты, в которых реци-

пиентами служили клетки дрожжей, млекопитающих, эмбрионы грызунов и насекомых, а донором генетической информации — клонированная ДНК.

Химические свойства ДНК

Химическая природа мономерных единиц, образующих ДНК (дезоксиаденилат, дезоксицитидилат, дезоксигуанилат и тимидилат), описана в гл. 34. Момеры полимеризуются с образованием 3', 5'-фосфодиэфирных связей, формируя одиночную цепь ДНК (рис. 37. 1). Информация в ДНК записана в виде определенной последовательности пуриновых и пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов.

Полимерная молекула ДНК, как видно из рисунка, полярна. На одном конце расположена 5'-гидроксил-(либо фосфатная группа), на другом 3'-фосфат-(либо гидроксильная группа). Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа ДНК и правиле Чаргаффа, согласно которому в молекуле ДНК содержание остатков дезоксиаденозина (А) равно содержанию тимидина (Т), а содержание дезоксигуанозина (G) равно содержанию дезоксицитозина (С), Уотсон, Крик и Уилкинс предложили в начале 50-х годов модель двухспиральной структуры ДНК. Модель В-формы ДНК изображена на рис. 37.2. Две цепи этой правозакрученной, двухспиральной молекулы удерживаются друг возле друга за счет водородных связей, образующихся между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Образование комплементарных пар строго специфично. А всегда спаривается с Т, а G — с С (рис. 37. 3).

В двухцепочечной молекуле ограничения, обусловленные заторможенностью вращения вокруг фосфодиэфирной связи, преимущественная «анти»-конфигурация гликозидных связей (рис. 34.9) и преобладающие таутомерные формы четырех оснований (А, G, Т и С, рис. 34.3) создают условия, в которых А может образовать прочную пару только с Т, а G только с С (рис. 37.3). Именно этим и объясняются правила Чаргаффа (А = Т; G = С). Две цепи двойной спирали, будучи полярными, являются и антипа-

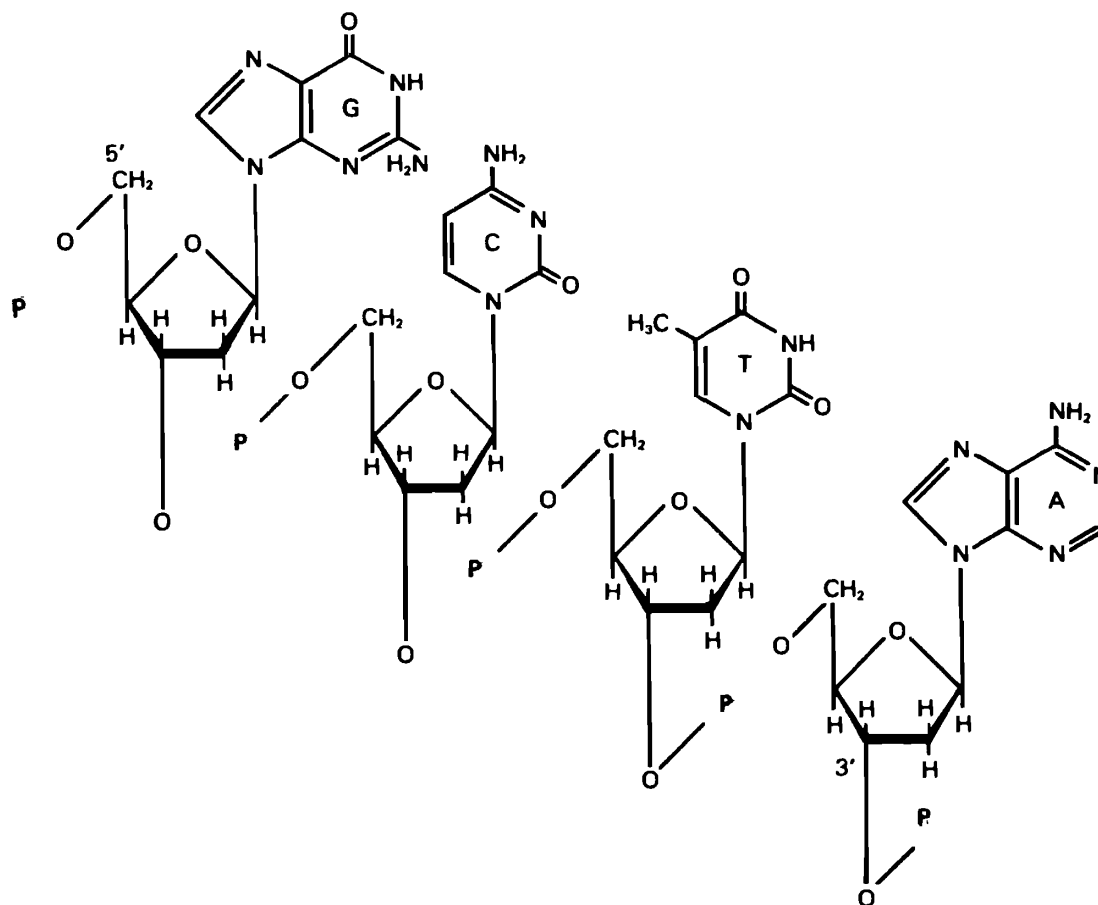


Рис. 37.1. Фрагмент структуры молекулы ДНК, в которой пуриновые и пиримидиновые основания аденин (А), тимин (Т), цитозин (С) и гуанин (G) удерживаются вместе фосфодиэфирным остовом, соединяющим 2'-деоксирибозильные остатки, связанные N-гликозидной связью с соответствующими нуклеиновыми основаниями. Обратите внимание: фосфодиэфирный остов единичной цепи ДНК обладает «полярностью» (т. е. в нем можно выделить определенное направление, например 5'→3').

параллельными, т. е. направление одной цепи 5' → 3', а другой 3' → 5'. Такая картина напоминает две параллельные улицы с односторонним движением, направленным в противоположные стороны. Одну из двух комплементарных цепей ДНК, содержащую информацию о структуре определенного гена в виде специфической последовательности нуклеотидов, обычно называют **кодирующей** (или **матричной**); другая, комплементарная ей цепь носит название **некодирующей**.

Как показано на рис. 37.3, между остатками дезоксигуанозина и дезоксицитидина образуются три водородные связи, а между тимидином и дезоксиаденозином — только две. Поэтому связь G—C прочнее примерно на 50%. Этим обстоятельством, а также стэкинг-взаимодействиями и можно объяснить более высокую температуру денатурации (плавления) G—C-богатых областей ДНК.

Структура ДНК

ДНК может формировать несколько типов двойных спиралей. В настоящее время уже известно шесть форм (от А до Е и Z-форма). Большая часть структурных вариантов ДНК может существовать только в строго контролируемых условиях эксперимента. Эти варианты различаются 1) числом пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали; 2) расстоянием между плоскостями пар оснований и углом, который они образуют с осью спирали; 3) диаметром спирали; 4) направленностью (правая, левая) двойной спирали (табл. 37. 1).

Некоторые из этих форм переходят друг в друга при изменении концентрации соли и степени гидратации. Не исключено, что переходы между различными структурными формами ДНК происходят и *in vivo*.

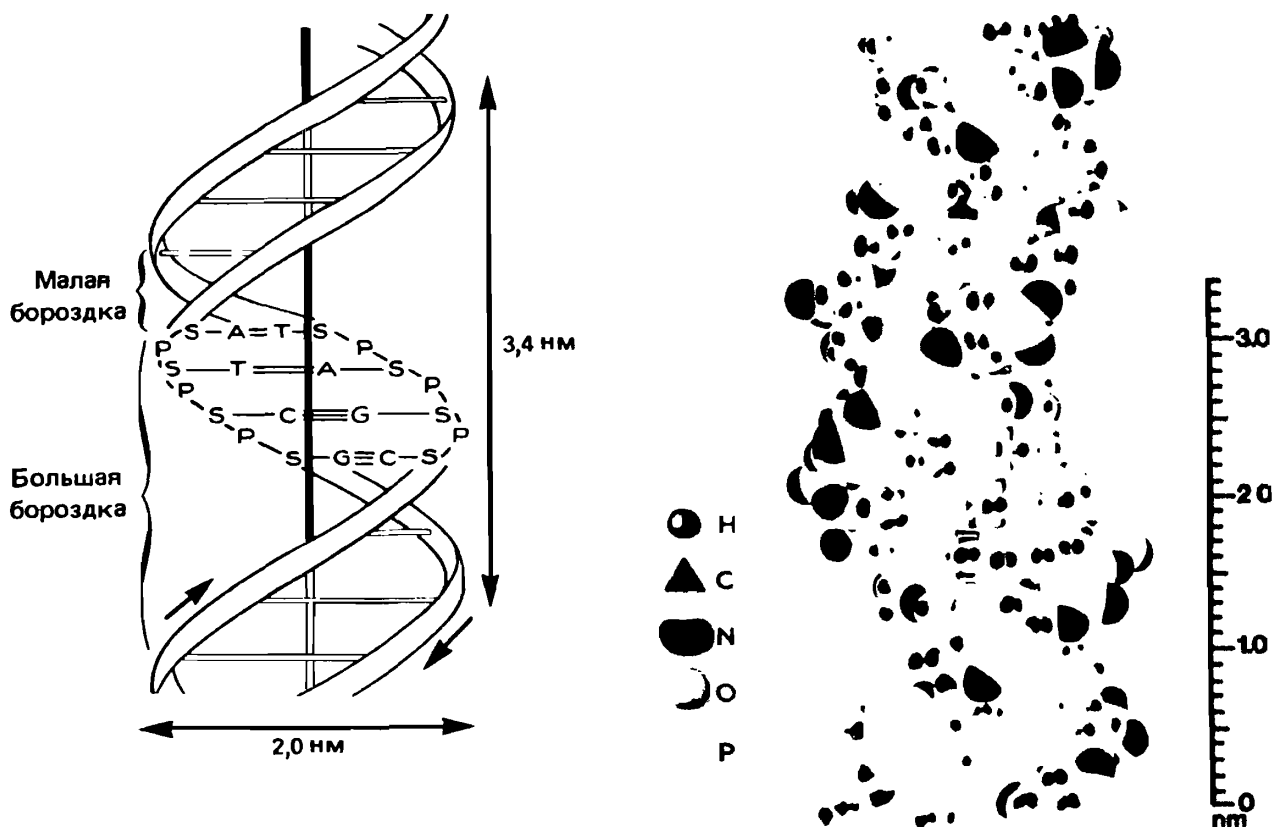


Рис. 37.2. Модель двухспиральной структуры В-формы по Уотсону и Крику. *Слева:* Схематическое изображение молекулы (А — аденин, С — цитозин, G — гуанин, Т — тимин, Р — фосфат, S — сахар [дезоксирибоза]). *Справа:* модель структуры ДНК. (Photograph from J. D. Watson, Molecular biology of the Gene 3rd ed. Copyright 1976, 1970, 1965 by W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif.)

При физиологических условиях (низкая концентрация соли, высокая степень гидратации) доминирующим структурным типом ДНК является **В-форма**. Шаг спирали такой молекулы равен 3,4 нм. Виток ДНК можно представить в виде двух скрученных стопок «монет», по 10 в каждой. Стопки удерживаются водородными связями между двумя противолежащими «монетами» стопок, и «обмотаны» двумя лентами фосфодиэфирного остова, закрученными в правую спираль. В условиях менее высокой гидратации и при более высоком содержании ионов Na^+ или K^+ возникает несколько иная структура — так называемая **А-форма**. Эта правоспиральная конформация имеет больший диаметр спирали, чем В-форма, и большее число пар оснований на виток. Она сходна со структурой, характерной для двухцепочечной РНК или для РНК—ДНК-дуплексов. Формы С—Е также правоспиральные, их образование можно наблюдать только в специальных экспериментах, и, по-видимому, они не существуют *in vivo*.

Z-форма ДНК представляет собой левозакрученную двойную спираль, в которой фосфодиэфирный остов расположен зигзагообразно вдоль оси молекулы. Отсюда и название молекулы **Z** (zigzag)-ДНК.

Z-ДНК — наименее скрученная (12 пар оснований на виток) и наиболее тонкая из известных в природе, она обладает только одним желобком (см. ниже). **Z-ДНК** выявляют в повторяющихся последовательностях чередующихся пуриновых и пиримидиновых дезоксинуклеотидов (GC или AC) при наличии ряда других стабилизирующих факторов. К ним относятся: 1) высокая концентрация соли или наличие специфических катионов, таких, как спермин и спермидин; 2) высокое содержание отрицательных супервитков в молекуле ДНК (см. гл. 38); 3) связывание **Z-ДНК**-специфичных белков; 4) метилирование атома углерода-5 некоторых остатков дезоксицитидина.

ДНК в **Z-форме** может участвовать в регуляции экспрессии генов как близко расположенных, так и существенно удаленных от **Z-участка**. Некоторые белки, связывающиеся в большой или малой бороздках **В-формы** ДНК, вероятно, не способны связываться с **Z-формой** ДНК. Кроме того, реверсия участка ДНК из **Z-формы** в **В-форму** ДНК, которая происходит, например, в результате потери метильных групп 5-метилдезоксицитидином, может влиять на торсионный статус участков ДНК, расположенных на значительном расстоянии от области реверсии.

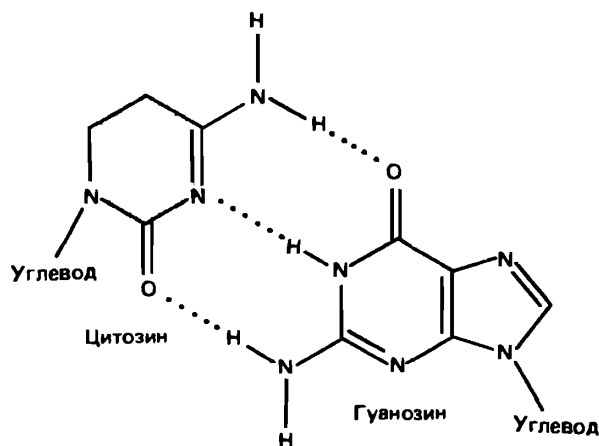
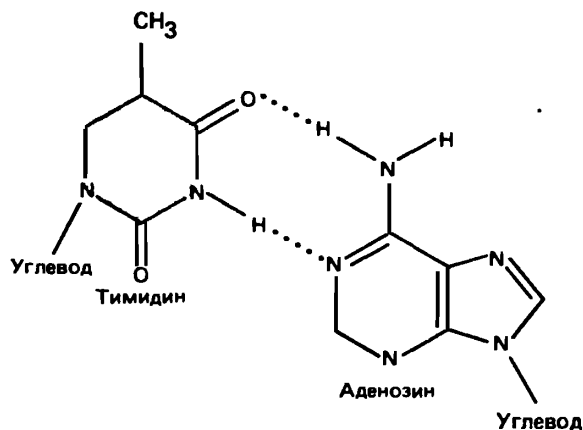


Рис. 37.3. Образование двух водородных связей (пунктирная линия) между основаниями дезоксиаденозина и тимидина (вверху) и трех водородных связей между основаниями дезоксигуанозина и дезоцитидина (внизу). В ДНК углеводным остатком является 2-дезоксирибоза, в РНК D-рибоза.

Торсионное скручивание—раскручивание ДНК так же, как и метилирование дезоксицитидина, вероятно, влияет на активность генов (см. ниже).

Наличие Z-ДНК в хромосомах *Drosophila* (плодовая мушка) было показано с применением антител специфичных к Z-форме ДНК. В ДНК человека имеются участки, потенциально способные перехо-

дить в Z-форму; они диспергированы в геноме. Есть основания предполагать, что и в клетках человека могут реализоваться условия, необходимые для стабилизации Z-формы.

Денатурация (плавление) ДНК

Двухспиральную структуру ДНК можно «расплавить» в растворе, повышая температуру или понижая концентрацию соли. При плавлении происходит не только расхождение цепей ДНК, но и нарушается система стэкинг-взаимодействий нуклеиновых оснований внутри данной цепи. Фосфодиэфирные связи при этом не разрываются. Денатурация ДНК сопровождается усилением оптического поглощения пуриновых и пиримидиновых оснований. Это явление называют **гиперхромным эффектом** денатурации ДНК. При денатурации исчезает также высокая вязкость, присущая растворам нативной ДНК, волокнообразная структура которой обусловлена как стэкинг-взаимодействиями нуклеиновых оснований в каждой цепи, так и комплементарными взаимодействиями между двумя цепями.

Разделение цепей данной молекулы ДНК происходит в пределах определенного интервала температур. Средняя точка этого интервала называется **температурой плавления ДНК** или T_m . Значение T_m зависит от нуклеотидного состава ДНК и концентрации соли в растворе. Молекулы ДНК, обогащенные G—C-парами (они связаны тремя водородными мостиками), «плавятся» при более высокой температуре, чем A—T-богатые молекулы (пары A—T связаны двумя водородными мостиками). Десятикратное увеличение концентрации моновалентных катионов увеличивает T_m на 16,6°С. Формамид, обычно используемый в экспериментах с рекомбинантной ДНК, дестабилизирует водородные связи между основаниями, тем самым снижая T_m . Это позволяет цепям ДНК или ДНК—РНК-гибрида расходиться при более низкой T_m , что уменьшает вероятность разрыва индивидуальных цепей, происходящего при высокой температуре.

Бороздки в структуре ДНК

При изучении модели, изображенной на рис. 37.2, можно обратить внимание на наличие в структуре ДНК **большой и малой бороздок**, закрученных вокруг оси молекулы параллельно фосфодиэфирному остову. В этих бороздках белки могут специфически взаимодействовать с определенными атомами нуклеиновых оснований, а значит, и «узнавать» конкретные нуклеотидные последовательности, не нарушая комплементарных взаимодействий в структуре двойной спирали. Как будет показано в гл. 39 и 41, именно за счет таких взаимодействий регуляторные белки могут осуществлять контроль экспрессии генов.

Таблица 37.1. Характеристика некоторых типов структур ДНК

Тип	Закрученность спирали	Число пар оснований на виток	Расстояние между плоскостями оснований	Диаметр спирали
A	Правая	11	0,256 нм	2,3 нм
B	Правая	10	0,338 нм	1,9 нм
Z	Левая	12	0,371 нм	1,8 нм

Релаксированная и суперспиральная ДНК

ДНК некоторых организмов, таких, как бактерии, бактериофаги и многие ДНК-содержащие вирусы животных, представляет собой замкнутую кольцевую структуру. Конечно, такая структура не нарушает полярность молекул, но в ней исчезают свободные 3'- и 5'-гидроксильные и фосфорильные группы. Замкнутые кольца могут существовать в релаксированной или суперспиральной формах. Суперспиральность проявляется тогда, когда замкнутое кольцо сворачивается вокруг собственной оси или когда скручивается участок линейной ДНК, концы которой зафиксированы. Этот требующий энергии процесс приводит к появлению внутримолекулярного напряжения структуры. При увеличении числа супервитков внутреннее (торсионное) напряжение возрастает (проверьте это на обычной резиновой ленте). Супервитки в ДНК, образованные за счет скручивания против часовой стрелки (в направлении, обратном закручиванию правосторонней двойной спирали В-формы ДНК), называются отрицательными. В некотором смысле можно считать, что энергия, необходимая для достижения такого структурного состояния, запасается в обычных (неотрицательных) супервитках. Энергия перехода молекулы ДНК к другому типу надмолекулярной структуры может понижаться за счет образования участков отрицательного скручивания. Один из таких переходов — разделение цепей при подготовке к репликации и транскрипции. Вот почему суперспирализация ДНК весьма выгодна в биологических системах. Ферменты, катализирующие топологические изменения молекулы ДНК, получили название **топомераз**. Наиболее изучена из них — **бактериальная гираз**, инициирующая образование отрицательных супервитков.

Функция ДНК

Генетическая информация, закодированная в последовательности нуклеотидов, служит двум целям. Во-первых, она необходима для синтеза белковых молекул, во-вторых, обеспечивает передачу самой себя в ряду клеточных поколений и поколений организмов. Обе функции основаны на том, что молекула ДНК служит матрицей; в первом случае для **транскрипции** — перекодирования информации в структуру молекул РНК и во втором для **репликации** — копирования информации в дочерних молекулах ДНК.

Комплементарность цепей двойной спирали Уотсона и Крика предполагает **полуконсервативный способ репликации ДНК**. Это означает, что цепи расходятся и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной последовательности (рис. 37.4). Две образовавшиеся двухспиральные молекулы

ДНК, каждая из которых состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной комплементарной цепи, распределяются между двумя дочерними клетками (рис. 37.5). Таким образом, каждая из дочерних клеток получает информацию, идентичную той, которой обладала родительская клетка. В каждой из двух дочерних клеток сохраняется одна цепь от исходной родительской ДНК.

Полуконсервативный механизм репликации у бактерии *Escherichia coli* был однозначно продемонстрирован в классическом эксперименте Мезелсона и Сталя с применением тяжелого изотопа азота в сочетании с равновесным центрифугированием.

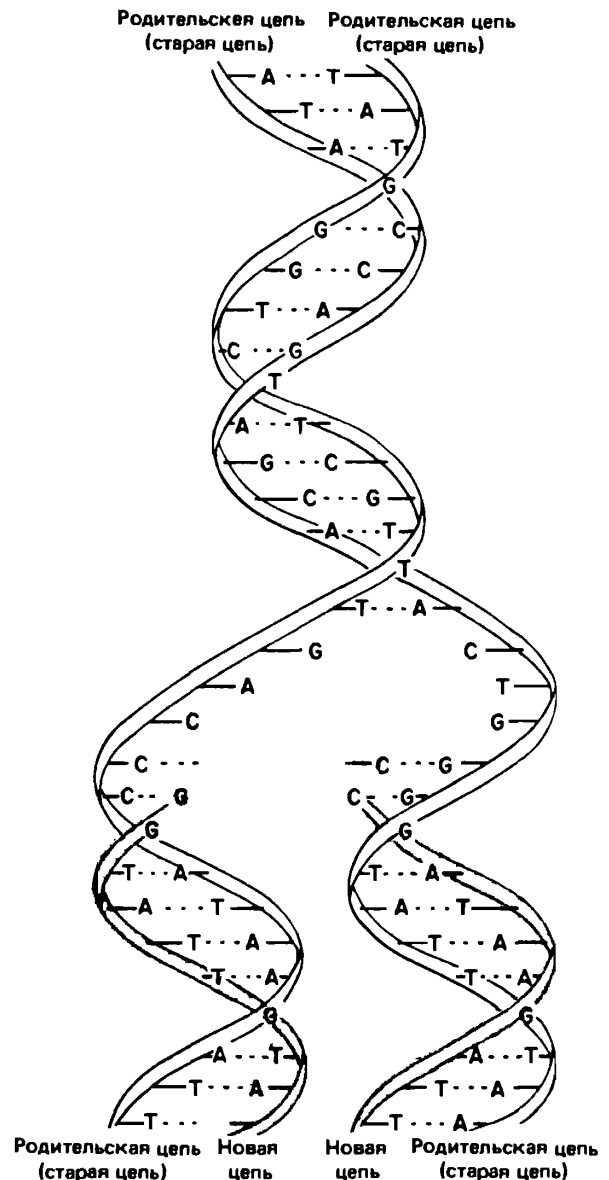


Рис. 37.4. Двухцепочечная структура ДНК. Каждая из двух цепей родительской молекулы ДНК используется в качестве матрицы для синтеза новых комплементарных цепей. (From J. D. Watson, *Molecular biology of the Gene* 3rd ed. Copyright 1976, 1970, 1965 by W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif.)

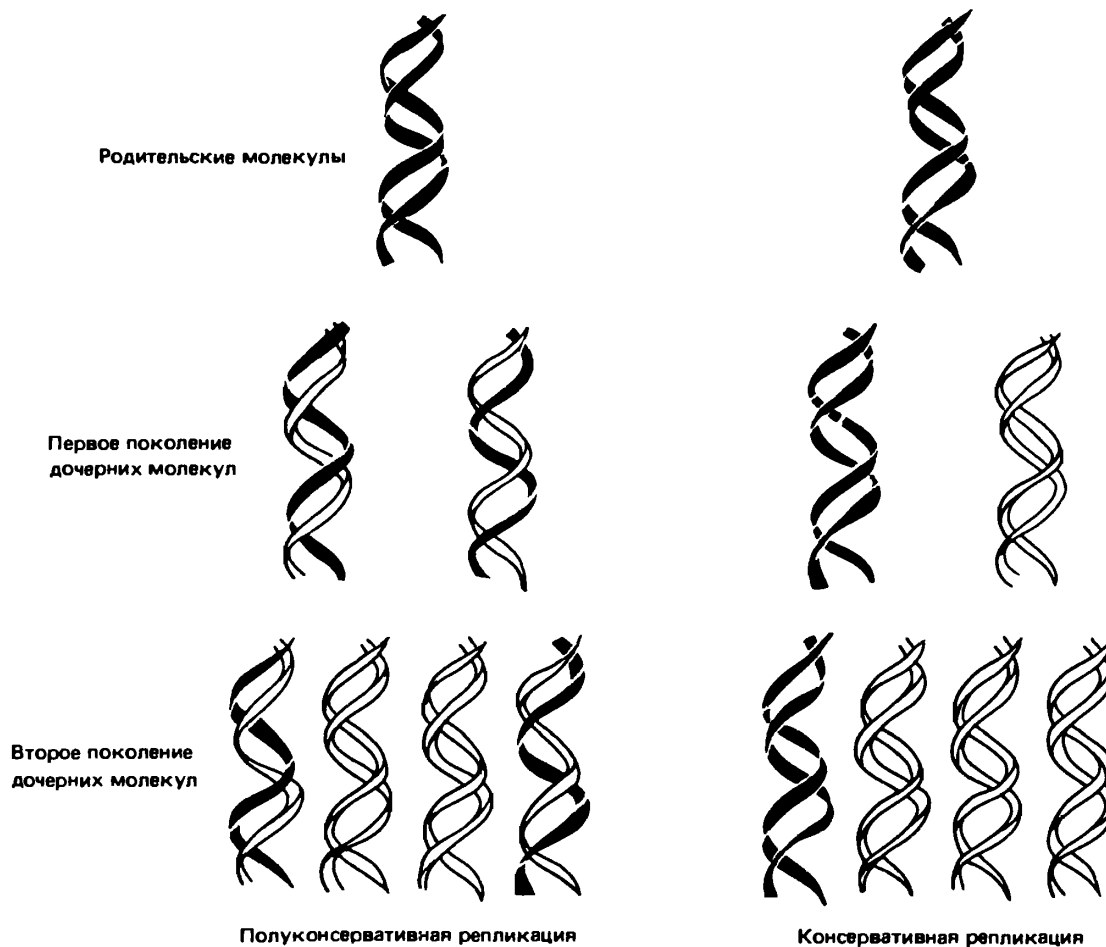


Рис. 37.5. Ожидаемое распределение цепей ДНК при полуконсервативной и консервативной репликациях. На рисунке родительские цепи — черные, а новые цепи — светлые. (Redrawn and reproduced, with permission from Lehninger A. L. Biochemistry 2nd. ed., Worth, 1975.)

ДНК *E. coli* и ДНК человека химически идентичны, хотя, конечно, последовательности нуклеотидов в них отличаются и, кроме того, клетка человека содержит примерно в 1000 раз больше ДНК, чем бактериальная. Оказалось, что химический механизм репликации ДНК — один и тот же у прокариот, таких, как *E. coli*, и эукариот, включая человека, несмотря на то что ферменты, вовлеченные в эти процессы, в клетках прокариот и эукариот различаются. Есть все основания считать, что данные, полученные при изучении химии нуклеиновых кислот прокариотических организмов, приложимы и к эукариотическим системам. Действительно, результаты экспериментов с клетками млекопитающих, аналогичных опытам Мезелсона и Сталя, оказались сопоставимыми с данными, полученными ранее на *E. coli*.

РНК

Химическая природа РНК

Рибонуклеиновая кислота представляет собой сополимер пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов, соединенных друг с другом, как и в ДНК, 3'—

5'-фосфодиэфирными мостиками (рис. 37.6). Хотя эти два вида нуклеиновых кислот имеют много общего, по ряду признаков они отличаются друг от друга.

1. У РНК углеводным остатком, к которому присоединены пуриновые или пиримидиновые основания и фосфатные группы, является рибоза, а не 2'-дезоксирибоза (как у ДНК).

2. Пиримидиновые компоненты РНК отличаются от таковых у ДНК. В состав РНК, как и в состав ДНК, входят нуклеотиды аденина, гуанина и цитозина. В то же время РНК (за исключением некоторых специальных случаев, на которых мы остановимся ниже) не содержит тимина, его место в молекуле РНК занимает урацил.

3. РНК — одноцепочечная молекула (в отличие от ДНК, имеющей двухцепочечную структуру), однако при наличии в цепи РНК участков с комплементарной последовательностью (противоположной полярности) единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием так называемых «шпилек», структур, имеющих двухспиральные характеристики (рис. 37.7).

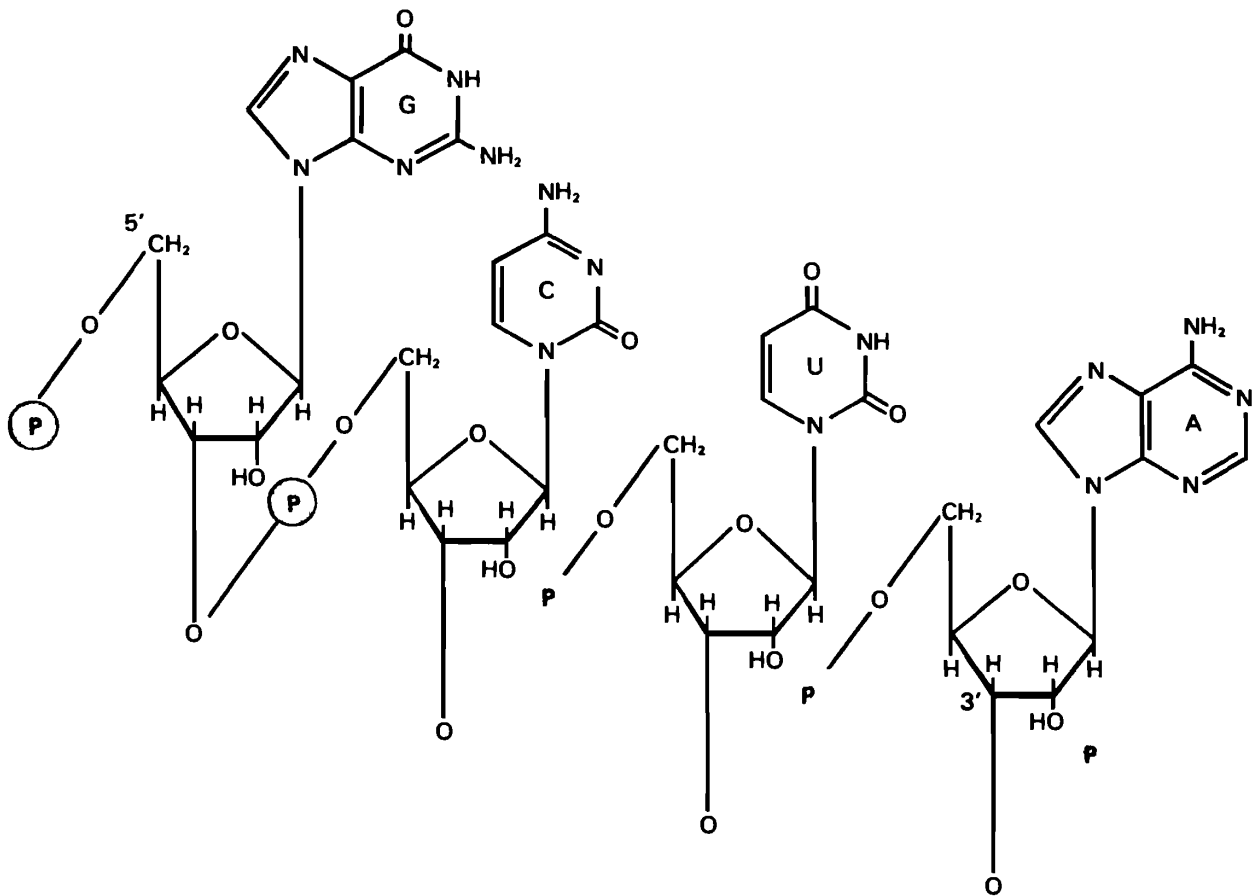


Рис. 37.6. Фрагмент молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК), в котором пуриновые и пиримидиновые основания — аденин (А), урацил (U), цитозин (С) и гуанин (G)—удерживаются фосфодизфирным остовом, соединяющим рибозильные остатки, связанные N-гликозидной связью с соответствующими нуклеиновыми основаниями. Обратите внимание: цепь РНК обладает определенной направленностью, на которую указывают 5'- и 3'-концевые фосфатные остатки.

4. Так как молекула РНК представляет собой одиночную цепь, комплементарную только одной из цепей ДНК, содержание в ней гуанина не обязательно равно содержанию цитозина, а содержание аденина не обязательно равно содержанию урацила.

5. РНК может быть гидролизована щелочью до 2', 3'-циклических дизфиров мононуклеотидов; в роли промежуточного продукта гидролиза выступает 2', 3', 5'-тризфир, который не образуется при щелочном гидролизе ДНК из-за отсутствия у последней 2'-гидроксильных групп; щелочная лабильность РНК (сравнительно с ДНК) является полезным свойством как для диагностических, так и для аналитических целей.

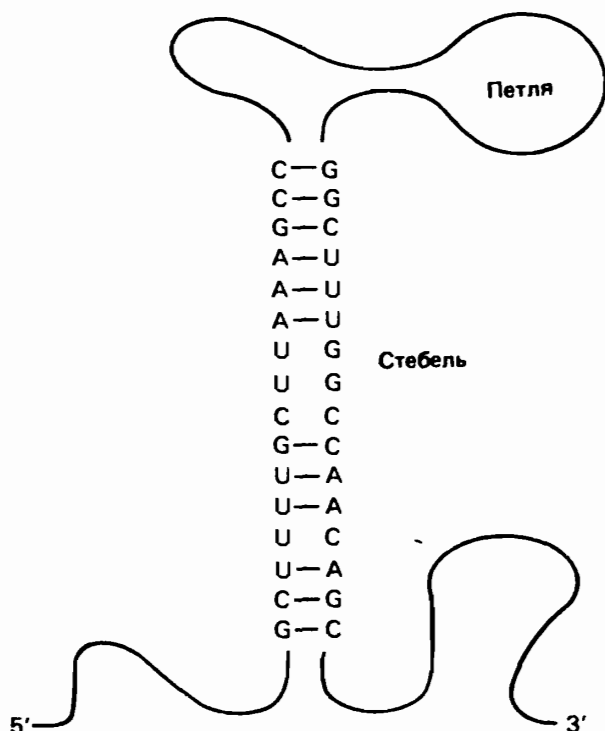
Информация, содержащаяся в одноцепочечной РНК, реализуется в виде определенной последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований (т. е. в первичной структуре) полимерной цепи. Эта последовательность комплементарна кодирующей цепи гена, с которой «считывается» РНК. Вследствие комплементарности молекула РНК способна специфически связываться (гибридизоваться) с кодирующей цепью, но не гибридизуется с некодирующей це-

пью ДНК. Последовательность РНК (за исключением замены Т на U) идентична последовательности некодирующей цепи гена (рис. 37.8).

Биологические функции РНК

Известно несколько видов РНК. Почти все они непосредственно вовлечены в процесс биосинтеза белка. Молекулы цитоплазматической РНК, выполняющие функции матриц белкового синтеза, называются **матричными РНК (мРНК)**. Другой вид цитоплазматической РНК — **рибосомная РНК (рРНК)** — выполняет роль структурных компонентов рибосом (органелл, играющих важную роль в синтезе белка). Адапторные молекулы **транспортных РНК (тРНК)** участвуют в трансляции (переводе) информации мРНК в последовательность аминокислот в белках.

Значительная часть РНК — первичных транскриптов, образующихся в эукариотических клетках, включая и клетки млекопитающих, — подвергается **деградации в ядре** и не играет какой-либо структурной или информационной роли в цитоплазме. В ку-



шем обеспечивает экспрессию генов вируса, а также наработку новых копий вирусных РНК-геномов.

Структурная организация РНК

Во всех эукариотических и прокариотических организмах существуют три основных класса молекул РНК: информационная (матричная или мессенджер) РНК (мРНК), транспортная (тРНК) и рибосомная (рРНК). Представители этих классов отличаются друг от друга размерами, функциями и стабильностью.

Информационная (мРНК) — наиболее гетерогенный в отношении размеров и стабильности класс. Все представители этого класса служат переносчиками информации от гена к белок-синтезирующей системе клетки. Они выполняют роль матриц для синтеза полипептида, т. е. определяют аминокислотную последовательность белка (рис. 37.9).

Информационные РНК, особенно эукариотические, обладают некоторыми уникальными структурными особенностями. 5'-Конец мРНК «кэпирован» 7-метилгуанозинтрифосфатом, присоединенным к 5'-гидроксилу соседнего 2'-О-метилрибонуклеозида через остаток трифосфата (рис. 37.10). Молекулы мРНК часто содержат внутренние остатки 6-метиладенина и 2'-О-метилированные рибонуклеотиды. Хотя смысл «кэпирования» до конца еще не выяснен, можно предположить, что образующаяся структура 5'-конца мРНК используется для специфического узнавания в системе трансляции. Синтез белка начинается на 5'-(кэпированном) конце мРНК. Другой конец большинства молекул мРНК (3'-конец) содержит полиаденилатную цепочку из 20—250 нуклеотидов. Специфические функции этого 3'-**poly(A)**-«хвоста» окончательно не установлены. Можно предполагать, что данная структура отвечает за поддержание внутриклеточной стабильности мРНК. Некоторые мРНК, включая гистоновые мРНК, не содержат poly (A). Наличие poly (A) в структуре мРНК используется для отделения мРНК от других видов РНК посредством фракционирования тотальной РНК на колонках с oligo (T), иммобилизованным на твердом носителе типа целлюлозы. Связывание мРНК с колонкой происходит за счет комплементарных взаимодействий poly (A)-«хвоста» с иммобилизованным oligo (T).

Рис. 37.7. Вторичная структура молекулы РНК типа «петли со стеблем» («шпилька»), возникающая вследствие внутримолекулярного образования водородных связей между комплементарными парами нуклеиновых оснований.

В культивируемых клетках человека обнаружен класс **малых ядерных РНК (мяРНК)**, которые непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК и общую «архитектуру» клетки. Размеры этих относительно небольших молекул варьируют, последние содержат от 90 до 300 нуклеотидов (табл. 37.3).

РНК является основным генетическим материалом у некоторых вирусов животных и растений. Некоторые РНК-содержащие вирусы никогда не проходят стадию обратной транскрипции РНК в ДНК. Однако для большинства известных вирусов животных, таких, как ретровирусы, характерна обратная транскрипция их РНК-генома, направляемая **РНК-зависимой ДНК-полимеразой** (обратной транскриптазой) с образованием двухспиральной ДНК-копии. Во многих случаях образующийся двухспиральный ДНК-транскрипт встраивается в геном и в дальней-

Цепи ДНК



Рис. 37.8. Последовательность гена и его РНК-транскрипта. Показаны кодирующая и некодирующая цепи, и отмечена их полярность. РНК-транскрипт, имеющий полярность 5' → 3', комплементарен кодирующей цепи (с полярностью 3' → 5') и идентичен по последовательности (за исключением замен Т на U) и полярности некодирующей цепи ДНК.

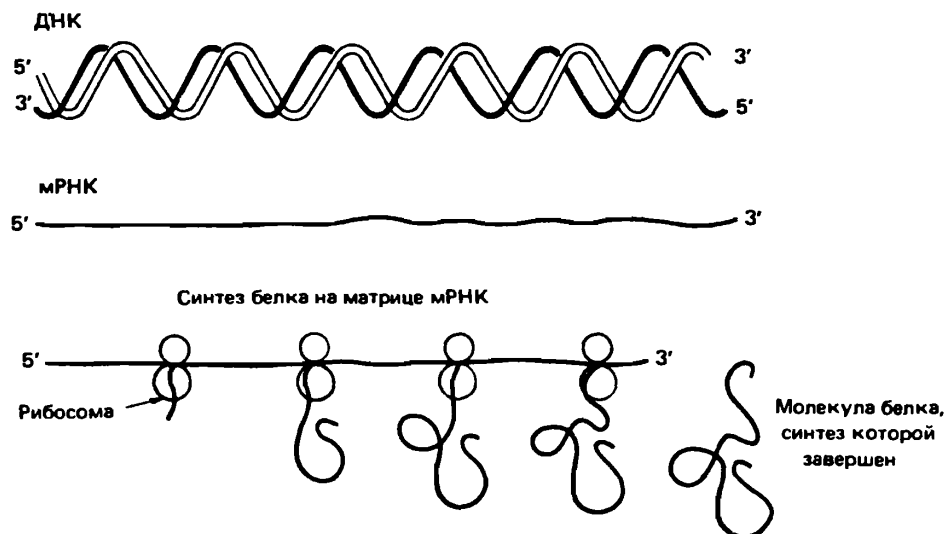


Рис. 37.9. Экспрессия генетической информации ДНК в форме мРНК-транскрипта и последующая трансляция при участии рибосом с образованием специфической молекулы белка.

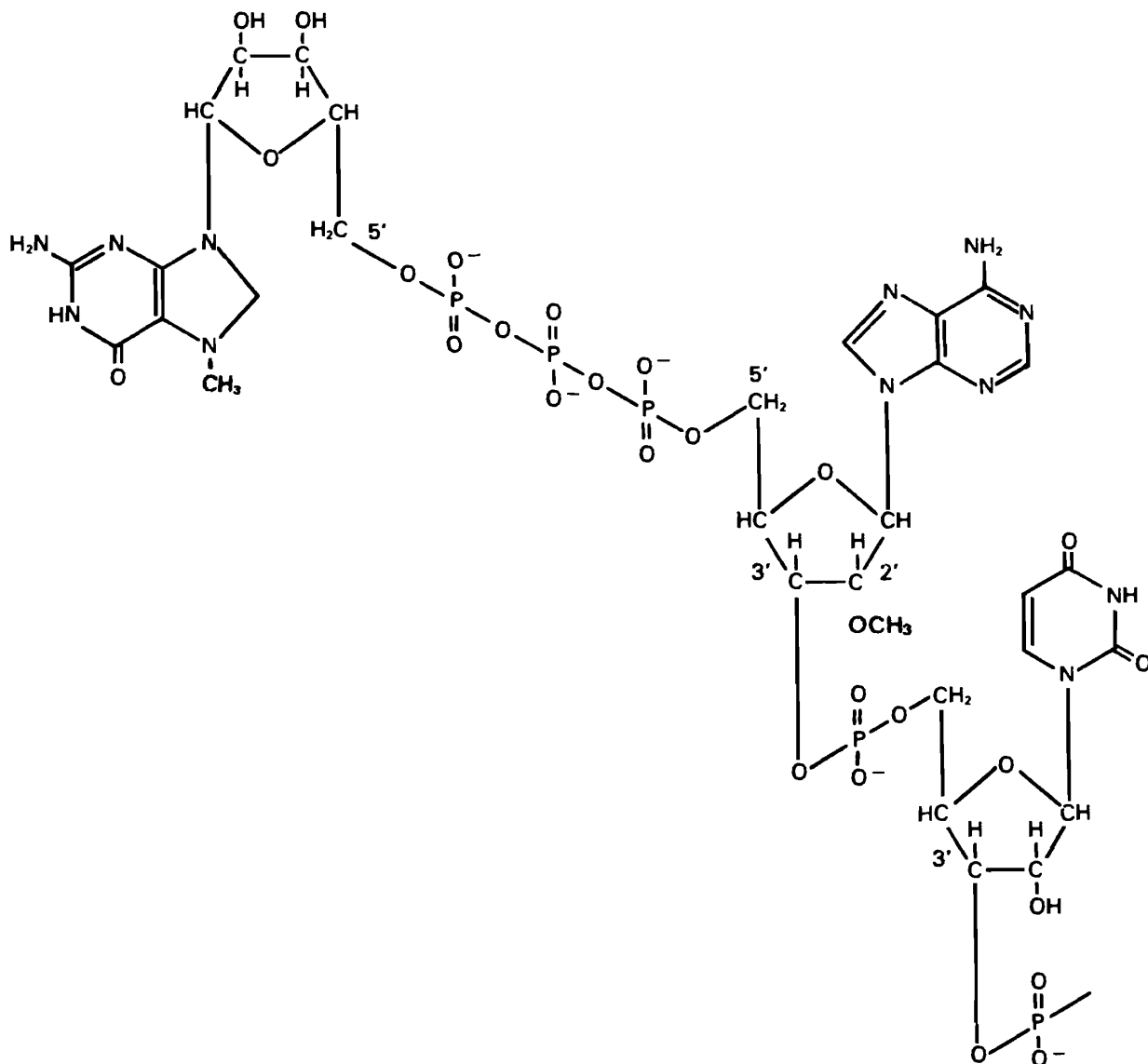


Рис. 37.10. Структура «кэпа», находящегося на 5-конце большинства эукариотических матричных РНК. 7-метилгуанозинтрифосфат присоединяется к 5-концу мРНК, на котором обычно находится 2'-О-метилпуриновый нуклеотид.

В клетках млекопитающих, включая клетки человека, зрелые молекулы мРНК, находящиеся в цитоплазме, не являются полной копией транскрибируемого участка гена. Образующийся в результате транскрипции полирибонуклеотид представляет собой предшественник цитоплазматической мРНК, перед выходом из ядра он подвергается специфическому процессингу. Непроцессированные продукты транскрипции, обнаруживаемые в ядрах клеток млекопитающих, образуют четвертый класс молекул РНК. Такие ядерные РНК очень гетерогенны и достигают значительных размеров. Молекулы **гетерогенных ядерных РНК (гяРНК)** могут иметь молекулярную массу более 10^7 , в то время как молекулярная масса мРНК обычно не превышает $2 \cdot 10^6$. гяРНК подвергаются процессингу в ядре, и образующиеся зрелые мРНК поступают в цитоплазму, где служат матрицей для биосинтеза белка.

Молекулы **транспортных РНК (тРНК)** обычно содержат около 75 нуклеотидов. Молекулярная масса таких молекул составляет $\sim 25\,000$. тРНК также формируются в результате специфического процессинга соответствующих молекул-предшественников (см. гл. 39). Транспортные тРНК выполняют функцию посредников в ходе трансляции мРНК. В любой клетке присутствуют не менее 20 видов молекул тРНК. Каждый вид (иногда несколько видов) тРНК соответствует одной из 20 аминокислот, необходимых для синтеза белка. Хотя каждая специфическая тРНК отличается от других нуклеотидной последовательностью, все они имеют и общие черты. Благодаря нескольким внутрицепочечным комплементарным участкам, все тРНК обладают вторичной структурой, получившей название «клеверный лист» (рис. 37.11).

Молекулы всех видов тРНК имеют четыре основных плеча. **Акцепторное плечо** состоит из «стебля» спаренных нуклеотидов и заканчивается последовательностью ССА (5' → 3'). Именно через 3'-гидроксильную группу аденозильного остатка происходит связывание с карбоксильной группой аминокислоты. Остальные плечи тоже состоят из «стеблей», образованных комплементарными парами оснований, и петель из неспаренных оснований (рис. 37.7). **Антикодоновое плечо** узнает нуклеотидный триплет или кодон (см. гл. 40) в мРНК. **D-плечо** названо так из-за наличия в нем дигидроуридина, **ТψС-плечо** названо по последовательности Т-псевдоуридин-С. **Дополнительное плечо** представляет собой наиболее вариабельную структуру и служит основой классификации тРНК. тРНК класса 1 (75% от общего их числа) обладают дополнительным плечом длиной 3—5 пар оснований. Дополнительное плечо у тРНК-молекул класса 2 состоит из 13—21 пар оснований и часто включает неспаренную петлю.

Вторичная структура, определяемая системой

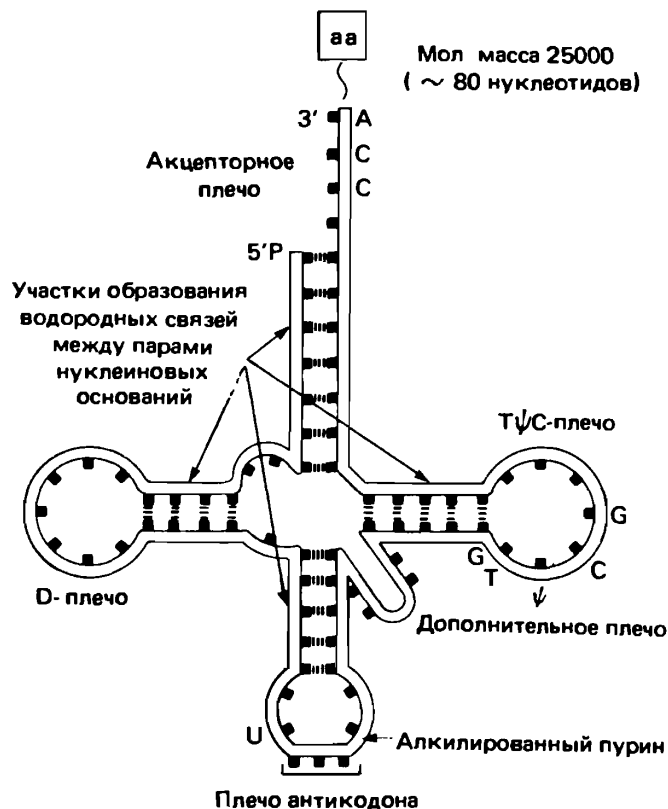


Рис. 37.11. Структура молекулы аминоксил-тРНК, к 3'-ССА-концу которой присоединена аминокислота (aa). Указаны внутримолекулярные водородные связи и расположение антикодонового, ТψС- и дигидроурацилового (D-) плеч. (From J. D. Watson. *Molecular biology of the Gene* 3rd, ed., Copyright 1976, 1970, 1965 by W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park Calif.)

комплементарных взаимодействий нуклеотидных оснований соответствующих плеч, характерна для всех видов тРНК. Акцепторное плечо содержит семь пар оснований, ТψС-плечо — пять пар оснований, плечо D — три (или четыре) пары оснований.

Молекулы тРНК весьма стабильны у прокариот и несколько менее стабильны у эукариот. Обратная ситуация характерна для мРНК, которая довольно нестабильна у прокариот, а у эукариотических организмов обладает значительной стабильностью.

Рибосомная РНК. Рибосома — это цитоплазматическая нуклеопротеиновая структура, предназначенная для синтеза белка по мРНК-матрице. Рибосома обеспечивает специфический контакт мРНК и тРНК, в результате которого и происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определенного гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка.

В табл. 37.2 представлены компоненты рибосом млекопитающих, имеющих молекулярную массу $4,2 \cdot 10^6$ и скорость седиментации 80S (единиц Сведберга). Рибосомы млекопитающих состоят из двух нуклеопротеиновых субъединиц — большой с моле-

Таблица 37.2. Компоненты рибосом млекопитающих¹⁾

Компонент	Молекулярная масса	Белковые компоненты		РНК-компоненты		
		Число	Молекулярная масса	Размер	Молекулярная масса	Число оснований
40S-субъединица	$1,4 \cdot 10^6$	~ 35	$7 \cdot 10^5$	18S	$7 \cdot 10^5$	1900
60S-субъединица	$2,8 \cdot 10^6$	~ 50	$1 \cdot 10^6$	5S	35 000	120
				5,8S	45 000	160
				28S	$1,6 \cdot 10^6$	4700

¹⁾ Субъединицы рибосом классифицируют по скорости седиментации в единицах Сведберга (40S и 60S); в таблице указаны масса обеих субъединиц, число индивидуальных белков и их масса, для РНК-компонентов каждой субъединицы приведены размер (единицы Сведберга), молекулярная масса и число оснований

кулярной массой $2,8 \cdot 10^6$ (60S), и малой, имеющей молекулярную массу $1,4 \cdot 10^6$ (40S). 60S-субъединица содержит 5S-рибосомную РНК (рРНК), 5,8S-рРНК и 28S-рРНК, а также более 50 различных полипептидов. 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 (см. гл. 40). У молекулы 5S-РНК предшественник собственный. В ядрышке происходит упаковка высокометилированных рибосомных РНК с рибосомными белками. В цитоплазме рибосомы достаточно устойчивы и способны осуществлять большое число циклов трансляции.

Небольшие стабильные РНК. В эукариотических клетках обнаружено большое число дискретных, высококонсервативных, небольших и стабильных молекул РНК. Большинство РНК этого типа обнаруживаются в составе рибонуклеопротеинов и локализованы в ядре, цитоплазме или одновременно в обоих компартментах. Размеры этих молекул варьируют от 90 до 300 нуклеотидов, содержание их — 100 000—1 000 000 копий на клетку.

Малые ядерные нуклеопротеиновые частицы (часто называемые *snurps* — от англ. small nuclear ribonucleic particles), вероятно, играют существенную роль в регуляции экспрессии генов. Нуклеопротеиновые частицы типа U7, по-видимому, участвуют в формировании 3'-концов гистоновых мРНК. Частицы U4 и U6, вероятно, необходимы для полиаденилирования, а U1 — для удаления интронов и процессинга мРНК (см. гл. 39). Табл. 37.3. суммирует некоторые характеристики небольших стабильных РНК.

Таблица 37.3. Некоторые виды небольших стабильных РНК, обнаруженные в клетках млекопитающих

Наименование	Длина (число нуклеотидов)	Число молекул на клетку	Локализация
U1	165	$1 \cdot 10^6$	Нуклеоплазма (гяРНК)
U2	188	$5 \cdot 10^5$	Нуклеоплазма
U3	216	$3 \cdot 10^5$	Ядрышко
U4	139	$1 \cdot 10^5$	Нуклеоплазма
U5	118	$2 \cdot 10^5$	Нуклеоплазма
U6	106	$3 \cdot 10^5$	Перихроматиновые гранулы
4,5S	91—95	$3 \cdot 10^5$	Ядро и цитоплазма
7S	280	$5 \cdot 10^5$	Ядро и цитоплазма
7-2	290	$1 \cdot 10^5$	Ядро и цитоплазма
7-3	300	$2 \cdot 10^5$	Ядро

ЛИТЕРАТУРА

- Darnell J. et al. Molecular Cell Biology, Scientific American Books, 1986.
Hunt T. DNA Makes RNA Makes Protein, Elsevier, 1983.
Lewin B. Genes, 2nd ed., Wiley, 1985.
Rich A. et al. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA, Annu. Rev. Biochem., 1984, **53**, 847.
Turner P. Controlling roles for snurps, Nature, 1985, **316**, 105.
Watson J. D. The Double Helix, Atheneum, 1968.
Watson J. D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids, Nature, 1953, **171**, 737.
Zieve G. W. Two groups of small stable RNAs, Cell, 1981, **25**, 296.

Организация и репликация ДНК

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

ДНК прокариотических организмов взаимодействует с белками, участвующими в репликации и транскрипции. У эукариотических организмов значительная часть ДНК окружена множеством различных белков. Эти белки вместе с ДНК образуют комплексную структуру — хроматин, которая обеспечивает специфический для эукариот тип регуляции экспрессии.

Генетическая информация, заключенная в ДНК хромосомы, может быть передана либо путем точной репликации, либо с помощью рекомбинации, транспозиции и конверсии. Эти процессы лежат в основе изменчивости организмов, обуславливают их способность к адаптации, однако они могут стать и причиной заболеваний.

Репликация ДНК — это сложный и упорядоченный процесс, идущий, как и синтез РНК, по матрице ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$. Репликация ДНК в хромосоме начинается на многих участках и идет одновременно по обеим цепям. Синтез и репарация ДНК подчиняются правилам образования комплементарных пар нуклеотидов, установленных Уотсоном и Криком. Эти процессы катализируются целым рядом ферментов.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Мутации, появляющиеся вследствие ошибок в процессах репликации и репарации ДНК, возникают с частотой одна на 10^6 клеточных делений. Образование аномального продукта гена может быть результатом мутаций в его кодирующей или регуляторной области. Мутации в половых клетках передаются потомству (так называемый вертикальный перенос наследственных заболеваний). Ряд факторов, в число которых входят вирусы, химические реагенты, ультрафиолетовое излучение и ионизирующая радиация, увеличивают частоту образования мутаций. Изменения в ДНК, возникшие под

влиянием этих факторов или спонтанно в соматических клетках, передаются в ряду клеточных поколений. Становится все более очевидным, что многие заболевания (и, вероятно, большинство опухолей) обусловлены именно таким горизонтальным переносом индуцированных мутаций.

ХРОМАТИН

Хроматин — это хромосомный материал, экстрагируемый из ядер эукариотических клеток¹. В его состав входят очень длинные двухцепочечные молекулы ДНК, небольшие основные белки — гистоны, общая масса которых примерно равна массе ДНК, кислые белки с молекулярной массой, большей чем у гистонов, а также небольшое количество РНК. Электронная микроскопия хроматина выявила наличие в нем сферических частиц (нуклеосом) размером около 10 нм, соединенных друг с другом нитями ДНК (рис. 38.1).

ГИСТОНЫ И НУКЛЕОСОМЫ

Термином «гистоны» обозначают несколько групп близкородственных основных белков. Н1-гистоны наиболее слабо связаны с хроматином и легко отмываются в солевом растворе. После такой обработки хроматин становится растворимым. Изолированные ядра нуклеосом состоят из гистонов четырех классов: Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Структура умеренно богатых лизином гистонов Н2А и Н2В характеризуется значительной консервативностью, еще более консервативна структура гистонов Н3 и Н4 (богатых аргинином). Высокая консервативность структуры гистонов свидетельствует об идентичности функций этих белков у всех эукариот. С-концевая часть их молекулы имеет обычный аминокислотный

¹ Хотя в гл. 38—41 речь идет о клетках млекопитающих (относящихся к высшим эукариотам), в ряде случаев оказалось необходимым обратиться к данным, полученным при анализе прокариот.



Рис. 38.1. Электронная микрофотография нуклеосом, соединенных ДНК-цепью; белая полоса соответствует 2,5 мкм. (Reproduced with permission, from P. Oudet, M. Gross-Bellard, P. Chambon: Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit Cell 1975, 4: 281.)

состав, тогда как N-концевая треть молекулы состоит преимущественно из основных аминокислот. Перечисленные выше четыре группы гистонов подвергаются ковалентной модификации пяти типов: ацетилированию, метилированию, фосфорилированию, ADP-рибозилированию и ковалентному связыванию (только H2A) с убиквитином (ядерным белком). Эти модификации, вероятно, влияют на структуру и функции хроматина (пока данный вопрос изучен недостаточно).

Выделенные из хроматина гистоны взаимодействуют между собой. Гистоны H3 и H4 агрегируют с образованием **тетрамеров**, состоящих из двух молекул каждого типа (H3₂-H4₂). Гистоны H2A и H2B образуют либо **димеры** (H2A-H2B), либо олигомерные комплексы [H2A-H2B]_n. Тетрамер H3₂-H4₂ не взаимодействует с H2A-H2B-димером или олигомером. Гистоны H1 не связываются в растворе с другими гистонами.

Интересно, что смесь H3₂-H4₂ и H2A-H2B с очищенной двухцепочечной ДНК дает картину рентгеновской дифракции, характерную для свежeweделенного хроматина. На электронно-микроскопических фотографиях такого препарата видны вновь образованные нуклеосомы. Более того, оказалось, что образование нуклеосом *in vitro* из ДНК и гистонов H2A, H2B, H3 и H4 не зависит от того, из каких организмов или клеток были выделены компоненты смеси. Гистоны H1 и негистоновые белки для формирования нуклеосомного кора не требуются.

В нуклеосомах ДНК суперскручена на поверхности дисковидного гистонового октамера в левостороннюю спираль. Октамер состоит из центрального H3₂-H4₂-тетрамера и двух H2A-H2B-димеров (рис. 38.2). Гистоновая сердцевина нуклеосомы взаимодействует с внутренней поверхностью суперспирали и не выступает за ее пределы.

Тетрамер H3₂-H4₂ способен придавать ДНК ну-

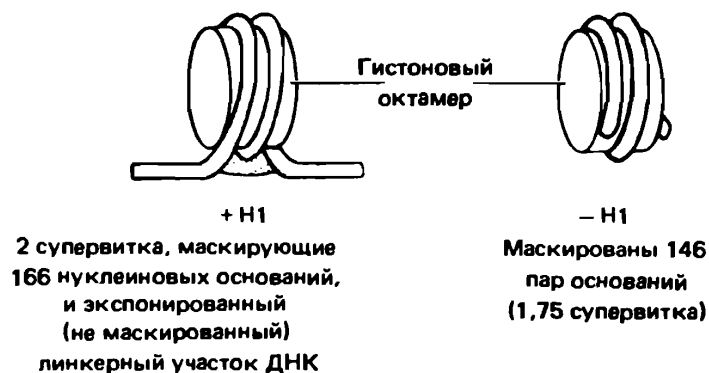


Рис. 38.2. Модель структуры нуклеосомы (слева) и нуклеосомного коря (справа), в которой ДНК закручена вокруг белкового цилиндра, содержащего по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Гистон H1 (заштрихованная область) расширяет область маскированных участков последовательности ДНК. (Reproduced, with permission, from Laskey R. A. and Earnshaw W. C.: Nucleosome assembly. Nature 1980, 286: 763.)

клеосомоподобную структуру и, следовательно, играет центральную роль в ее формировании. Два добавочных димера H2A-H2B стабилизируют первичную частицу и прочно соединяют два полувитка ДНК, ранее слабо связанных с H3₂-H4₂-тетрамером. Таким образом, 1,75 супервитков ДНК закручиваются вокруг гистонного октамера и образуют **нуклеосомный кор** (или минимальную нуклеосому), который «маскирует» 146 пар оснований ДНК (рис. 38.2). ДНК по ходу спирали вокруг октамера контактирует с гистонами в следующем порядке:

H2A-H2B-H4-H3-H3-H4-H2B-H2A.

Гистон H1 связывается с нуклеосомным кором на участке входа и выхода ДНК, «склеивая» 2 оборота, т. е. 166 пар оснований суперспирали ДНК. Так формируется зрелая нуклеосома.

В сборке нуклеосомы, вероятно, участвует ядерный белок анионного характера — **нуклеоплазмин**. Заметим, что гистоны, являясь сильными катионитами, могут неспецифически связаться с отрицательно заряженной ДНК с образованием солевых мостиков. Ясно, что такое неспецифическое взаимодействие может мешать образованию нуклеосом и проявлению функций хроматина. Нуклеоплазмин — это анионный пентамерный белок, не связывающийся ни с ДНК, ни с хроматином, но способный обратимо соединяться с гистоновым октамером, блокируя способность гистонов к неспецифическому «прилипанию» к отрицательно заряженным структурам, таким, как ДНК. По-видимому, нуклеоплазмин создает в ядре специфическое ионное окружение, способствующее взаимодействию гистонов с ДНК и сборке нуклеосом. После завершения сборки нуклеоплазмин высвобождается из гистонного ком-

плекса. Нуклеоплазмин проявляет избирательность к определенным областям ДНК. Молекулярная основа этого неслучайного распределения, названного фазированием, неизвестна. Возможно, оно связано с относительной физической пластичностью определенных нуклеотидных последовательностей, способных к скручиванию в суперспираль.

Упаковка нуклеосом в ядре, по-видимому, зависит от взаимодействия H1 гистонов с участками двухцепочечной ДНК, соединяющими нуклеосомы. Топология этого взаимодействия, приводящего к образованию межнуклеосомных спейсерных участков, изучена недостаточно полно.

Электронная микроскопия хроматина кроме нуклеосом выявила еще две структуры высшего порядка — **фибриллы диаметром 10 нм** и **волокна диаметром 25—30 нм**. Дисковидные нуклеосомы (см. выше) имеют диаметр 10 нм и высоту 5 нм. По-видимому, фибриллы толщиной 10 нм состоят из ряда нуклеосом, касающихся друг друга своими краями и ориентированных плоскими поверхностями вдоль оси фибриллы (рис. 38.3). Вероятно, фибриллы тоже скручиваются в спираль, на виток которой приходится 6—7 нуклеосом. В результате образуется хроматиновое волокно диаметром 30 нм (рис. 38.4). Витки такой «суперспирали» должны быть достаточно плоскими, а плоские поверхности нуклеосом последующих витков — параллельными друг другу. H1-гистоны, по всей вероятности, стабилизируют структуру волокна, но их расположение так же, как и длина спейсерных участков ДНК, точно не определены. Вероятно, нуклеосомы способны формировать еще ряд компактных суперструктур. Для того чтобы образовалась митотическая хромосома нормального размера, волокно диаметром 30 нм должно подвергнуться дополнительной компактизации с уменьшением результирующей длины еще в 100 раз (см. ниже).

В **интерфазных хромосомах** хроматиновые волокна организованы в домены или петли, состоящие из 30 000—100 000 пар оснований и «заякоренные» на внутриядерном поддерживающем матриксе. Распределение участков генома в рамках доменной структуры хроматина, вероятно, не является случайным. Можно предположить, что каждый петлеобразующий домен хроматина содержит как кодирующие, так и некодирующие области генов, соответствующих определенной генетической функции.



Рис. 38.3. Структура фибриллы хроматина диаметром в 10 нм, состоящей из дискообразных нуклеосом. Положение H1-гистона не показано.

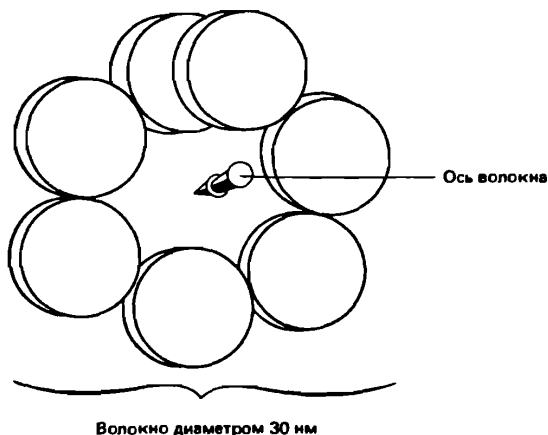


Рис. 38.4. Структура хроматинового волокна диаметром 30 нм, состоящего из суперскрученных фибрилл диаметром 10 нм. Ось волокна направлена перпендикулярно плоскости страницы.

Активный хроматин

Как правило, каждая клетка многоклеточного организма содержит одну и ту же генетическую информацию в виде одной и той же последовательности ДНК. Из этого следует, что различия между типами клеток данного организма должны объясняться дифференцированной экспрессией общей генетической информации. Хроматин, содержащий активные гены (транскрипционно-активный хроматин), отличается по некоторым признакам от неактивного. Нуклеосомная структура активного хроматина видоизменена или, в особо активных областях, вообще отсутствует. ДНК в активном хроматине содержит длинные участки (около 100 000 пар оснований), чувствительные к действию нуклеаз (например, ДНКазы I). Чувствительность к ДНКазе I указывает на возможность транскрипции и в некоторых случаях коррелирует с отсутствием 5-метилдезоксцитидина в соответствующей области ДНК.

Внутри большой области активного хроматина обнаружены короткие участки (100—300 нуклеотидов) с еще более высокой (на порядок) чувствительностью к ДНКазе I. Эти, так называемые **гиперчувствительные сайты**, по-видимому, возникают в результате конформационных изменений, которые создают особенно благоприятные условия для действия нуклеазы на ДНК. Такие участки обычно локализованы непосредственно перед активным геном и могут быть обусловлены наличием так называемых **энхансерных элементов**, усиливающих транскрипцию (см. гл. 39 и 41). Есть основания считать, что во многих случаях транскрипционная активность гена связана с наличием в хроматине гиперчувствительного к ДНКазе сайта, непосредственно прилегающего к началу гена. Вероятно, такие сайты обе-

спечивают доступность кодирующей цепи для белков, участвующих в процессе транскрипции.

Электронная микроскопия интерфазного ядра показывает, что транскрипционно-неактивный хроматин (**гетерохроматин**) плотно упакован, и потому соответствующие области интенсивно окрашиваются. Участки транскрипционно-активного хроматина (**эухроматина**) имеют более слабую окраску. В целом в ходе клеточного цикла млекопитающих (см. ниже) эухроматин реплицируется раньше, чем гетерохроматин.

Существуют два типа гетерохроматина: **конститутивный гетерохроматин** и **факультативный гетерохроматин**. Конститутивный гетерохроматин всегда конденсирован и, следовательно, неактивен. Конститутивный гетерохроматин найден в областях, близких к центромерам и концевым участкам (теломерам) хромосом. Факультативный гетерохроматин временами конденсирован, а временами разуплотнен, активно транскрибируется и таким образом оказывается сходным с эухроматином. Из двух X-хромосом самок млекопитающих — одна практически полностью транскрипционно-неактивна, т.е. проявляет свойства гетерохроматина. Однако при гаметогенезе и на ранних стадиях эмбриогенеза гетерохроматиновая X-хромосома становится транскрипционно-активной и, следовательно, проявляет свойства факультативного гетерохроматина.

Некоторые клетки насекомых, например *Chironomus*, содержат гигантские хромосомы, образовавшиеся в результате нерасхождения дочерних хроматид после прохождения ~10 циклов репликации. Копии ДНК, лежащие рядом в точном соответствии с локализованными на них генами, образуют хромосому с четко выраженным распределением полос — конденсированного и менее плотного хроматина.

Транскрипционно-активные области таких **политенных хромосом** отличаются особенно отчетливой разуплотненностью — они образуют так называемые «**пuffs**», в которых, как установлено, локализуются ферменты системы транскрипции и происходит синтез РНК (рис. 38.5).

Хромосомы

В метафазе **хромосомы** млекопитающих обладают двулучевой симметрией второго порядка и состоят из идентичных **сестринских хроматид**, соединенных в центромере, положение которой характерно для каждой хромосомы (рис. 38.6). Каждая сестринская хроматида содержит одну двухцепочечную молекулу ДНК. В интерфазе упаковка молекулы ДНК менее плотная, чем в метафазе. Метафазные хромосомы транскрипционно-неактивны.

Гаплоидный геном человека состоит из $3,5 \cdot 10^9$ пар оснований и примерно из $1,7 \cdot 10^7$ нуклеосом. Следовательно, каждая из 23 хроматид гаплоидного

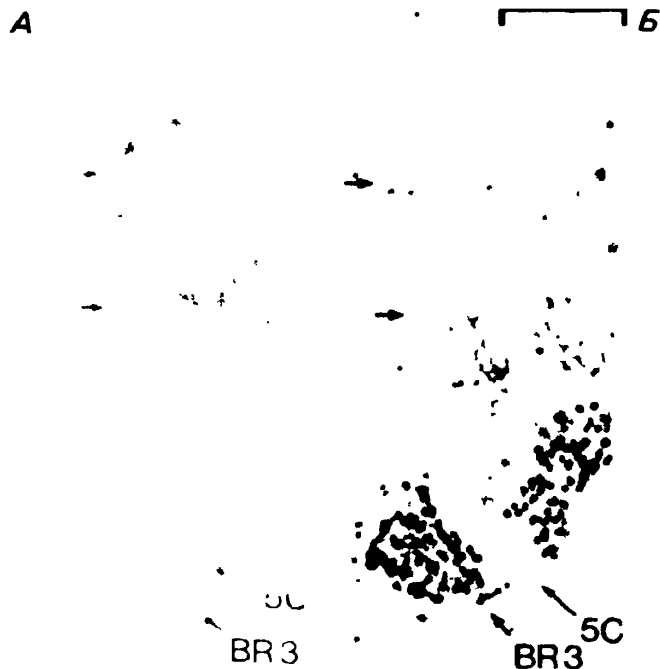


Рис. 38.5. Корреляция между активностью РНК-полимеразы II и синтезом РНК. При тепловом шоке (39° С, 30 мин) личинок *Chironomus tentans* активируется ряд генов. **А.** Распределение РНК-полимеразы В (тип II) по длине четвертой хромосомы из клеток слюнных желез. Фермент выявляли иммунофлуоресцентным методом, используя антитела против полимеразы. 5С и BR3 — специфические сегменты IV хромосомы. Стрелками указаны пучки. **Б.** Радиоавтограф IV хромосомы, инкубированной с H^3 -уридином для введения метки в РНК. Распределение иммунофлуоресцентных сигналов и радиоавтографических пятен по хромосоме совпадет. (Reproduced, with permission, from Sass H. PNA polymerase B in polytene chromosomes. Cell 1982: 28: 274. Copyright 1982 by the Massachusetts Institute of Technology.)

генома человека содержит в среднем $1,5 \cdot 10^8$ нуклеотидов в одной двухцепочечной молекуле ДНК. Таким образом, при формировании конденсированной метафазной хромосомы линейный размер каждой молекулы ДНК должен быть уменьшен в 8000 раз! В метафазных хромосомах хроматиновые волокна (длиной 25—30 нм) также складываются в серии петлеобразных доменов, проксимальные участки которых закрепляются на внутриядерном белковом (негистоновом) каркасе. Коэффициенты, характеризующие плотность упаковки каждой упорядоченной структуры ДНК, приведены в табл. 38.1.

Упаковка нуклеопротеинов в хроматиды происходит неслучайным образом, о чем свидетельствует характерное расположение полос на хромосомах, окрашенных акрихин-ипритом или по Гимза (рис. 38.7).

Таблица 38.1. Коэффициенты упаковки для различных типов суперструктурированной ДНК

Форма хроматина	Коэффициент упаковки
Обычная двухцепочечная ДНК	~1,0
~2 витка ДНК в нуклеосоме	2,5
Нуклеосомная фибрилла (10 нм)	5
Хроматиновая нить из суперскрученных нуклеосом (25—30 нм)	30
Конденсированные метафазные хромосомы	8000

Распределение окрашенных полос (бендов) в хромосомах хорошо воспроизводится в препаратах разных индивидуумов одного вида, но сильно различается у хромосом разных, даже близкородственных, видов. Следовательно, упаковка нуклеопротеинов в хромосомы у высших эукариот должна определенным образом зависеть от видоспецифических особенностей структуры самих молекул ДНК.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Гаплоидный геном каждой клетки человека представлен $3,5 \cdot 10^9$ парами оснований и состоит из 23 пар хромосом. Этого достаточно для кодирования



Рис. 38.6. Две сестринские хроматиды 12-й хромосомы человека ($\times 27850$). (Reproduced, with permission, from Du Praw E. J. DNA and Chromosomes. Holt, Rinehart and Winston, 1970.)

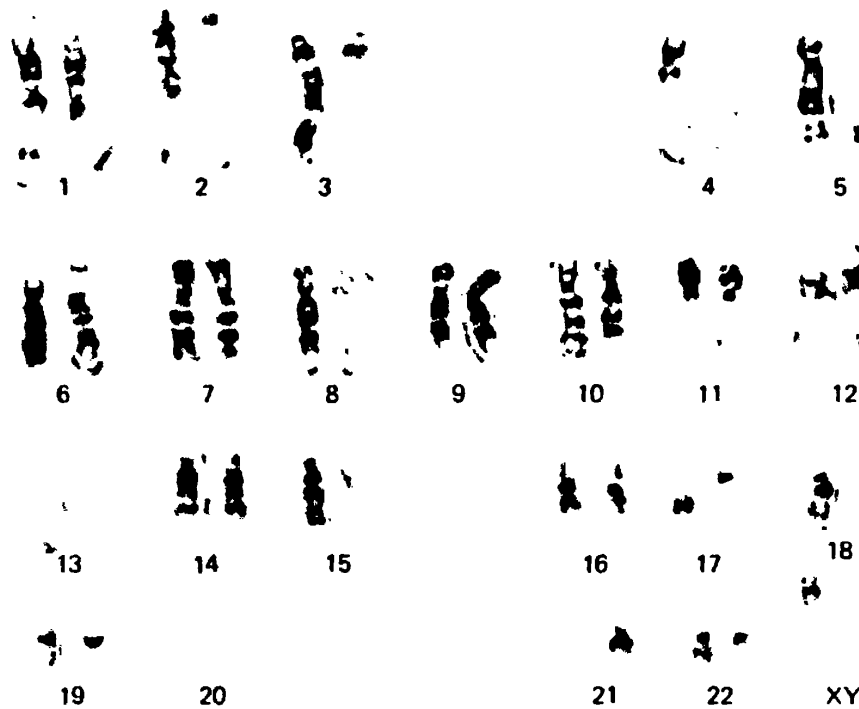


Рис. 38.7. Кариотип человека (мужчины с нормальным набором хромосом 46XY). Хромосомы окрашены по Гимза и расположены в соответствии с Парижской номенклатурой. (Courtesy of H. Lawce and F. Conte.)

около 1,5 миллионов пар генов. Однако данные по изучению генома человека и частоты возникновения мутаций свидетельствуют о том, что в организме *Homo sapiens* имеется не больше 100 000 белков. Это означает, что большая часть геномной ДНК — некодирующая, т.е. заложенная в ней информация никогда не транслируется в аминокислотную последовательность белковых молекул. Некоторая часть нетранслируемых последовательностей ДНК регулирует экспрессию генов в ходе развития, дифференцировки и адаптации. Определенная часть избыточной ДНК входит в состав интронов — некодирующих участков, разделяющих кодирующие области генов. И все же большая часть избыточной ДНК, судя по всему, представлена многочисленными семействами повторяющихся последовательностей, значение которых до сих пор неизвестно.

ДНК эукариотического генома можно разделить на два «класса последовательностей». Это **уникальные, или неповторяющиеся, последовательности** и **повторяющиеся последовательности ДНК (повторы)**. К первому классу последовательностей ДНК относятся однокопийные гены, кодирующие белки. Класс повторяющихся последовательностей ДНК представлен повторами с копийностью от 2 до 10^7 на клетку.

Уникальные, или неповторяющиеся, последовательности ДНК

Более половины геномной ДНК эукариотических организмов принадлежит к классу уникальных, или неповторяющихся, последовательностей. Это утверждение (а также оценки, касающиеся распределения в геноме повторяющихся последовательностей ДНК) базируется на данных не прямых экспериментов с применением различных методик ДНК-РНК-гибридизации, позволяющих получить лишь приблизительную оценку. У дрожжей — низших эукариот — экспрессируется около 4000 генов. В типичной ткани млекопитающих (печень или почки) экспрессируется от 10 000 до 15 000 генов. При этом в каждой ткани происходит экспрессия специфического набора генов. Каким образом это достигается, по-прежнему остается одним из центральных вопросов современной биологии.

Интроны

Кодирующие области ДНК, транскрипты которых попадают в цитоплазму в составе «зрелых» молекул мРНК, **прерываются в геноме длинными последовательностями некодирующей ДНК**. Соответственно первичные транскрипты ДНК (гяРНК) содержат некодирующие промежуточные последовательности

РНК, которые должны быть удалены в процессе созревания, обеспечивающего также и правильную стыковку (сплайсинг) кодирующих сегментов в зрелых мРНК. Большинство последовательностей, транскрипты которых представлены в зрелой мРНК, разорваны в геноме от одного до пятидесяти раз некодирующими вставками (**интронами**). Как правило, интроны значительно длиннее, чем кодирующие участки (**экзоны**). Процессинг первичного транскрипта, включающий удаление интронов и сплайсинг соответствующих экзонов, описан в гл. 39.

Функция интронов точно не установлена. Можно предположить, что они служат для физического разделения экзонов, соответствующих функциональным доменам кодируемых белков, с целью оптимизации процесса генетических перестроек (рекомбинаций), которые могут происходить с более высокой эффективностью при наличии интронов, чем в случае сосредоточения генетической информации в одном континууме. Увеличение темпа генетических перестроек функциональных доменов может рассматриваться как фактор ускорения эволюции биологических функций.

Повторяющиеся последовательности ДНК

Под повторяющимися последовательностями ДНК (повторами) понимается широкий спектр как умеренно повторяющихся, так и часто повторяющихся (высокоповторяющихся) последовательностей ДНК. По крайней мере 20—30% генома человека представлено повторами.

Высокоповторяющиеся последовательности состоят из участков длиной в 5—500 пар оснований, повторяющихся много раз и расположенных один за другим (тандемно). Эти последовательности обычно образуют **кластеры** и присутствуют в количестве от 1 до 10 миллионов копий на гаплоидный геном. Высокоповторяющиеся последовательности транскрипционно-неактивны и, вероятно, участвуют в структурировании хроматина.

Умеренно повторяющиеся последовательности, присутствующие в количестве менее чем 10^6 копий на гаплоидный геном, не образуют кластеров, а чередуются с неповторяющимися (уникальными) последовательностями. Они могут быть как короткими, так и весьма протяженными. Длинные диспергированные повторы состоят из 5000—7000 пар оснований и представлены в количестве 1000—100 000 копий на гаплоидный геном. Они фланкированы с обоих концов прямыми повторами длиной в 300—600 пар оснований (рис. 38.8). Во многих случаях длинные повторы транскрибируются РНК-полимеразой II в виде молекул мРНК, содержащих такие же экзипированные 5'-концы, как и мРНК.

Короткие диспергированные повторы представляют семейства родственных, но отличных друг от



Рис. 38.8. Схема длинного диспергированного повтора. Отмечено расположение на концах повтора коротких прямых повторов (abc) и соответствующих комплементарных участков (a'b'c').

друга фрагментов длиной от единиц (нескольких пар) до нескольких сотен пар нуклеотидов. Короткие повторы активно транскрибируются либо как компоненты интронов, либо под контролем ДНК-зависимой РНК-полимеразы III как самостоятельные элементы (см. гл. 39). Наиболее многочисленным семейством коротких диспергированных повторов в геноме человека является **семейство Alu**, насчитывающее около 500 000 копий на гаплоидный геном, что составляет 3—6% от общего размера генома человека. Повторы этого семейства (а также их аналоги у животных) транскрибируются и в составе гРНК, и в виде дискретных молекул РНК, включая хорошо изученные 4S-РНК и 7S-РНК. Такого типа последовательности высококонсервативны как внутри данного вида, так и у разных видов млекопитающих. По своей структуре короткие диспергированные повторы, в том числе члены семейства Alu, напоминают длинные концевые повторы ретровирусов (LTR). По-видимому, это мобильные элементы, способные как встраиваться, так и вырезаться из различных участков генома (см. ниже).

ИЗМЕНЕНИЯ И ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Изменения последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований, вызванные заменой, удалением или вставкой одного или более нуклеотидов, могут привести к изменению продукта данного гена — в большинстве случаев белка. Последствия подобных изменений (**мутаций**) генетического материала описаны в гл. 40.

Рекомбинация хромосом

Гомологичные хромосомы прокариот и эукариот могут обмениваться генетическим материалом. Обмен или **рекомбинация** происходит в клетках млекопитающих главным образом при мейозе. Этому событию предшествует попарное выстраивание гомо-

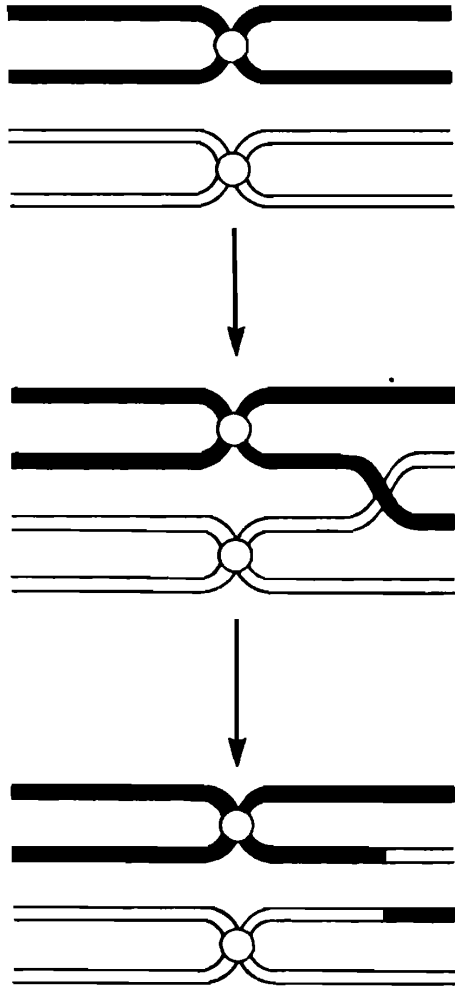


Рис. 38.9. Процесс кроссинговера гомологичных хромосом и образование рекомбинантных хромосом.

логических хромосом, причем, как правило, этот процесс происходит с очень высокой точностью. Процесс кроссинговера схематически изображен на рис. 38.9. Он заключается в эквивалентном взаимном обмене генетической информацией между гомологичными хромосомами. Если гомологичные хромосомы несут различные аллели одного и того же гена, то в результате кроссинговера может произойти заметное и наследуемое изменение признаков. В редких случаях, когда при конъюгации гомологичные хромосомы располагаются друг относительно друга не совсем точно, может произойти неравный кроссинговер, в результате которого будет иметь место неэквивалентный обмен информацией. При этом одна из хромосом теряет часть генетической информации и, следовательно, несет делецию. Вторая хромосома получает большее количество генетического материала и, следовательно, несет вставку или дупликацию (рис. 38.9). **Неравный кроссинговер** у человека показан на примере гемоглобинов, названных Лепоре (Lepore) и анти-Лепоре. Он может происходить в тандемных участках повторяющейся ДНК, например в последовательностях глобиновых генов или же в последовательностях более представительного семейства повторов ДНК (рис. 38. 10). Этот феномен ответствен за увеличение или уменьшение числа копий повторов данного семейства.

Хромосомная интеграция

Некоторые бактериальные вирусы (бактериофаги) способны рекомбинировать с ДНК хозяина таким образом, что ДНК бактериофага встраивается в линейной форме в бактериальный геном. Интеграция бактериофага происходит по механизму, пред-

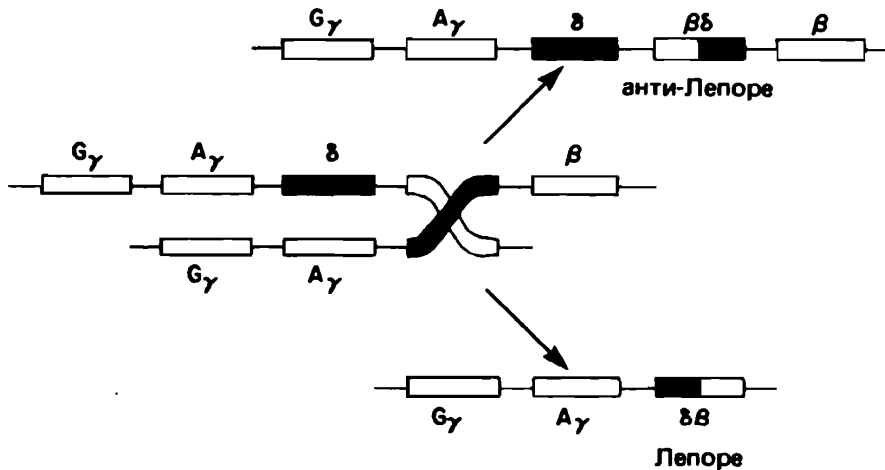


Рис. 38.10. Неравный кроссинговер в области структурных генов гемоглобинов человека. Продукты неравного кроссинговера: глобиновые гены типа дельта-бета Лепоре и бета-дельта анти-Лепоре. В приведенных примерах показано расположение кроссоверных областей. (Reproduced, with permission, from Clegg J. B., Weatherall D. J. β^0 -thalassaemia: Time for reappraisal? Lancet 1974, 2: 133.)

ставленному в упрощенном виде на рис. 38.11. При этом имеют место разрыв и соединение обеих молекул ДНК с соблюдением полярности. Следовательно, интеграция сопровождается линеаризацией — переходом кольцевой молекулы ДНК бактериофага в линейную форму. Известны два механизма интеграции генома бактериофага с бактериальным геномом. Если ДНК бактериофага содержит участки, **гомологичные** бактериальной ДНК, используется механизм, аналогичный рекомбинации гомологичных хромосом. Другой вариант интеграции осуществляется бактериофагами, которые синтезируют белки, направляющие процесс специфического связывания определенных участков последовательности (сайтов) бактериальной хромосомы с негомологичными сайтами в фаговой ДНК. Интеграция с помощью такого механизма носит название «**сайт-специфической**».

Многие вирусы животных, особенно онкогенные вирусы, могут встраиваться в геном млекопитающих либо непосредственно, либо, в случае РНК-вирусов через ДНК-транскрипты. Интеграция вирусной ДНК в хромосомы животных, как правило, не является сайт-специфической.

Транспозиции

В эукариотическом геноме имеются небольшие элементы ДНК, не являющиеся провирусами, но способные самостоятельно вырезаться из хозяйского генома, а затем встраиваться в различные его участки, влияя при этом на функции прилегающих последовательностей ДНК. Эти подвижные (мобильные) элементы, которые иногда называют «прыгающая ДНК», могут перемещать фрагменты хромосомной ДНК и таким путем глубоко воздействовать на процессы эволюции генома. Как указывалось выше, семейство коротких Alu-повторов характеризуется наличием структурного сходства с концевыми последовательностями ретровирусов, благодаря которым последние могут встраиваться в геном млекопитающих и покидать его.

Прямым доказательством транспозиций других небольших элементов ДНК в геноме человека явилось открытие так называемых «**процессированных генов**» иммуноглобулинов, α -глобинов и некоторых других. Процессированные гены идентичны или почти идентичны последовательностям зрелых мРНК данных генов. Они состоят из нетранскрибируемого 5'-участка гена, кодирующей области без интронов и poly A-последовательности на 3'-конце. Появление процессированных генов можно объяснить только интеграцией обратных транскриптов соответствующих зрелых мРНК. Судя по всему, единственным возможным способом внедрения таких обратных транскриптов является транспозиция. Действительно, оба конца процессированных генов фланкируются короткими повторами, сходными с теми, которые имеют мобильные элементы низших организмов. Некоторые из процессированных генов содержат случайным образом распределенные изменения последовательности, накопившиеся в ходе эволюции. Подобные изменения часто приводят к образованию *nonsense*- (бессмысленных)-кодонов, препятствующих экспрессии (см. гл. 40). Такие процессированные гены называют **псевдогенами**.

Генная конверсия

Кроме неравного кроссинговера и транспозиций существует и третий механизм быстрых изменений генетического материала. Одинаковые последовательности гомологичных или негомологичных хромосом могут формировать случайные пары, а несовпадающие участки — удаляться. В результате происходит закрепление определенного варианта повторов данного семейства. Этот процесс получил название **генной конверсии**.

Диплоидные клетки эукариотических организмов (в том числе человека) после прохождения S-фазы клеточного цикла содержат тетраплоидный набор хромосом. Каждая из сестринских хроматид (хромо-

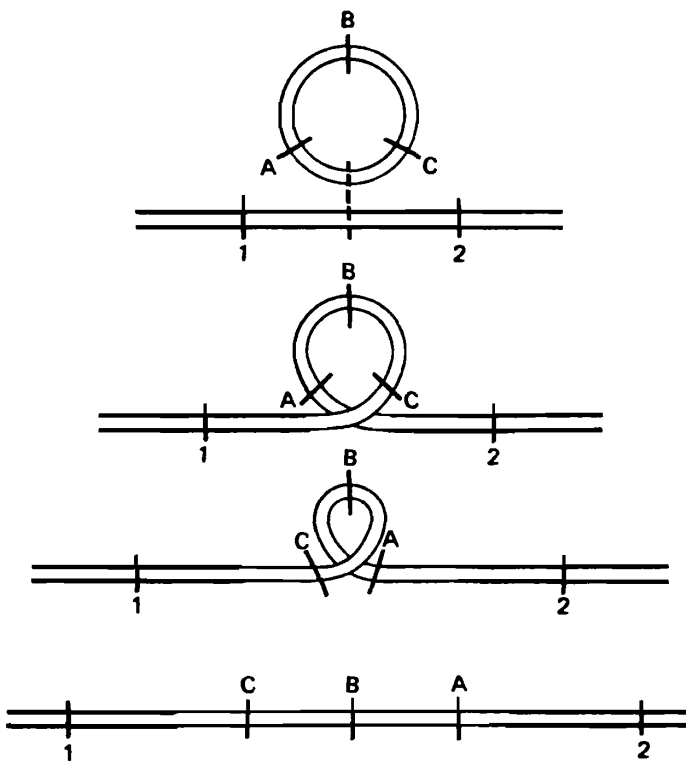


Рис. 38.11. Встраивание кольцевого генома (содержащего гены А, В, С) в хозяйскую молекулу ДНК (содержащую гены 1 и 2) и порядок чередования генов в рекомбинантной цепи ДНК.



Рис. 38.12. Обмен между сестринскими хроматидами у человека. Окраска хромосом по Гимза после двух циклов репликации в присутствии бромдезоксимуридина. (Courtesy of S. Wolff and J. Bodycote.)

сомных пар) содержит одну и ту же генетическую информацию, поскольку обе они — результат полуконсервативной репликации родительских ДНК-молекул. Между этими генетически идентичными хроматидами может происходить кроссинговер. Обмен генетической информацией между сестринскими хроматидами (рис. 38.12) проявляется в форме равного кроссинговера и не имеет каких-либо генетических последствий.

Некоторые интересные генетические перестройки происходят в клетках млекопитающих в ходе нормального развития и дифференцировки. Например, в клетках зародышевой линии мыши гены V_L и C_L , кодирующие единичную цепь молекулы иммуноглобулина (см. гл. 41), разнесены в геноме на значительное расстояние. В ДНК зрелых иммуноглобулин-продуцирующих (плазматических) клеток эти же гены оказываются на более близком расстоянии и транскрибируются в составе единого первичного транскрипта. Однако и после перестройки ДНК в ходе дифференцировки последовательности этих генов непосредственно не смыкаются. Между ними располагается промежуточная некодирующая последовательность (интрон) длиной около 1200 пар оснований, которая удаляется из первичного транскрипта при процессинге в ходе созревания мРНК (см. гл. 39 и 41).

СИНТЕЗ И РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Основное функциональное значение процесса репликации ДНК заключается в снабжении потомства генетической информацией. Для обеспечения генети-

ческой стабильности организма и вида ДНК должна реплицироваться полностью и с очень высокой точностью. Процесс репликации ДНК весьма сложен. В нем участвует множество ферментов. Первое энзимологическое исследование репликации ДНК было проведено Артуром Корнбергом, открывшим в *Escherichia coli* фермент, ныне называемый ДНК-полимеразой I. Этот фермент проявляет несколько типов ферментативной активности и характеризуется сложной структурой. В качестве субстратов ДНК-полимераза I использует дезоксирибонуклеозидтрифосфаты — производные аденина, гуанина, цитозина и тимина. Полимеразная активность, впервые продемонстрированная для ДНК-полимеразы I, свойственна остальным полимеразам прокариотических и эукариотических клеток, при этом важно помнить, что основной функцией ДНК-полимеразы I *E. coli*, как было установлено, является репарация ДНК.

Инициация синтеза ДНК

Для инициации синтеза ДНК (рис. 38.13) требуются **короткие** (10—200 нуклеотидов) **последовательности РНК**, выполняющие функции **затравок (праймеров)**. Синтез начинается с реакции между 3'-гидроксильной группой РНК-затравки и α -фосфатной группой дезоксирибонуклеозидтрифосфата, в ходе которой дезоксирибонуклеозидный остаток присоединяется к РНК-затравке с одновременным выщеплением пирофосфата. 3'-гидроксильная группа присоединенного дезоксирибонуклеозидмонофосфата осуществляет далее нуклеофильную атаку на α -фосфатную группу следующего встраивающегося дезоксирибонуклеозидтрифосфата, также с отщеплением пирофосфата. Естественно, что выбор очередного нуклеотида на каждом шаге синтеза определяется матричной цепью ДНК согласно правилам, предложенным впервые Уотсоном и Криком (рис. 38.14). Так, если в соответствующем положении матричной цепи находится остаток адениндезоксирибонуклеозидмонофосфата, то в реакцию будет вступать тимидинтрифосфат и его α -фосфатная группа будет атаковаться 3'-гидроксильной группой последнего остатка растущей цепи. Реакция происходит только в том случае, если встраиваемый нуклеотид образует комплементарную пару с очередным нуклеотидом матричной цепи ДНК и благодаря водородным связям занимает положение, при котором 3'-гидроксильная группа растущей цепи атакует новый нуклеотид и включает его в полимер. Последовательности ДНК, присоединенные к РНК-затравкам, были названы по имени открывшего их японского ученого — **фрагментами Оказаки** (рис. 38.15). У млекопитающих после образования значительного числа фрагментов Оказаки репликационный комплекс присту-

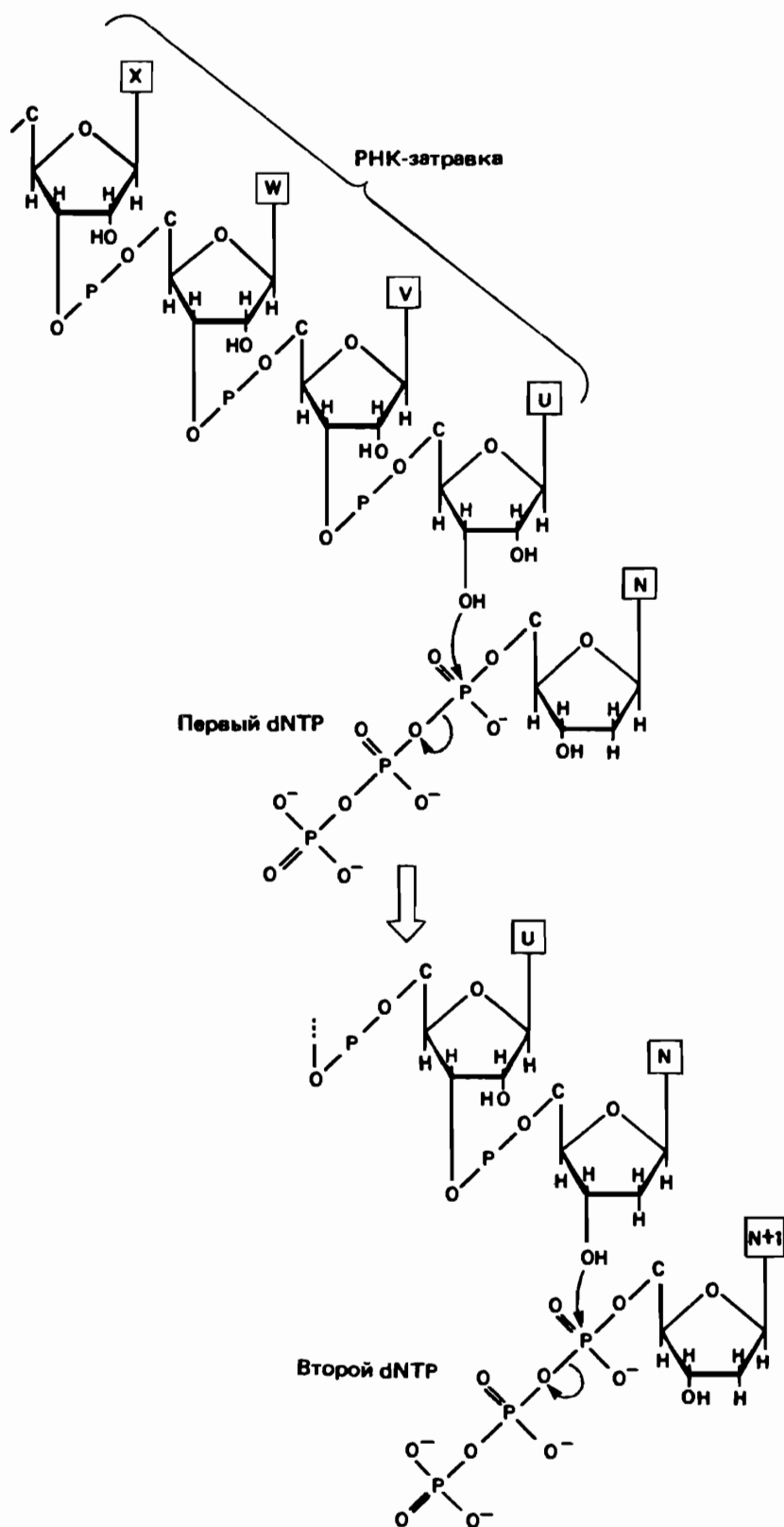


Рис. 38.13. Инициация синтеза ДНК РНК-затравкой и последующее присоединение второго дезоксирибонуклеозидтрифосфата.

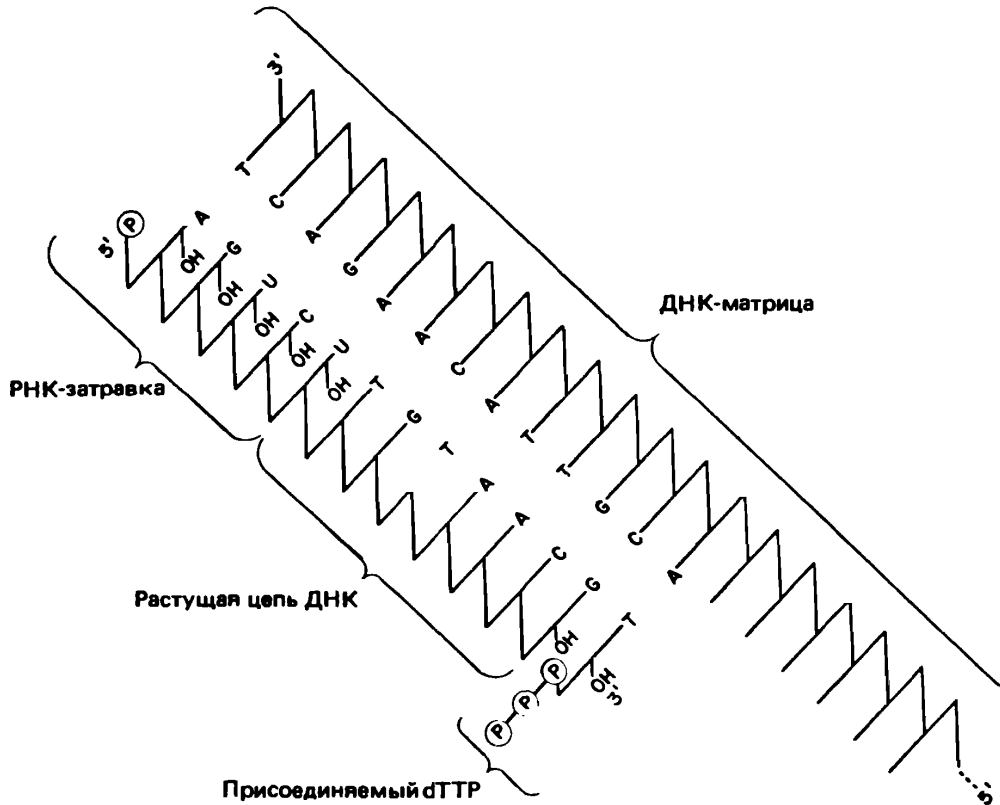


Рис. 38.14. Матричная функция ДНК-цепи при иницированном РНК-затравкой синтезе комплементарной цепи

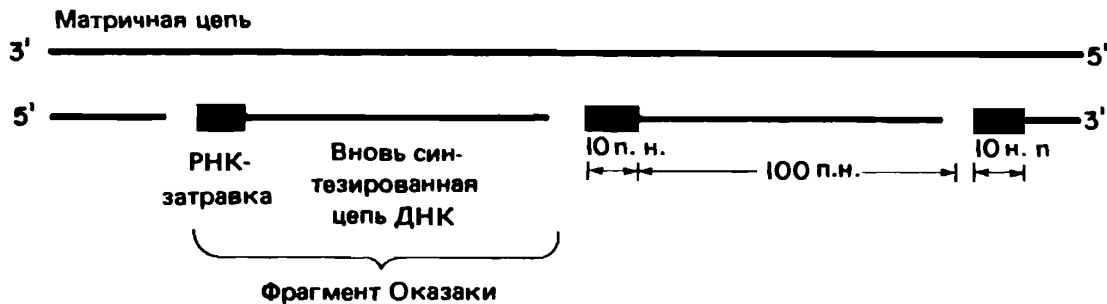


Рис. 38.15. Прерывистая полимеризация дезоксирибонуклеотидов и образование фрагментов Оказаки.

пает к удалению РНК-затравок и заполнению образующихся брешей соответствующими дезоксирибонуклеотидами. Затем с помощью **ДНК-лигазы** фрагменты «сшиваются» между собой с образованием непрерывной цепи ДНК.

Полярность репликации

Как уже отмечалось, молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей. **Репликация** ДНК у про- и эукариот происходит одновременно на **обеих цепях**. Однако фермента, ведущего синтез ДНК в направлении $3' \rightarrow 5'$, не существует, и, следовательно, вновь синтезируемые цепи, казалось бы, не могут ра-

сти в одном и том же направлении одновременно. Несмотря на это противоречие, один и тот же фермент осуществляет практически синхронный синтез обеих цепей. При этом цепь, синтезируемая в направлении $5' \rightarrow 3'$ («**лидирующая**»), оказывается непрерывной. Синтез второй («**отстающей**») цепи осуществляется фрагментами по 150—200 нуклеотидов. Очередные акты инициации синтеза этих фрагментов, происходящего в каждый данный момент также в направлении $5' \rightarrow 3'$, осуществляются по мере общего продвижения репликационной вилки в одном направлении. Схема «**полунепрерывного**» синтеза ДНК представлена на рис. 38.16.

При репликации ядерной ДНК млекопитающих

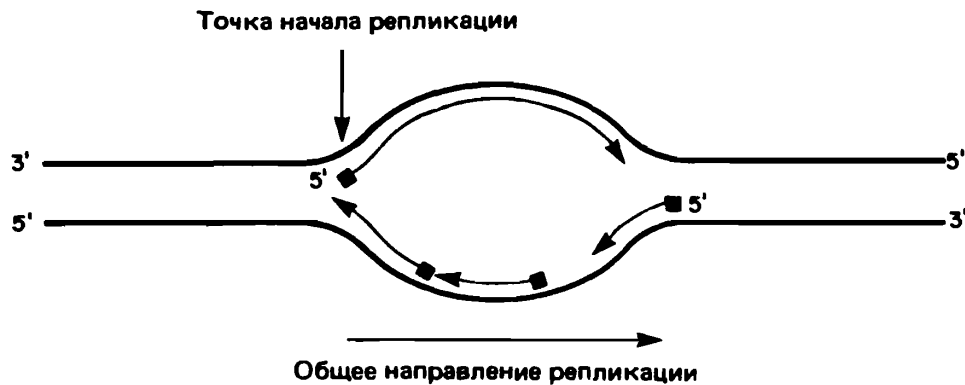


Рис. 38.16. Процесс полунепрерывной, одновременной репликации обеих цепей двухцепочечной ДНК.

большая часть РНК-праймеров в конце процесса удаляется, между тем при репликации митохондриального генома небольшие фрагменты РНК остаются интегрированными в замкнутой кольцевой молекуле ДНК.

Ферменты полимеризации и репарации ДНК

В ядрах клеток млекопитающих имеется класс полимераз, так называемых **полимераз альфа** (Pol α), ответственных за хромосомную репликацию. Одна молекула Pol α способна включать в растущую цепь около 100 нуклеотидов в секунду, таким образом она функционирует примерно в десять раз медленнее, чем бактериальная ДНК-полимераза. Снижение скорости может объясняться помехами со стороны нуклеосом. Как ДНК-полимераза преодолевает нуклеосомы — неизвестно. Однако известно, что после завершения репликации соответствующие нуклеосомы оказываются распределенными случайным образом в обеих дочерних цепях.

В ядрах клеток млекопитающих обнаружена также ДНК-полимераза с меньшей, нежели у Pol α , молекулярной массой — **полимераза бета** (Pol β), которая не участвует в обычном процессе репликации, но необходима для репарации ДНК (см. ниже). Еще одна, митохондриальная, ДНК-полимераза **гамма** (Pol

γ) осуществляет репликацию кольцевого генома митохондрий.

Полная репликация генома млекопитающих заканчивается за 9 часов — время, необходимое для удвоения генетического материала диплоидной делящейся клетки. Такая скорость свидетельствует о том, что репликация начинается сразу на многих участках, называемых **точками начала репликации** и обозначаемых *ori* (от англ. origin — начало). Таких точек (сайтов) насчитывается около 100. Репликация происходит в двух направлениях, и обе цепи реплицируются одновременно. При этом на хромосоме образуются так называемые «репликационные пузыри» (рис. 38.17).

Сайты, выполняющие роль точек начала репликации у эукариот, определены не достаточно четко. Более полные данные в этом плане имеются для дрожжей и нескольких вирусов животных. Можно сказать с уверенностью, что процессы инициации контролируются как в пространственном аспекте, так и во временном, поскольку соседние кластеры *ori* иницируются синхронно. Существует представление о том, что функциональные домены хроматина реплицируются как целостные единицы. При этом подразумевается, что точки начала репликации расположены вполне определенным образом по отношению к единицам транскрипции.



Рис. 38.17. Образование «репликационных пузырей» в процессе синтеза ДНК. Показаны двунаправленность репликации и предполагаемое расположение белков, расплетающих цепь, в репликационных вилках.

Рис. 38.18. Гипотетическая схема действия белка, специфичного к одноцепочечной ДНК в репликационной вилке. По мере синтеза второй цепи белок высвобождается и присоединяется к вновь образованным участкам одноцепочечной ДНК. (Courtesy of B. Alberts.)

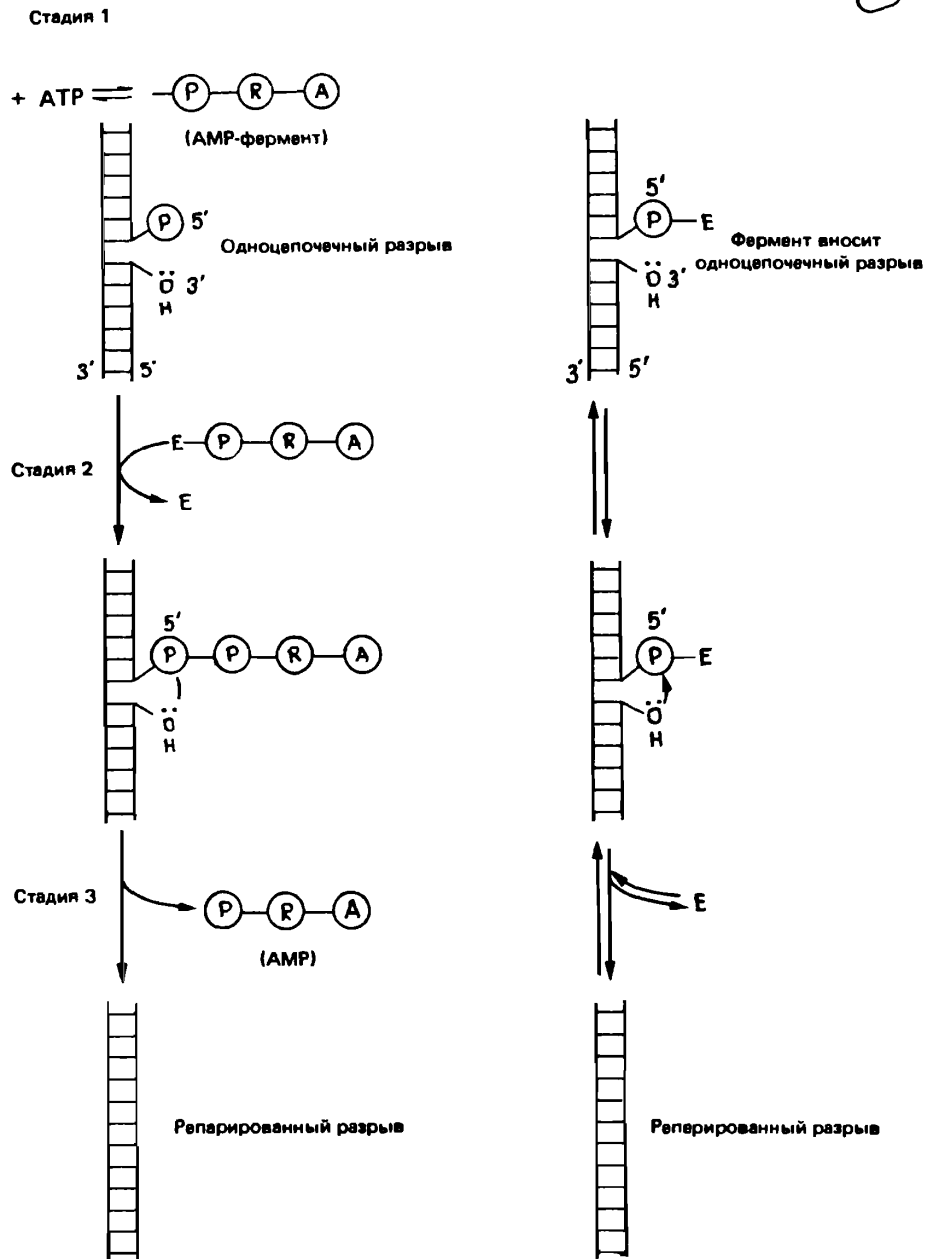
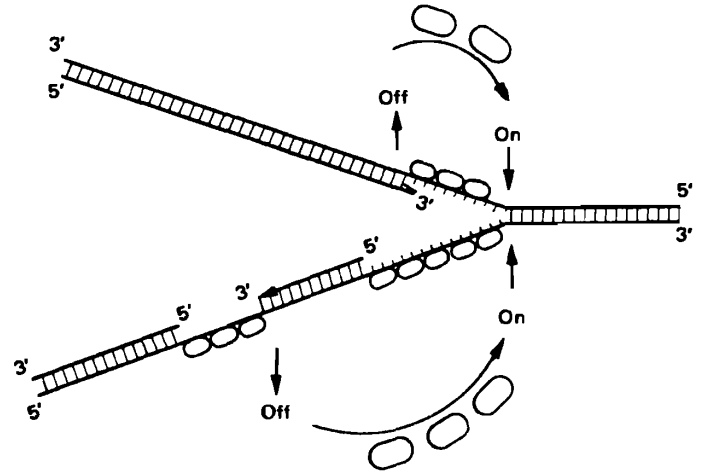


Рис. 38.19. Сравнение двух типов реакций, репарирующих одноцепочечные разрывы ДНК. Реакции, представленные слева, катализируются ДНК-лигазой, а представленные справа — ДНК-топоизомеразой. (Slightly modified and reproduced, with permission from Lehninger A. L.: Biochemistry, 2nd ed. Worth, 1975.)

При репликации двухцепочечная ДНК должна разойтись на индивидуальные цепи с тем, чтобы каждая из них могла функционировать в роли матрицы. Разделению цепей ДНК содействуют молекулы специфических белков, стабилизирующих одноцепочечную структуру при продвижении репликационной вилки. Стабилизирующие белки стехиометрически связываются с одиночной цепью, не мешая при этом нуклеотидам выступать в роли матрицы (рис. 38.18). Наряду с разделением цепей должно происходить и раскручивание спирали (1 оборот на каждые 10 нуклеотидов), сопровождаемое скручиванием вновь синтезированных дочерних цепей. Учитывая время, за которое происходит репликация у прокариот, можно рассчитать, что молекула ДНК должна раскручиваться со скоростью 400 000 об/сек, что совершенно невозможно. Следовательно, должны существовать множественные «шарниры», расположенные по всей длине молекулы ДНК. Шарнирные функции выполняет специальный фермент (ДНК-топоизомераза), вносящий разрывы в одну из цепей раскручиваемой двойной спирали. Разрывы быстро зашиваются этим же ферментом без дополнительных энергетических затрат, поскольку необходимая энергия запасается в форме макроэргической ковалентной связи, возникающей между сахарофосфатным остовом цепи ДНК и топоизомеразой. Представленную на рис. 38.19 схему этого процесса можно сравнить с последовательностью событий сшивания разрыва в ДНК, катализируемых ДНК-лигазой. ДНК-топоизомеразы ответственны также за раскручивание суперспирализованной ДНК. Суперспирализованная ДНК — это высокоупорядоченная структура, образуемая кольцевыми или сверхдлинными молекулами ДНК при закручивании вокруг гистоновое кор (рис. 38.20).

Один из классов вирусов животных (ретровирусы) обладает ферментами, способными синтезировать молекулу ДНК по матрице РНК. РНК-зависимая ДНК-полимераза, или **обратная транскриптаза** (такое название этого фермента), сначала синтезирует РНК-ДНК-гибрид, используя рибонуклеиновый ген вируса в качестве матрицы. Затем фермент РНКазы удаляет РНК-цепь, а оставшаяся ДНК-цепь в свою очередь служит матрицей для синтеза второй цепи ДНК. Таким образом возникает кДНК — двухцепочечная ДНК-копия, содержащая информацию, первично представленную в виде РНК-генома ретровируса.

Регуляция синтеза ДНК

В клетках животных и человека репликация ДНК происходит только в определенный период жизни клетки. Этот период называется синтетическим (так называемая S-фаза). S-фаза отделена от митоза предсинтетическим (G_1) и постсинтетическим (G_2)

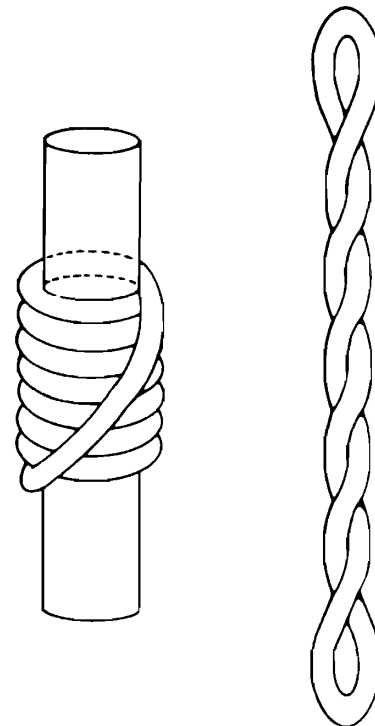


Рис. 38.20. Суперскручивание ДНК. Левозакрученная торонидная (соленидная) сверхспираль (слева) превращается в правозакрученную при удалении цилиндрического ядра. Аналогичный переход происходит при разрушении нуклеосом в случае экстракции гистонов концентрированными солевыми растворами.

периодами (рис. 38.21). Первичная регуляция клеточной синтеза собственной ДНК заключается в том, что репликация происходит в строго определенное время и в основном в клетках, готовящихся к делению. В регуляции вступления клетки в S-фазу участвуют циклические пуриновые нуклеотиды и, возможно, сами субстраты синтеза ДНК. Механизм такой регуляции остается неизвестным. Многие онковирусы способны ослаблять или разрушать внутренние информационные связи, контролирующие вступление клеток в S-фазу. И в этом случае механизм остается неясен, хотя, возможно, он включает фосфорилирование определенных белковых молекул хозяйской клетки.

В S-фазе клетки млекопитающих содержат большее количество полимеразы α , чем в несинтетические периоды клеточного цикла. Кроме того, в S-фазе усиливается активность ферментов, участвующих в образовании субстратов синтеза ДНК (дезоксирибонуклеозидтрифосфатов). Активность этих ферментов падает при выходе из S-фазы и остается на низком уровне вплоть до поступления сигнала к возобновлению синтеза ДНК. В S-фазе происходит полная и строго однократная репликация ядерной ДНК. Создается впечатление, что реплицированный хроматин каким-то образом маркируется, в резуль-

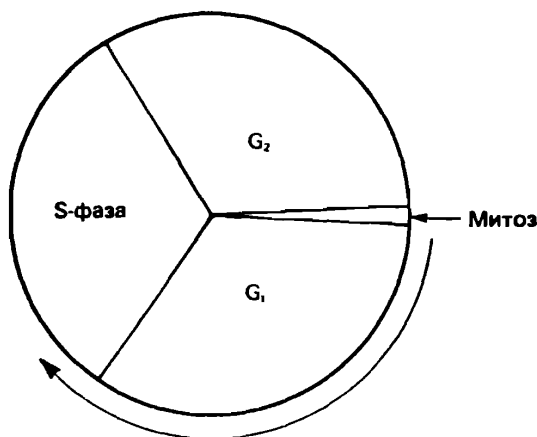


Рис. 38.21. Цикл деления клеток млекопитающих. Фаза синтеза ДНК (S-фаза) отделена от митоза периодами G₁ и G₂. (Стрелкой указано направление цикла клеточного развития.)

тате чего создаются помехи для дальнейшей репликации до тех пор, пока клетка не пройдет митоз. Можно предположить, что в качестве такого ковалентного маркера выступают метильные группы (т.е. маркирование ДНК осуществляется за счет ее метилирования).

Как правило, каждая данная пара хромосом реплицируется одновременно и в строго определенный промежуток S-фазы. Природа сигналов, регулирующих синтез ДНК на этом уровне, неизвестна, но, по-видимому, таким механизмом регуляции обладает каждая индивидуальная хромосома.

Деградация и репарация ДНК

Передача наследственной информации в неискаженном виде — важнейшее условие выживания как каждого конкретного организма, так и вида в целом. Следовательно, в ходе эволюции должна была сформироваться система, позволяющая клетке исправлять нарушения ДНК, вызванные ошибками репликации или повреждающими воздействиями окружающей среды. Подсчитано, что в результате повреждений, обусловленных этими причинами, в геноме клеток зародышевой линии человека происходит в среднем шесть нуклеотидных замен в год. По-видимому, в соматических клетках за год происходит примерно такое же число мутаций.

Как описано в гл. 37, основным условием точной репликации является правильное образование пар нуклеотидов. Точность комплементарных взаимодействий зависит от того, находятся ли пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды в благоприятной для спаривания таутомерной форме (рис. 34.7). В равновесии концентрация благоприятных таутомерных

форм нуклеотидов превышает концентрацию неблагоприятных таутомеров в 10^4 — 10^5 раз. Этого явно недостаточно для обеспечения безошибочного узнавания. Вот почему в клетках бактерий и млекопитающих существует специальная система мониторинга точности спаривания нуклеотидов. Этот этап проверяется дважды: первый раз — при включении дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в растущую цепь и второй раз — уже после включения, с использованием энергозависимого механизма удаления ошибочно встроенных нуклеотидов из вновь синтезированной нити ДНК. Благодаря такому контролю ошибки включения происходят не чаще чем 1 раз на 10^8 — 10^9 пар оснований. В клетках *E. coli* этот механизм обеспечивается ДНК-полимеразой, обладающей 3'→5'-экзонуклеазной активностью. В то же время ДНК-полимеразы млекопитающих не обладают явно выраженной корректирующей нуклеазной активностью.

Физические и химические факторы окружающей среды вызывают в ДНК повреждения четырех типов (см. табл. 38.2). Поврежденные участки могут быть подвергнуты репарации, замещены путем рекомбинации или остаться без изменений. В последнем случае возникают мутации, потенциально ведущие к гибели клетки. Возможность репарации и замещения базируется на избыточности информации закодированной в структуре двухспиральной ДНК: дефектная область одной цепи ДНК может быть исправлена по неповрежденной комплементарной цепи.

Ключевой момент всех рекомбинационных и репарационных событий — **распознавание дефекта**, сопровождающееся либо непосредственной репарацией, либо маркированием для последующего исправления. Термолабильность N-гликозидной связи пуринов приводит к депуринизации ДНК с частотой около 5000—10000 на клетку (в день) при 37° С. Места депуринизации узнаются специальными фермен-

Таблица 38.2. Типы повреждений ДНК

- | |
|--|
| I. Затрагивающие единичные нуклеотиды |
| А. Депуринизация |
| Б. Дезаминирование цитозина до урацила |
| В. Дезаминирование аденина до гипоксантина |
| Г. Алкилирование оснований |
| Д. Вставка или делеция нуклеотида |
| Е. Включение основания-аналога |
| II. Затрагивающие пару нуклеотидов |
| А. УФ-индуцируемое образование тиминовых димеров |
| Б. Поперечные сшивки бифункциональным алкилирующим агентом |
| III. Разрывы цепей |
| А. Ионизирующая радиация |
| Б. Радиоактивная дезинтеграция каркаса ДНК |
| IV. Поперечные сшивки |
| А. Между основаниями одной цепи или разных цепей |
| Б. Между ДНК и молекулами белка (например, гистонами) |

тами, специфически заполняющими брешь без разрыва фосфодиэфирного остова молекулы.

Как цитозиновые, так и адениновые основания спонтанно дезаминируются с образованием урацила и гипоксантина соответственно. Поскольку в норме ДНК не содержит ни урацила, ни гипоксантина, нет ничего удивительного в том, что специфические N-гликозилазы узнают эти аномальные основания и удаляют их. Образовавшийся разрыв служит сигналом для действия репарационных пурин- или пиримидинспецифичных эндонуклеаз, расщепляющих фосфодиэфирную связь возле соответствующего участка повреждения. После этого при последовательном действии экзонуклеазы, репарационной ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы происходит заполнение брешы и восстановление исходной правильной структуры (рис. 38.22). Эта цепь событий получила название **эксцизионной репарации**. Сходным образом происходит процесс репарации ДНК, содержащей алкилированные основания и аналоги оснований.

Восстановление делеций и удаление вставок происходит при помощи рекомбинационных процессов, которые могут протекать либо с участием репликации, либо без нее.

Ультрафиолетовое излучение индуцирует образование пиримидин-пиримидиновых димеров. Этот

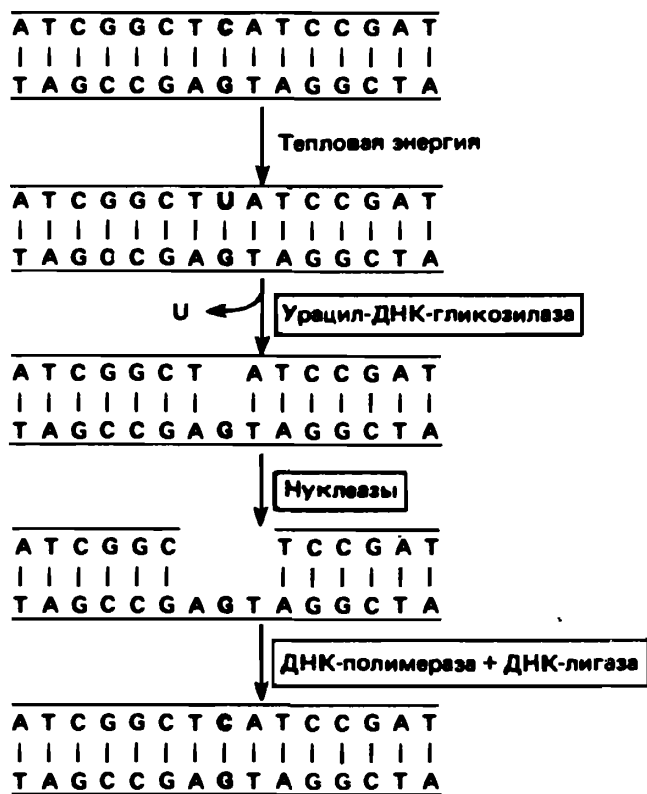


Рис. 38.22. Фермент урацил-ДНК-гликозилаза удаляет урацил, возникающий при спонтанном дезаминировании цитозина. (Courtesy of B. Alberts.)

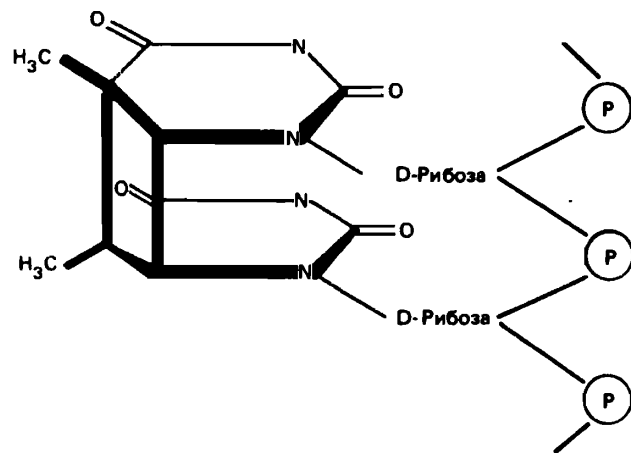


Рис. 38.23. Тимин-тиминовый димер, образующийся при связывании рядом расположенных тиминовых оснований.

процесс затрагивает преимущественно расположенные друг под другом тиминовые основания одной цепи (рис. 38.23). Для удаления тиминовых димеров в клетке существуют два механизма: эксцизионная репарация и фотореактивация. Этот способ репарации подразумевает фотоактивацию видимым светом специфического фермента, который обращает процесс, приведший к образованию димерной структуры.

Одноцепочечные разрывы ДНК, вызванные ионизирующей радиацией, могут быть репарированы прямым лигированием или рекомбинацией. Механизмы, вовлеченные в репарацию поперечных сшивок между основаниями противоположных цепей или между ДНК и белками, изучены недостаточно.

Итак, репарация повреждений, вызванных ионизирующей радиацией и алкилированием оснований, осуществляется путем вырезания и ресинтеза коротких участков ДНК. Удаление повреждений, вызванных ультрафиолетовым облучением, а также поперечных сшивок достигается аналогичным путем, но в этом случае затрагиваются более протяженные участки ДНК. В клетках млекопитающих о протекании репарационной репликации свидетельствует внеплановый синтез ДНК, т.е. включение в ДНК радиоактивных предшественников вне S-фазы.

При интенсификации процессов эксцизионной репарации в ответ на повреждающие воздействия в клетках млекопитающих усиливается активность фермента поли(ADP-рибозил)-полимеразы. Этот фермент при участии кофермента NAD^+ осуществляет реакцию ADP-рибозилирования белков хроматина. В основном происходит моно-ADP-рибозилирование, однако иногда имеет место присоединение гомополимерных цепочек (ADP-рибоза) $_n$. Функция поли(ADP-рибозил)-полимеразы или ее продукта — (ADP-рибоза) $_n$ — в процессе эксцизионной репарации не вполне ясна. Наблюдается корреляция во времени между интенсификацией

процессов репарации и увеличением активности фермента. Специфическое ингибирование активности данного фермента препятствует устранению разрывов в цепи ДНК. Увеличение активности *pol* γ (ADP-рибозил)полимеразы вызывается, по-видимому, фрагментацией ДНК в ядре. Такая фрагментация может быть индуцирована в первую очередь физическими агентами (например, рентгеновским излучением), кроме того, она может происходить неадекватно интенсивно в ходе репарации ультрафиолетовых повреждений или повреждений, вызванных алкилирующими агентами. Возрастание активности фермента, вызванное разрывами ДНК, бывает настолько велико, что может привести к истощению внутриклеточного запаса кофермента NAD⁺.

Пигментная ксеродерма — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание. Клинический синдром включает чувствительность к солнечному свету (ультрафиолет), что приводит к образованию множества очагов рака кожи и летальному исходу. Это заболевание, по-видимому, связано с нарушениями репарационных процессов. В культивируемых клетках больных пигментной ксеродермой снижена интенсивность фотореактивации тиминовых димеров. Однако собственно генетические нарушения, приводящие к пигментной ксеродерме, насчитывают по меньшей мере 7 комплементационных групп, что указывает на комплексность причин, вызывающих данное заболевание.

При пигментной ксеродерме в клетках большинства (если не всех) комплементационных групп наблюдаются аномалии в скорости и интенсивности ответа поли(ADP-рибозил)-полимеразы на ультрафиолетовое облучение. В клетках по крайней мере одной комплементационной группы снижение активности фермента, по-видимому, связано с неспособностью разрезать цепь ДНК у поврежденного сайта,

поскольку добавление к таким дефектным клеткам дезоксирибонуклеазы нормализует уровень активности поли(ADP-рибозил)-полимеразы.

У больных с **атаксией-телеангиэктазией** (аутосомно-рецессивное заболевание, приводящее к мозжечковой атаксии и лимфоретикулярной неоплазме) повышена чувствительность к рентгеновскому облучению. У больных **анемией Фанкони** (аутосомно-рецессивная анемия, сопровождающаяся повышенной частотой онкологических заболеваний и хромосомной нестабильностью), вероятно, нарушена система репарации поперечных сшивок. Для всех трех описанных синдромов характерна повышенная частота возникновения опухолей. Вполне возможно, что в недалеком будущем будут выявлены другие заболевания человека, вызванные нарушениями в системе репарации повреждений ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Bauer W. R. et al. Supercoiled DNA, Sci. Am. (July), 1980, **243**, 118.
Cantor C. R. DNA choreography, Cell, 1981, **25**, 293.
Igo-Kemenes T., Hörz W., Zachau H. G. Chromatin, Annu. Rev. Biochem., 1982, **51**, 89.
Jelinek W. R., Schmid C. W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression, Annu. Rev. Biochem., 1982, **51**, 813.
Jongstra J. et al. Induction of altered chromatin structures by simian virus 40 enhancer and promoter elements, Nature, 1984, **307**, 708.
Kornberg A. DNA Replication, Freeman, 1980.
Lindahl T. DNA repair enzymes, Annu. Rev. Biochem., 1982, **51**, 61.
Loeb L. A., Kunkel T. A. Fidelity of DNA synthesis, Annu. Rev. Biochem., 1982, **51**, 429.
McGhee J. D., Felsenfeld G. Nucleosome structure, Annu. Rev. Biochem., 1980, **49**, 1115.
Nossal N. G. Prokaryotic DNA replication systems, Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 581.

Синтез и процессинг РНК

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМУ И ЕЕ БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Синтез РНК на матрице ДНК представляет собой сложный процесс, в котором участвуют РНК-полимераза и другие ферменты. Образование первичного РНК-транскрипта включает несколько стадий: инициацию, элонгацию и терминацию. Больше всего известно об инициации. Идентифицирован ряд последовательностей ДНК (как правило, предшествующих сайту инициации), а также белковых факторов, связывающихся с этими последовательностями и регулирующих инициацию транскрипции. Лучше всего этот процесс изучен для прокариот и вирусов, хотя в последние годы достигнуты большие успехи в расшифровке механизма транскрипции в клетках млекопитающих. Любые изменения, затрагивающие синтез РНК, немедленно отражаются на уровне синтеза белка и приводят к различным метаболическим сдвигам в клетке. Благодаря таким модуляциям синтеза РНК организм может приспосабливаться к меняющимся условиям окружающей среды.

Молекулы РНК, синтезированные в клетках млекопитающих, часто сильно отличаются от молекул РНК, транскрибированных в прокариотических клетках. Особенно это касается мРНК-транскриптов. Прокариотические мРНК могут быть транслированы в том виде, какой они имеют после транскрип-

ции. Большинство же мРНК млекопитающих синтезируется в виде молекул-предшественников, которые должны пройти этап процессинга с образованием зрелой, т. е. активной мРНК. Ошибки процессинга и сплайсинга мРНК-транскриптов могут служить причиной ряда заболеваний, например вызывать определенные виды талассемии (см. гл. 36).

СИНТЕЗ РНК

Процесс синтеза РНК по ДНК-матрице наиболее полно охарактеризован для прокариот. Хотя в клетках млекопитающих регуляция синтеза и процессинг РНК отличаются от прокариотических систем, сами процессы синтеза РНК у обоих типов организмов практически одинаковы. Вот почему описание синтеза РНК у прокариот вполне приложимо и к эукариотическим клеткам, несмотря на то что ферменты и регуляторные сигналы синтеза РНК различаются.

Последовательность рибонуклеотидов в молекуле РНК комплементарна последовательности дезоксирибонуклеотидов одной из цепей ДНК (рис. 37.8). Та из двух цепей ДНК, по которой непосредственно идет транскрипция РНК-молекул, называется **кодирующей цепью**. Другую цепь часто называют **некодирующей цепью** соответствующего гена. Важно понимать, что в двухцепочечной ДНК, содержащей много генов, кодирующая цепь каждого данного гена вовсе не обязательно представлена в рамках одной и той же цепи ДНК (рис. 39.1). Другими словами, одна цепь молекулы ДНК для одних генов является кодирующей, а для других соответственно — некодирующей. Обратите внимание, что, за исключением замещения Т на U, последовательность РНК-транскрипта идентична некодирующей цепи.

ДНК-зависимая РНК-полимераза — это фермент, полимеризующий рибонуклеотиды в последовательность, комплементарную кодирующей цепи гена (рис. 39.2). Фермент связывается с определенным участком кодирующей цепи, называемым **промотом**. Затем в стартовой точке иницируется синтез

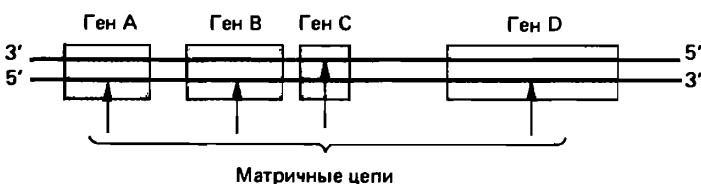


Рис. 39.1. Матричные (кодирующие) цепи различных сцепленных генов. Ими могут быть разные цепи двухцепочечной ДНК.

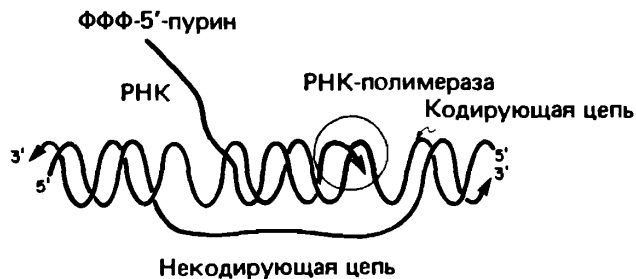


Рис. 39.2. Полимеризация рибонуклеотидов в последовательность РНК, комплементарную кодирующей цепи гена. Реакция катализируется РНК-полимеразой. (From: J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 3rd. ed., Copyright 1976, 1970, 1965, by W. A. Benjamin Inc. Menlo Park, Calif.)

терминирующая последовательность. Область транскрибируемой ДНК между промотором и терминатором называется **единицей транскрипции**. Образующаяся при этом молекула РНК, синтезируемая в направлении $5' \rightarrow 3'$, называется **первичным транскриптом**. В прокариотических организмах первичный транскрипт часто содержит РНК-копии сразу нескольких генов, а у эукариот, как правило, — лишь единичного гена. 5'-Концы первичного прокариотического транскрипта и зрелой цитоплазматической РНК идентичны. Это означает, что **стартовая точка транскрипции соответствует 5'-нуклеотиду мРНК**. У эукариот первичные транскрипты, синтезированные РНК-полимеразой II, тут же модифицируются посредством присоединения «кэпа» — 7-метилгуанозинтрифосфата (рис. 37.10) (он постоянно присутствует на 5'-конце зрелых цитоплазматических мРНК). По-видимому, кэпирование необходимо как для процесса созревания первичного транскрипта, так и для последующей трансляции зрелой мРНК.

Молекула ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* состоит из четырех субъединиц — двух идентичных (α -субъединицы) и еще двух — близких по размеру, но не идентичных (β -и β' -субъединицы). Для осуществления полимеразной функции должен образоваться холофермент — комплекс так называемого кор-фермента, т.е. собственно РНК-полимеразы, с дополнительным белковым фактором (σ -фактор), способствующим более прочному связыванию полимеразы со специфической промоторной последовательностью ДНК. Бактерии продуцируют множество различных σ -факторов, каждый из которых функционирует в роли регулятора, модулирующего промоторную специфичность РНК-полимеразы. Появление различных σ -факторов коррелирует во времени с запуском различных «комплексных программ» экспрессии определенного набора генов в прокариотических системах, таких, как развитие

бактериофагов, споруляция или ответ на тепловой шок.

Процесс синтеза РНК, изображенный на рис. 39.3, включает связывание РНК-полимеразного комплекса с ДНК-матрицей в промоторной области. Вслед за этапом инициации синтеза РНК высвобождается σ -фактор и происходит элонгация синтеза РНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ антипараллельно матричной цепи ДНК. Фермент полимеризует рибонуклеотиды в определенной последовательности, отражающей структуру кодирующей цепи в соответствии с принципом комплементарности. В ходе реакции высвобождается пиррофосфат. И в прокариотических, и в эукариотических организмах полимеризация РНК начинается обычно с пуринового рибонуклеотида.

По мере продвижения комплекса элонгации, содержащего РНК-полимеразу (кор-фермент) по кодирующей цепи, должно происходить **расплетание ДНК**. Оно необходимо для правильного образования комплементарных пар со встраиваемыми в цепь РНК рибонуклеотидами. Размер расплетенного участка ДНК постоянен в течение всего процесса транскрипции и составляет около 17 пар на молекулу полимеразы (судя по всему, он не зависит от транскрибируемой последовательности ДНК). Это позволяет предположить, что РНК-полимераза ассоциирована с дополнительным фактором, проявляющим расплетающую активность, благодаря которой и раскрывается спираль ДНК. Тот факт, что для протекания транскрипции двойная спираль ДНК должна развернуться, а цепи разойтись (по крайней мере временно), означает неизбежность некоторого нарушения структуры нуклеосом.

Сигнал терминирования синтеза молекулы РНК представляет собой определенную последовательность, расположенную в рамках кодирующей цепи ДНК. Этот сигнал распознается терминирующим белком — ρ -фактором. После терминирования 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. Электронная микрофотография синтеза РНК представлена на рис. 39.4.

В клетках млекопитающих обнаружено несколько типов ДНК-зависимых РНК-полимераз. Их свойства представлены в табл. 39.1. По-видимому, каждый из этих ферментов отвечает за транскрипцию различных наборов генов. Молекулярные массы трех важнейших классов РНК-полимераз млекопитающих варьируют в пределах 500 000—600 000. Их

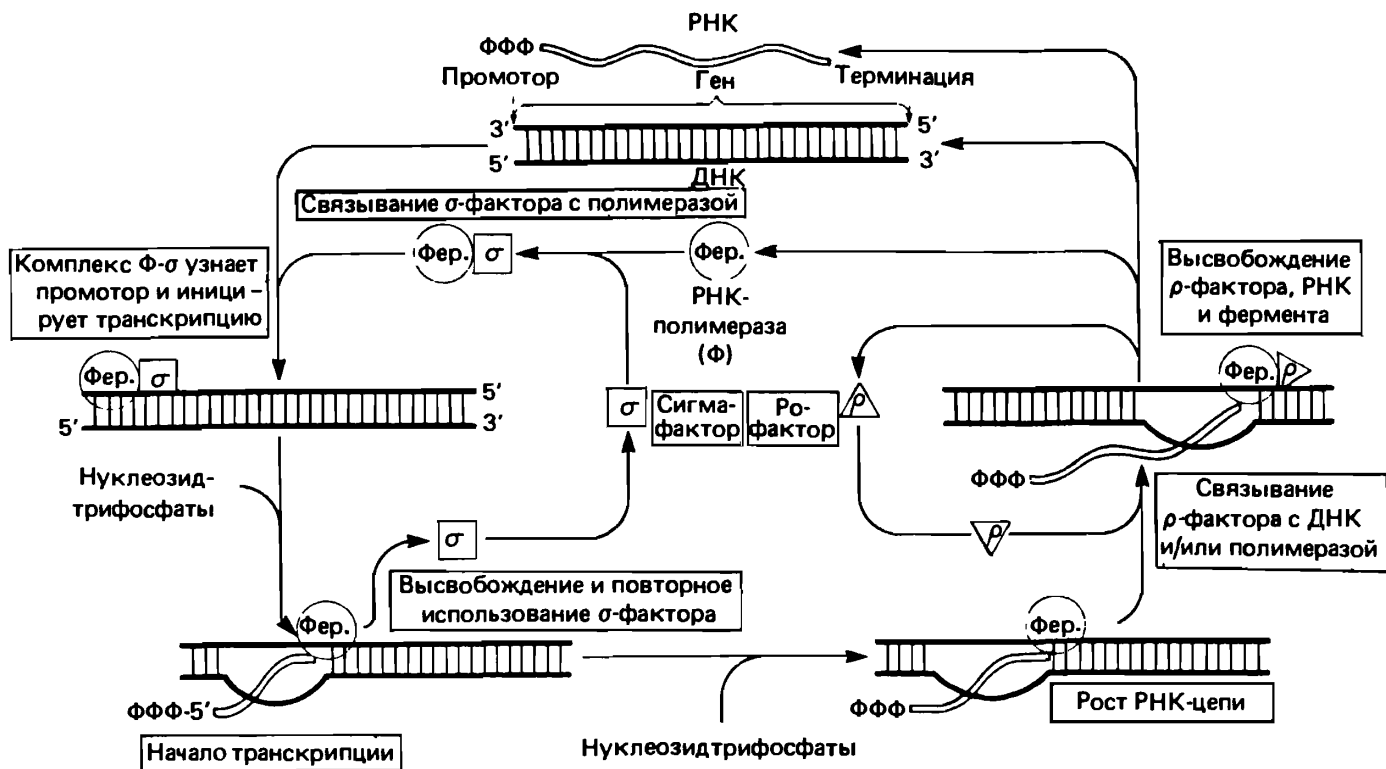


Рис. 39.3. Процесс синтеза РНК. Начало процесса показано слева сверху, где сигма-фактор, соединяясь с кор-ферментом РНК-полимеразы, образует комплекс, способный узнавать промотор и начать транскрипцию. Процесс заканчивается высвобождением РНК-полимеразы. Свободная полимеразы и другие высвобожденные каталитические факторы могут принять участие в новом акте транскрипции. Символом Фер. обозначен фермент. (From J. D. Watson, Molecular Biology of the Gene, 3rd ed., Copyright 1976, 1970, 1965 by W. A. Benjamin Inc. Marlo Park, Calif.)

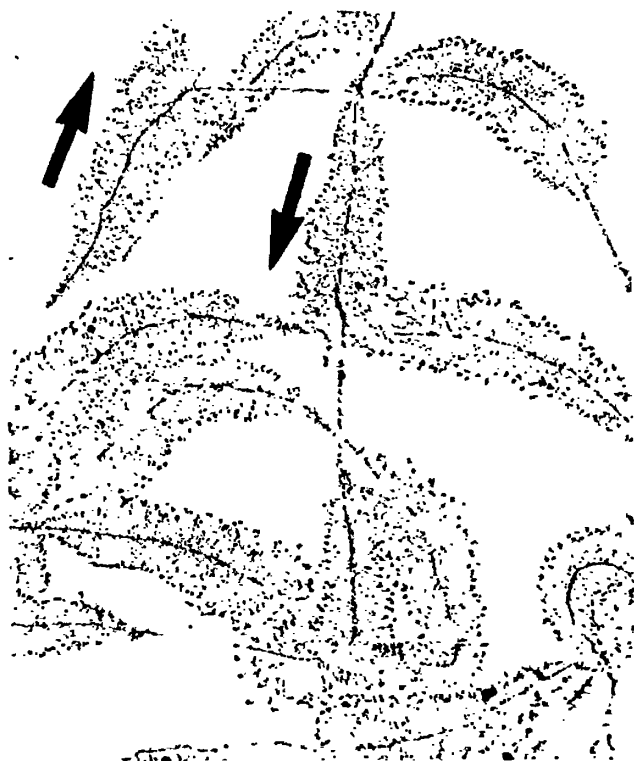


Таблица 39.1. Номенклатура и локализация ДНК-зависимых РНК-полимераз животных

Класс фермента	Чувствительность к α-аманитину	Продукты	Локализация
I (A)	Нечувствительный	рРНК	Ядрышко
II (B)	Чувствителен к низким концентрациям (10^{-8} — 10^{-9} моль/л)	гяРНК (мРНК)	Нуклеоплазма
III (C)	Чувствителен к высоким концентрациям	тРНК и 5S-РНК	Нуклеоплазма

Рис. 39.4. Электронная микрофотография множественных копий транскрибируемых генов рибосомной РНК клеток амфибий. Увеличение $\times 6000$. На фотографии видно, что при продвижении РНК-полимеразы вдоль гена длина транскрипта увеличивается. С ближним концом гена связан короткий транскрипт, а с дальним концом — гораздо более протяженный. Стрелками указано направление ($5' \rightarrow 3'$) транскрипции. (Reproduced with permission from Miller O. L. Jr, Beatty B. R., Portrait of a Gene. J. Cell Physiol. 1969. 74 [Suppl. 1]:225.)

структура имеет много общего со структурой бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Все они имеют по две больших субъединицы и по несколько малых субъединиц. Недавние работы по клонированию и секвенированию продемонстрировали сходство аминокислотных последовательностей эукариотических и прокариотических РНК-полимераз. Функции индивидуальных субъединиц пока не выяснены. Некоторые из них могут нести регуляторные функции, осуществляя узнавание специфических последовательностей промотора и терминатора.

Один из токсинов — α -аманитин, продуцируемый грибом *Amantia phalloides*, является специфическим ингибитором нуклеоплазматической ДНК-зависимой РНК-полимеразы (РНК-полимеразы II), благодаря чему его удалось эффективно использовать во многих молекулярно-биологических исследованиях (см. табл. 39.1).

Сигналы транскрипции

Анализ нуклеотидной последовательности клонированных генов позволил выявить ряд областей ДНК, играющих существенную роль в процессах транскрипции. На основе изучения большого числа бактериальных генов стало возможным построение консенсусных моделей последовательностей, выполняющих функции промоторов и терминаторов транскрипции. Бактериальные промоторы состоят примерно из 40 нуклеотидных пар (4 витка двойной спирали ДНК), т.е. они достаточно малы, чтобы полностью закрываться РНК-холополимеразным комплексом *E. coli*. В рамках консенсусной структуры промотора выявлены два коротких консервативных элемента. На расстоянии около 35 нуклеотидных пар в сторону 5'-конца от точки начала транскрипции находится восьмичленная последовательность, изображенная на рис. 39.5. На более близком расстоянии к точке инициации транскрипции (около

10 нуклеотидов) расположен 6-членный АТ-богатый участок. Он имеет относительно низкую температуру плавления из-за отсутствия ГС-пар. В связи с этим считается, что на данном участке, называемом **ТАТА-последовательностью** (а также **Прибнов-боксом**), легко происходит диссоциация цепей ДНК так, что РНК-полимераза, связанная с областью промотора, получает доступ к участку последовательности кодирующей цепи, непосредственно прилегающему к промотору со стороны 3'.

Как показано на рис. 39.6, ρ -зависимые сигналы терминации транскрипции в клетках *E. coli* также характеризуются определенной консенсусной структурой. Консервативная последовательность терминатора, состоящая примерно из 40 нуклеотидов, содержит разнесенные на некоторое расстояние инвертированные повторы и заканчивается серией АТ-пар. РНК-транскрипт, образовавшийся после прохождения транскрипционного комплекса через область инвертированных повторов, может формировать внутримолекулярную шпильчатую структуру, изображенную на рис. 39.6. Транскрипция продолжается далее в вышеупомянутую АТ-область, после чего под воздействием специфического белка-терминатора, так называемого ρ -фактора, РНК-полимеразный комплекс останавливается и диссоциирует, высвобождая первичный РНК-транскрипт.

Транскрипционные сигналы генов млекопитающих, как и следовало ожидать, организованы более сложно. Данные, полученные с помощью генной инженерии, свидетельствуют о наличии нескольких типов сигналов, контролирующих транскрипцию. Вблизи собственно промоторной области расположены сигнальные последовательности двух типов. Одна из них указывает, где должна начаться транскрипция, а другая определяет, как часто должно происходить это событие. В гене тимидинкиназы вируса герпеса, использующего транскрипционную систему хозяина для экспрессии собственных генов, существует один уникальный сайт инициации транскрип-

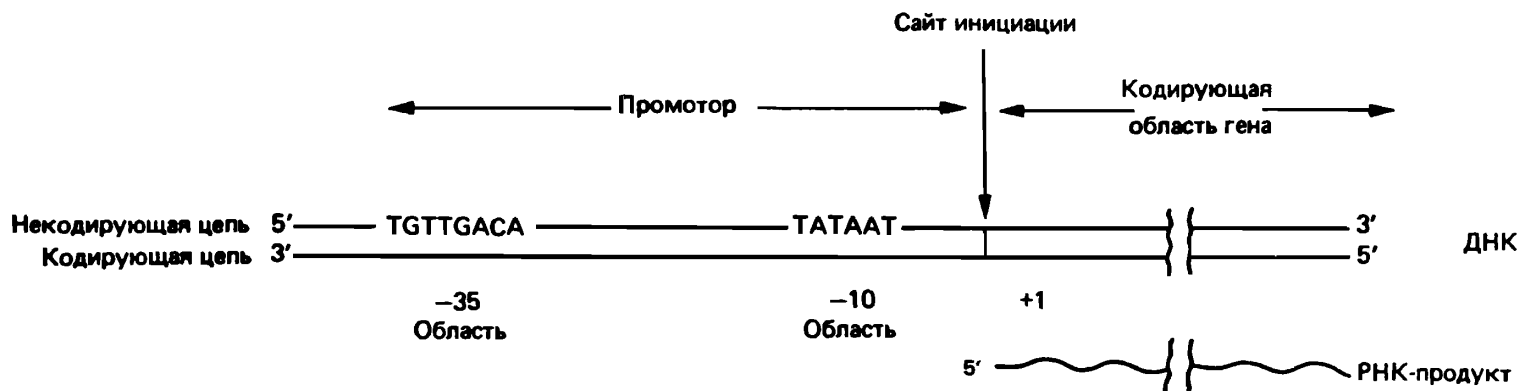


Рис. 39.5. Бактериальные промоторы содержат две высококонсервативные последовательности, отстоящие на 35 и 10 нуклеотидов со стороны 5'-конца от точки инициации транскрипции, обозначенной +1.

Дополнительная регуляция экспрессии

Базовая регуляция экспрессии

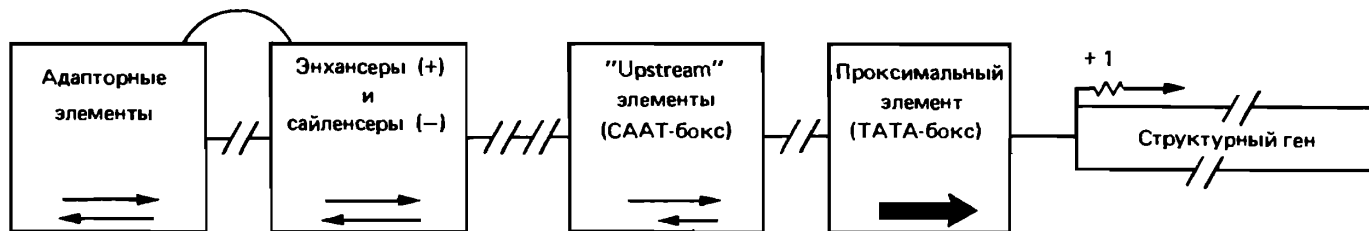


Рис. 39.8. Схема организации регуляторных блоков типичного эукариотического гена. В функциональном гене можно выделить регуляторную и структурную области, разделенные сайтом инициации транскрипции (показан стрелкой). Регуляторная область состоит из двух элементов, определяющих базовый уровень экспрессии. Проксимальный элемент, ТАТА-бокс, направляет РНК-полимеразу к сайту инициации транскрипции и, следовательно, определяет точность начала синтеза РНК. Другой регуляторный элемент (upstream) контролирует частоту, с которой происходит инициация транскрипции. Наиболее изученным регуляторным элементом этого класса является так называемый СААТ-бокс, однако в других генах могут использоваться и иные элементы. В регуляции экспрессии участвуют также энхансеры и сайленсеры — элементы, усиливающие или ослабляющие базовый уровень транскрипции, и элементы, регулирующие экспрессию определенных генов в ответ на различные сигналы (включая гормоны, тепловой шок, ионы металлов, некоторые химические препараты). Сюда же относятся и функционально подобные элементы, обуславливающие тканевую специфичность экспрессии генов. Возможно, что два последних блока регуляторных элементов функционально перекрываются (показано соединяющей линией). Зависимость функции элемента данного типа от ориентации указана стрелками. Так, проксимальный элемент обязательно должен быть в ориентации $5' \rightarrow 3'$. СААТ-бокс и аналогичные ему элементы наиболее эффективно работают в ориентации $5' \rightarrow 3'$, но некоторые функционируют в обеих ориентациях. Разорванные линии между квадратами указывают на то, что положения данных элементов относительно сайта инициации транскрипции строго не фиксированы. В действительности элементы регуляции экспрессии могут быть расположены также и правее (т. е. ближе к $3'$ -концу) сайта инициации транскрипции.

висимости от оказываемого ими эффекта называют «энхансерами» или «сайленсерами» соответственно. Они могут быть расположены как до (со стороны $5'$), так и после (со стороны $3'$) сайта инициации транскрипции. В отличие от промоторных последовательностей энхансеры и сайленсеры могут оказывать *цис*-эффект на расстоянии сотен и тысяч оснований от соответствующей транскрипционной единицы. Их функционирование не зависит от ориентации.

И наконец, известен еще один класс регуляторных элементов, обеспечивающих адаптивную регуляцию экспрессии некоторых генов. Представителями этого класса являются регуляторные элементы, чувствительные к гормонам (стероидам, T_3 , ТРГ, сАМР, пролактину и т. д.; см. гл. 44). Сюда же включены элементы, специфически регулирующие клеточный ответ на тепловой шок, действие металлов (Cd^{2+} и Zn^{2+}) и некоторых химических токсинов (диоксин). К этому классу относятся и определенные участки последовательности ДНК, ответственные за регуляцию тканеспецифичной экспрессии генов, например гена альбумина в печени. Некоторые из таких адаптационных структур функционируют подобно сайленсерам или энхансерам (так регуляторный элемент, чувствительный к глюкокортикоидным гормонам, действует как энхансер).

Общее свойство всех регуляторных элементов, как основных, так и дополнительных, состоит в том, что их функционирование зависит от взаимодей-

ствия определенных участков ДНК со специфическими белковыми факторами. Множество таких белковых факторов было идентифицировано (табл. 39.2). Изучению механизма влияния таких ДНК-белковых

Таблица 39.2. Некоторые регуляторные элементы, контролирующие транскрипцию, и связывающиеся с ними факторы, найденные для генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II

Элемент	Фактор
ТАТА-бокс	ТАТА-связывающийся белок
СААТ-бокс	СААТ-связывающийся белок
TGG(N) ₆₋₇ GCCAA	NF-1 (ядерный фактор 1)
GGGCCG	SP-1
ATTTCGAT	NF-A (ядерный фактор А гена иммуноглобулина)
Энхансеры	Многочисленные
CNNGAANN TTCNNG	Фактор транскрипции белков теплового шока
TGTTCT (глюкокортикоидный регуляторный элемент, GRE)	Глюкокортикоидный рецептор
GGCCACGTGACC	USF (5'-фактор) } из аденови- или MLTF (ос- } руса новной фактор } транскрипции позднего про- мотора)

взаимодействий на транскрипцию генов посвящено значительное число исследований.

Сигналы терминирования транскрипции, направляемой эукариотической РНК-полимеразой II, изучены очень плохо. Однако есть основания считать, что сигналы терминирования расположены на значительном расстоянии от 3'-конца кодирующей области эукариотических генов. Например, сигналы терминирования транскрипции гена β -глобина мыши обнаружены в нескольких местах на расстоянии 1000—2000 оснований далее сайта, по которому обычно происходит полиаденилирование транскрипта. Мало что известно о самом процессе терминирования. Неизвестно, участвуют ли в терминировании какие-либо специфические белковые факторы, подобные ρ -фактору бактерий. 3'-Конец зрелой мРНК генерируется уже после завершения транскрипции, по-видимому, в два этапа. После того как РНК-полимераза II пройдет область, кодирующую 3'-конец транскрипта, первичный транскрипт расщепляется РНК-эндонуклеазой в области, отстоящей от консенсусной 3'-последовательности AAUAAA на 15 оснований. По-видимому, в эукариотических транскриптах последовательность AAUAAA выполняет функцию сигнала разрезания РНК. Затем вновь образованный 3'-конец полиаденилируется в нуклеоплазме, как описано ниже.

ДНК-зависимая РНК-полимераза III, транскрибирующая гены тРНК и малых ядерных РНК (мяРНК, см. гл. 37), узнает **внутригенный** промотор, расположенный непосредственно в рамках транскрибируемой последовательности. В случае эукариотических генов тРНК функцию внутригенного промотора выполняют два отдельных внутренних блока последовательностей. Они транскрибируются, сохраняются в зрелой тРНК в высококонсервативной области и участвуют в образовании ДНУ- и ТΨС-петель соответственно (рис. 37.11). При изучении структуры генов тРНК *in vitro* было показано, что для выполнения промоторных функций расстояние между двумя блоками должно составлять 30—40 пар оснований. Транскрипция инициируется на участке между 10- и 16-м нуклеотидом перед блоком А. Что касается гена 5S-РНК, также транскрибируемого РНК-полимеразой III, то для него выявлено взаимодействие со специфическим белковым фактором транскрипции. Судя по всему, связываясь с внутригенным промотором, этот фактор взаимодействует с РНК-полимеразой III, контролируя точность расположения каталитического центра фермента в точке инициации транскрипции.

ПРОЦЕССИНГ МОЛЕКУЛ РНК

У прокариотических организмов первичные транскрипты мРНК-кодирующих генов начинают использоваться в качестве матриц белкового синтеза

еще до полного завершения транскрипции. Транскрипция и трансляция у прокариот — это сопряженный процесс. Транскрипты прокариотических рРНК и тРНК имеют гораздо большую протяженность, чем соответствующие зрелые молекулы РНК. Так, многие тРНК-транскрипты содержат более одной молекулы тРНК. Таким образом, для прокариотических организмов процессинг первичных рРНК- и тРНК-транскриптов является необходимым этапом образования зрелых молекул.

Практически все первичные транскрипты РНК у эукариот подвергаются сложному процессингу в период между их синтезом и началом реализации ими соответствующей функции — в роли мРНК или в роли самостоятельных структурных факторов, таких, как рРНК, 5SРНК или тРНК. Процессинг происходит в первую очередь в самом ядре. Процессинг включает **кэпирование, реакции расщепления и лигирования, присоединение дополнительных концевых нуклеотидов и нуклеозидную модификацию**. От 50 до 75% ядерной РНК млекопитающих, включая и 5'-кэпированные цепи, не входит в дальнейшем в состав цитоплазматических мРНК. Эта величина внутриядерной потери РНК значительно выше, чем та, которую можно подсчитать, учитывая только удаление некодирующих областей транскриптов (см. ниже). Точная функция «избыточной» РНК ядра клеток млекопитающих остается пока неизвестной.

Благодаря развитию методов рестрикционного картирования и секвенирования молекул ДНК удалось установить, что во многих генах эукариот между экзонами (т.е. кодирующими фрагментами последовательности) располагаются протяженные участки ДНК, не несущие генетической информации, непосредственно транслируемой в аминокислотную последовательность белков (см. гл. 38). Такие промежуточные последовательности, или **интроны**, обнаруживаются в большинстве, но не во всех генах высших эукариот. Первичные транскрипты структурных генов включают и участки, соответствующие интронам. В ходе процесса, называемого «сплайсинг», эти участки первичного транскрипта точно вырезаются, а соответствующие экзоны — сшиваются. Процесс протекает в ядре, затем сформировавшиеся молекулы мРНК выходят в цитоплазму, где и происходит их трансляция (рис. 39.9).

До сих пор неизвестны точные механизмы безошибочного вырезания интронов и сшивания экзонов, транспорта РНК в цитоплазму. Однако исследования последних лет дали много новой информации об этих процессах. Хотя последовательности нуклеотидов в интронах даже в пределах одного транскрипта очень гетерогенны, удается выявить консенсусную последовательность для каждого из двух участков соединения интронов с экзонами (сайтов сплайсинга) (рис. 39.10). **Консенсусная последовательность сайтов сплайсинга** на границе интрон—экзон не настолько

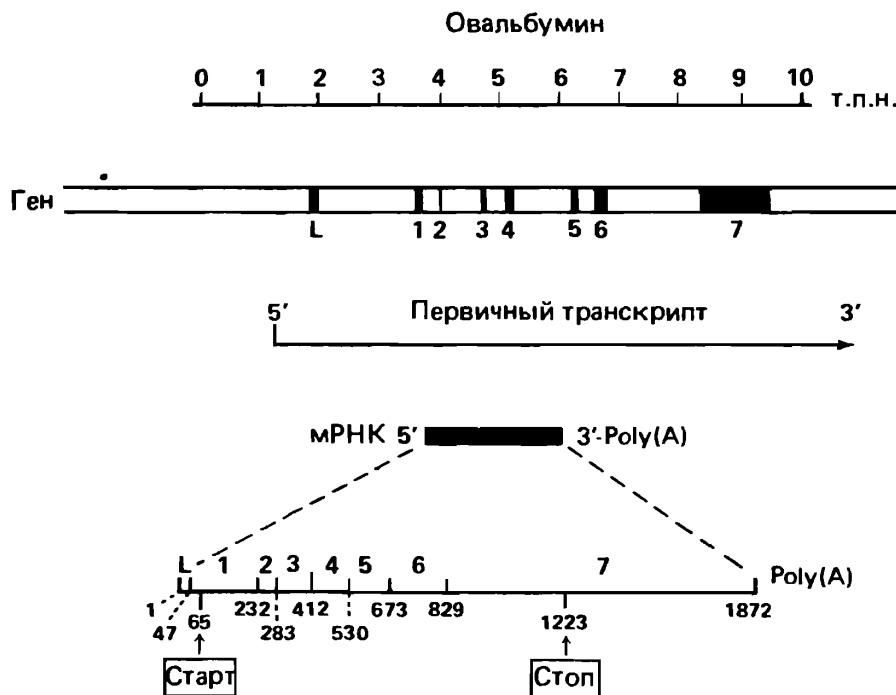


Рис. 39.9. Расположение кодирующих и некодирующих последовательностей (интронов) в структуре гена куриного овальбумина. На рисунке информационные сегменты, входящие в состав зрелой мРНК, пронумерованы и выделены черным цветом. Первичный транскрипт начинается левее L-экзона и заканчивается в 3'-нетранслируемой области за экзоном 7. В нижней части рисунка представлена структура зрелой мРНК; над ней указаны номера экзонов, а под ней — порядковые номера нуклеотидов, точка инициации трансляции и положение стоп-кодона.

уникальна, чтобы гарантировать ее строго специфическое расщепление исключительно за счет действия какой-либо специализированной эндонуклеазы. Присутствующая в значительных количествах малая ядерная РНК (РНК U1) содержит последовательность, комплементарную консенсусной последовательности сайта сплайсинга (рис. 39.11). Кроме того, установлено, что молекулы U1-РНК в эукариотическом ядре специфически связываются с определенными белковыми факторами. Такие РНК-белковые комплексы избирательно ассоциируются с 5'- и 3'-последовательностями сайтов сплайсинга в РНК. Антитела против U1-белкового комплекса ингибируют процесс вырезания интронов *in vitro*.

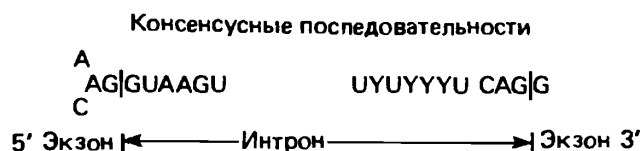
Интересно, что у пациентов с аутоиммунным заболеванием — системной красной волчанкой — обнаружены антитела против некоторых специфических U1-белковых комплексов. Как это связано непосредственно с самим заболеванием, пока неясно.

Недавно было установлено, что в процессе удаления интронов из молекул-предшественников мРНК образуется необычная петлеобразная структура. Оказалось, что 5'-конец последовательности интрона соединяется 2'—5'-фосфодиэфирной связью с аденилатом, расположенным на расстоянии 28—37 нуклеотидов от его 3'-конца. Этот процесс и соответствующие структуры схематически представлены на рис. 39.12.

Что касается загадки взаимоотношений гЯРНК

и соответствующих зрелых мРНК, то ее уже можно считать разгаданной. Гетерогенная ядерная РНК представляет собой первичные транскрипты плюс молекулы, находящиеся на ранних стадиях процессинга, которые после экзирования, добавления poly A-хвоста и удаления интронов транспортируются в цитоплазму уже в форме зрелых мРНК.

Процессинг гЯРНК является еще одной потенциальной точкой регуляции экспрессии генов. Так, была продемонстрирована возможность альтернативного сплайсинга для одного и того же первичного транскрипта. Например, мРНК α-амилазы из слюнных желез и из печени крысы отличаются друг от друга структурой 5'-концевых участков последовательности. Остальные участки мРНК, включая кодирующую область и сайт полиаденилирования, — идентичны. Дальнейший анализ показал, что для присоединения к одному и тому же «телу» мРНК двух различных экзированных лидирующих после-



остатков, происходит после перехода молекулы РНК в цитоплазму. Этот процесс может протекать и в ядре и играть определенную роль при сплайсинге. 5'-Кэпирующая структура, судя по всему, нужна для образования нуклеопротеинового комплекса, в свою очередь необходимого для осуществления сплайсинга. Кроме того, она может участвовать в транспорте и инициации трансляции мРНК.

Функция полиаденилатного «хвоста» мРНК неизвестна. Во многих случаях присутствие или отсутствие poly A непосредственно не связано с транспортом в цитоплазму, поскольку не все полиаденилированные гетерогенные ядерные РНК выходят в цитоплазму и не все цитоплазматические мРНК — полиаденилированы. В клетках млекопитающих в ходе процессов, протекающих в цитоплазме, полиаденилатные «хвосты» мРНК могут как удлиняться, так и укорачиваться.

Оборот polyA-содержащих мРНК в культивируемых клетках млекопитающих — процесс первого порядка со значением $t_{1/2}$, близким к времени удвоения количества клеток в культуре. Кинетика деградации гистоновых мРНК, не содержащих poly A-структур, является процессом нулевого порядка, для которого характерна зависимость распада от возраста со временем жизни около 6 часов. Пока неясно, связаны ли эти различия с наличием или отсутствием концевых polyA-последовательностей или с какими-то иными структурными особенностями молекул мРНК этого класса.

Размер молекул цитоплазматических мРНК даже после удаления poly A-цепочки остается значительно большим (часто в 2—3 раза), чем требуется для кодирования соответствующего полипептида. Избыточные нетранслируемые области есть как на 5'-, так и на 3'-концах транслируемого участка, причем, как правило, 3'-нетранслируемая область достигает большей длины. Точная функция этих последовательностей неизвестна, есть основания считать, что они участвуют в процессинге, транспорте, деградации и трансляции РНК.

Транспортные РНК (тРНК)

Молекулы тРНК, как описано в гл. 37 и 40, выполняют функцию адапторных молекул при трансляции мРНК в белковые последовательности. Молекулы тРНК содержат много необычных («минорных») нуклеиновых оснований. Некоторые из них представляют собой метилированные производные обычных оснований, другие — содержат нетрадиционные гликозидные связи. Молекулы тРНК как про-, так и эукариот первоначально транскрибируются в виде больших предшественников, которые часто содержат более одной молекулы тРНК, подвергающихся нуклеолитическому процессингу при действии рибонуклеаз особого класса. Кроме того, гены

некоторых тРНК содержат единичный интрон длиной 10—40 нуклеотидов, расположенный непосредственно перед участком, соответствующим антикодонному плечу. Поэтому процессинг первичных транскриптов многих тРНК-молекул должен включать этап удаления интронов и точного сплайсинга в кодон-узнающей области. Этот этап имеет критическое значение для выполнения тРНК функции адапторных молекул при синтезе белка. Нуклеолитический процессинг предшественников тРНК, по-видимому, направляется не собственно нуклеотидной последовательностью, а особой трехмерной структурой, которую могут формировать молекулы тРНК, и потому реализуется только для молекул, способных к сворачиванию в определенные функциональные структуры.

Дальнейшие модификации молекул тРНК включают алкилирование нуклеотидов и присоединение характерного ССА-триплета к 3'-концу молекулы. Этот триплет служит точкой присоединения соответствующей аминокислоты, направляемой данной молекулой тРНК в реакцию синтеза полипептида. Метилирование предшественников тРНК млекопитающих происходит, вероятно, в ядре, а расщепление и присоединение ССА-триплета — в цитоплазме, поскольку скорость оборота для концевой части тРНК оказывается выше, чем для молекулы в целом. Для присоединения аминокислоты к ССА-концу требуются определенные ферменты цитоплазмы клеток млекопитающих.

Рибосомные РНК (рРНК)

В клетках млекопитающих молекулы рибосомных РНК (двух основных и одной минорной) транскрибируются в составе большого общего первичного транскрипта (рис. 39.13). Процессинг этого транскрипта с образованием зрелых рРНК, транспортируемых в цитоплазму, происходит в ядрышке, где собственно и локализованы сами гены рибосомных РНК. В каждой клетке присутствуют сотни копий этих генов. Транскрипционные единицы содержат последовательности 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК, расположенные друг за другом в направлении 5'→3'. Первичный транскрипт размером 45S подвергается интенсивному метилированию непосредственно в ядрышке. В этом 45S-предшественнике участок, соответствующий 28S-рРНК, содержит 65 метилированных рибозных остатков и 5 метилированных нуклеиновых оснований. Метилирование идет только на участках, формирующих в дальнейшем зрелые молекулы рРНК. 45S-предшественник подвергается нуклеолитическому процессингу, однако сигналы процессинга заметно отличаются от соответствующих сигналов в гяРНК. Вероятно, и механизм процессинга также отличается от механизма нуклеолитического процессинга при созревании гяРНК.

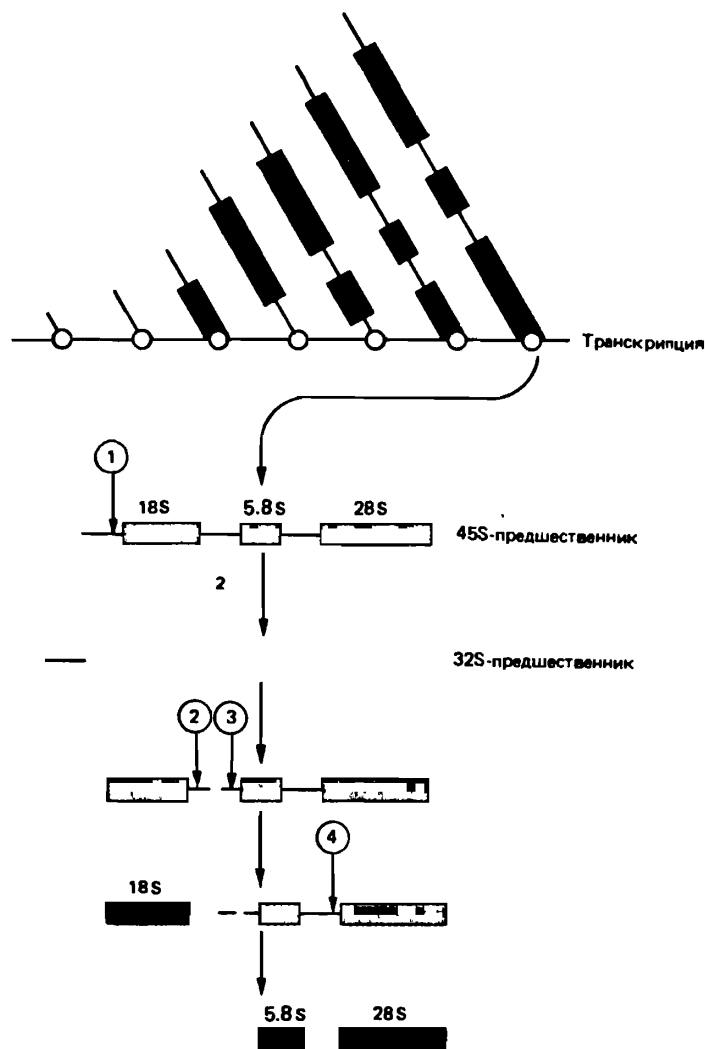


Рис. 39.13. Схема формирования зрелых рибосомных РНК в ходе процессинга молекул РНК-предшественников. Конечный продукт обозначен черными прямоугольниками. (Reproduced, with permission from Perry R. P.: Processing of RNA Annu. Rev. Biochem. 1976, 45:605.)

Почти половина исходного первичного транскрипта (рис. 39.13) подвергается деградации. В ходе процессинга рРНК в ядрышках происходит дальнейшее метилирование, и там же 28S-рРНК, связываясь с рибосомными белками, формирует большую 60S-субъединицу рибосомы. Молекула 5,8S-рРНК также образуется в ядрышке и входит составной частью в большую рибосомную субъединицу. Молекула 18S-рРНК в комплексе с набором соответствующих полипептидов образует малую 40S-субъединицу рибосомы.

НУКЛЕАЗЫ

Ферменты, способные разрушать нуклеиновые кислоты, известны давно. Существует несколько вариантов их классификации. Ферменты, проявляющие специфическую активность в отношении дезоксирибонуклеиновых кислот, называются дезоксири-

бонуклеазами. Те, что гидролизуют рибонуклеиновые кислоты, носят название **рибонукмаз**. Внутри каждой из этих групп есть ферменты, расщепляющие **внутрицепочечные** фосфодиэфирные связи с образованием либо 3'-гидроксил- и 5'-фосфорил- либо, наоборот, — 5'-гидроксил- и 3'-фосфорил-концов. Такие ферменты относятся к классу **эндонуклеаз**. Некоторые из них способны гидролизовать обе цепи **двухцепочечных** молекул, другие — расщепляют только **одну** цепь нуклеиновых кислот. Существуют нуклеазы, способные гидролизовать только единичные цепи, не образующие дуплексной структуры, известны и такие, которые расщепляют цепи, участвующие в образовании двойной спирали. Описан класс **эндонуклеаз**, узнающих строго определенные последовательности в ДНК; большинство из них — это **рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы)**, которые в последние годы стали мощным инструментом в руках

исследователей, занимающихся проблемами генной инженерии.

Список некоторых известных, широко используемых в настоящее время рестриктаз, приведен в табл. 36.1.

Некоторые нуклеазы способны отщеплять нуклеотиды только от свободных концов молекул — их называют **экзонуклеазами**.

Экзонуклеазы могут гидролизовать молекулу нуклеиновой кислоты только в одном направлении ($3' \rightarrow 5'$ или $5' \rightarrow 3'$). У бактерий $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза — необходимый элемент системы репликации ДНК и служит для исправления ошибок спаривания, удаляя ошибочно встроенный в цепь нуклеотид.

ЛИТЕРАТУРА

- Beathnach R., Chambon P.* Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 349.
- Bush H. et al.* SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing, *Annu. Rev. Biochem.*, 1982, **51**, 617.
- Chambon P.* Eukaryotic nuclear RNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, **44**, 613.
- Cordin J. et al.* Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes, *Science*, 1980, **209**, 1406.
- Nevins J. R.* The pathway of eukaryotic mRNA formation, *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, **52**, 441.
- Ruskin B. et al.* Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro, *Cell*, 1984, **38**, 317.
- Sharp P. A.* On the origin of RNA splicing and introns, *Cell*, 1985, **42**, 397.

Синтез белка и генетический код

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Язык жизни—генетический код—основан на использовании алфавита, состоящего всего из четырех букв: А, G, Т и С. Эти буквы соответствуют нуклеотидам, найденным в ДНК. Они входят в состав трехбуквенных кодовых слов, называемых **кодонами**. Общий набор таких кодонов составляет **генетический код**. Последовательность серии кодонов, расположенных в цепи ДНК образует определенный ген, по которому как по матрице синтезируется молекула РНК. Большинство молекул РНК участвует в том или ином этапе синтеза белков. Синтез белка состоит из трех основных этапов: инициации, элонгации и терминации. Этот процесс во многом напоминает репликацию и транскрипцию ДНК и так же протекает в направлении $5' \rightarrow 3'$.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

До расшифровки генетического кода было невозможно понять механизм синтеза белка и объяснить происхождение мутаций. Открытие генетического кода позволило ответить на вопрос о том, как связаны между собой дефекты определенных белков человека и наследственные заболевания. Кроме того, благодаря расшифровке генетического кода были созданы необходимые предпосылки для диагностики и лечения таких заболеваний.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОТОК

Генетическая информация, закодированная в последовательности нуклеотидов ДНК, транскрибируется в ядре в специфические нуклеотидные последовательности молекул РНК. Последовательность нуклеотидов в РНК-транскрипте комплементарна кодирующей цепи гена в соответствии с правилами образования комплементарных пар оснований.

У прокариот существует прямое соответствие между геном, **матричной РНК (мРНК)** и белковым продуктом. Сложнее ситуация в клетках высших эука-

риот, где размер первичных РНК-транскриптов—гетерогенных ядерных РНК (**гяРНК**)—значительно превышает размер зрелых мРНК. Последовательности гяРНК содержат **кодирующие области (экзоны)**, из которых в дальнейшем образуются зрелые мРНК, и **протяженные промежуточные некодирующие последовательности (интроны)**, расположенные между экзонами. В результате процессинга гяРНК, происходящего в ядре клетки, интроны, часто составляющие большую часть гяРНК, удаляются. При так называемом сплайсинге экзоны соединяются между собой и образовавшаяся зрелая мРНК поступает в цитоплазму, где транслируется в белок.

Клетки должны обладать специальными механизмами для точного, аккуратного и эффективного перевода последовательности мРНК в соответствующую последовательность аминокислот кодируемого белка. Для уяснения молекулярных основ этого процесса, названного **трансляцией**, недоставало расшифровки генетического кода. Довольно скоро стало ясно, что молекулы мРНК сами по себе не обладают каким-либо сродством к аминокислотам, и потому трансляция нуклеотидной последовательности мРНК в белок требует наличия промежуточной адапторной молекулы. Эта молекула должна узнавать, с одной стороны, специфическую последовательность мРНК и, с другой—определенную аминокислоту. С помощью такой молекулы клетка может направлять определенную аминокислоту в соответствующее, диктуемое нуклеотидной последовательностью мРНК, положение в молекуле синтезируемого белка. Функциональные группы аминокислот сами по себе не вступают в непосредственный контакт с мРНК-матрицей.

КОДОНЫ И СИНТЕЗ БЕЛКА

В нуклеотидной последовательности молекулы мРНК представлены кодоны для каждой аминокислоты. В роли адапторов, транслирующих последовательность кодонов в аминокислотную последова-

тельность белка, выступают молекулы **транспортных РНК (тРНК)**. 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 так называемые полирибосомы (**полисомы**). **Шероховатый эндоплазматический ретикулум** — это компартмент клетки, в котором мембраносвязанные полисомы продуцируют как мембранные белки, так и белки, подлежащие экскреции и транспорту. Полирибосомные структуры присутствуют и в свободной форме — в цитоплазме, где они синтезируют внутриклеточные белки.

Для синтеза клеточных белков необходимо 20 аминокислот. Следовательно, должно быть по крайней мере 20 различных кодонов, составляющих генетический код. Так как мРНК состоит из нуклеотидов только четырех типов, каждый кодон должен состоять из более чем одного нуклеотида. Кодоны, состоящие из двух нуклеотидов, могли бы обеспечить только 16 (4^2) различных кодонных вариантов, в то время как кодоны, состоящие из трех нуклеотидов, — 64 (4^3) варианта.

Из результатов серии исследований, начатых Маттэи и Ниренбергом, мы знаем, что каждый кодон состоит из трех нуклеотидов, иными словами код является **триплетным**. Расшифровка генетического кода была произведена в основном в лаборатории Ниренберга. Успех этих работ в огромной степени определялся результатами исследований Кораны, который занимался синтезом нуклеотидных полимеров, в том числе с триплетной структурой.

Три из 64 кодонов не кодируют каких-либо аминокислот. Они были названы **нонсенс (nonsense)-кодонами**. По крайней мере два из них выполняют функцию **сигналов терминации**. Они определяют, где должен остановиться синтез полипептидной цепи. Функциональное значение остальных триплетов — кодирование 20 аминокислот. Важнейшее свойство генетического кода — его **«вырожденность»**. Это означает, что несколько кодонов кодируют одну и ту же аминокислоту. Анализ таблицы генетического кода (табл. 40.1) приводит к выводу о том, что все 64 кодона можно подразделить на **16 семейств**. В одно семейство объединены кодоны, имеющие одинаковые нуклеиновые основания в первом и втором положениях. В таблице каждое семейство занимает одну вертикальную колонку между горизонтальными линиями. Например, кодон CCN, где N может быть U, C, A или G, определяет семейство во второй колонке, расположенной между первой и второй горизонтальными разделительными линиями. В некоторых семействах все 4 кодона кодируют одну и ту же аминокислоту, как в случае вышеупомянутого CC-семейства. Такие семейства называют **несмешанными**. Восемь семейств из 16 являются несмешанными.

Таблица 40.1. Генетический код (смысловое значение кодонов в матричной РНК)¹⁾

Первый нуклеотид	Второй нуклеотид				Третий нуклеотид
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term†	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile†	Thr	Lys	Arg†	A
	Met	Thr	Lys	Arg†	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

¹⁾ Термины первый, второй, третий относятся к положению данного нуклеотида в триплетном кодоне: U — уридиновый нуклеотид; C — цитозинный нуклеотид; A — адениновый нуклеотид; G — гуаниновый нуклеотид. Кодон метионина — AUG — выступает в роли иницирующего кодона; Term — терминирующий кодон (трехбуквенные обозначения аминокислот расшифрованы в гл. 3).

²⁾ В митохондриях млекопитающих AUA кодирует Met, UGA — Trp, а AGA и AGG выполняют функцию терминаторов.

Семейства, кодирующие более одной аминокислоты, называются **смешанными**. В 6 смешанных семействах кодоны с пиримидиновым нуклеотидом в третьем положении кодируют одну аминокислоту, а кодоны с концевым пурином — другую аминокислоту или сигнал терминации (табл. 40.1). Два оставшихся семейства — UG-семейство и AU-семейство — не относятся ни к одному из названных типов и являются в этом смысле уникальными. Таким образом, с точки зрения специфичности включения определенной аминокислоты третий нуклеотид в кодонах оказывается, как правило, менее важен, чем первые два. В этом и реализуется вышеупомянутая вырожденность кода. В то же время каждому данному кодону соответствует одна и только одна определенная аминокислота. В этом смысле генетический код является строго **однозначным**. Следует отчетливо понимать принципиальное отличие этих двух важнейших свойств — **вырожденности и однозначности**, — одновременно присущих генетическому коду.

Однозначность при одновременной вырожденности кода можно легко пояснить на молекулярном уровне. Узнавание определенного кодона в составе мРНК молекулой тРНК определяется способностью образовывать комплементарные пары оснований

между кодоном и антикодоном. Каждая молекула тРНК содержит участок, комплементарный кодону и называемый антикодоном. Для данного кодона существует только один вид молекул тРНК, содержащих соответствующий антикодон. Так как каждая молекула тРНК способна нести только одну строго определенную аминокислоту, то и каждому кодону соответствует только одна определенная аминокислота. Однако некоторые виды тРНК могут использовать один и тот же антикодон для узнавания более одного фиксированного кодона. Как следует из приведенного выше анализа семейств кодонов, антикодон может быть нечувствителен к третьему (3'-) нуклеотиду кодона — частично (смешанные семейства) или даже полностью (несмешанные семейства). Такую ослабленную строгость в узнавании третьего нуклеотида в кодоне имеют в виду, используя термин «качание». При этом по сигналу данного кодона происходит встраивание в белковую цепь только одной определенной аминокислоты, хотя каждая аминокислота может кодироваться и более чем одним определенным кодоном.

Как будет показано ниже, процесс считывания генетического кода при синтезе белка не допускает возможности перекрывания кодонов. Следовательно, **генетический код — неперекрывающийся**. Начавшись на определенном кодоне, считывание следующих непосредственно друг за другом нуклеотидных триплетов идет далее без каких-либо пропусков вплоть до достижения нонсенс-кодона. В этом смысле говорят, что генетический код не содержит знаков пунктуации. До последнего времени генетический код считался абсолютно универсальным. Теперь стало известно, что набор тРНК в митохондриях клеток как низших, так и высших эукариотических организмов, считывает 4 кодона иначе, чем тРНК-молекулы цитоплазмы этих же или любых других клеток. Как видно из табл. 40.1, в митохондриях млекопитающих кодон AUA считывается, как Met, а UGA кодирует Tgr. Эти два кодона принадлежат к семействам UG и AU, которые были отмечены нами выше как уникальные. Возможно, с целью уменьшения числа тРНК-молекул, необходимых для трансляции генетического кода, в митохондриях произошла конверсия UG-и UA-семейств до семейств простого смешанного типа. Кроме того, кодоны AGA и AGG используются не как аргининовые, а как стоп-кодоны, т.е. как сигналы терминации трансляции. В результате митохондрии необходимо только 22 вида тРНК, в то время как для синтеза белка в цитоплазме используется весь набор, включающий 31 вид тРНК-молекул. И все же, за вышеупомянутым исключением, **генетический код — универсален**. Частота использования каждого кодона варьирует от вида к виду и даже от ткани к ткани для одного и того же вида. Таблицы частот использования кодонов постоянно подвергаются уточнению по мере опреде-

ления нуклеотидной последовательности все большего числа генов. Это очень важно, поскольку часто исследователям приходится прогнозировать последовательность мРНК по имеющейся аминокислотной последовательности белка или его фрагмента с целью синтеза олигонуклеотидного зонда для клонирования данного гена.

ТРАНСПОРТНЫЕ РНК И СИНТЕЗ БЕЛКА

Для каждой из 20 аминокислот существует по крайней мере один вид тРНК. Все молекулы тРНК характеризуются необычайным сходством как в функциональном отношении, так и по пространственной структуре. Выполнение адапторных функций становится возможным после образования специфического комплекса между молекулой тРНК и определенной аминокислотой. Так как у нуклеиновых кислот нет какого-либо специального сродства к боковым цепям аминокислот, взаимное узнавание должно происходить с помощью специальной молекулы белка, способной выявлять одновременно и определенную тРНК-молекулу, и соответствующую аминокислоту. Для подобного узнавания и правильного присоединения соответствующей аминокислоты к молекуле тРНК должно существовать по крайней мере 20 специфичных ферментов. Процесс узнавания и присоединения происходит в два этапа и катализируется ферментом — уникальным для каждой из 20 аминокислот, принадлежащим к классу **аминоацил-тРНК-синтетаз**. Этот фермент образует активированный промежуточный аминокацил-АМР-ферментный комплекс (рис. 40.1), который специфически узнает соответствующую молекулу тРНК и переносит аминокислотный остаток на 3'-гидроксильную группу концевой аденозина. Аминокислота остается присоединенной эфирной связью к тРНК вплоть до включения в определенное положение растущей полипептидной цепи предшественника белка.

Теперь вернемся к структуре молекулы тРНК, описанной в гл. 37 и изображенной на рис. 37.11. Тимидин-псевдоуридин-цитидиновое плечо (ТψС) участвует в связывании аминокацил-тРНК с рибосомой в сайте синтеза белка. Плечо D необходимо для специфического узнавания данной молекулы тРНК соответствующей аминокацил-тРНК-синтетазой. Акцепторное плечо служит местом присоединения соответствующей аминокислоты.

Антикодоновый участок состоит из 7 нуклеотидов и узнает трехбуквенный кодон в мРНК (рис. 40.2). Последовательность этой области, если читать ее от 3'- к 5'-концу, имеет следующую структуру: варьирующее основание, модифицированный пурин, собственно антикодон (x, y, z), пиримидин, пиримидин-5'. Обратите внимание, что антикодон считывается

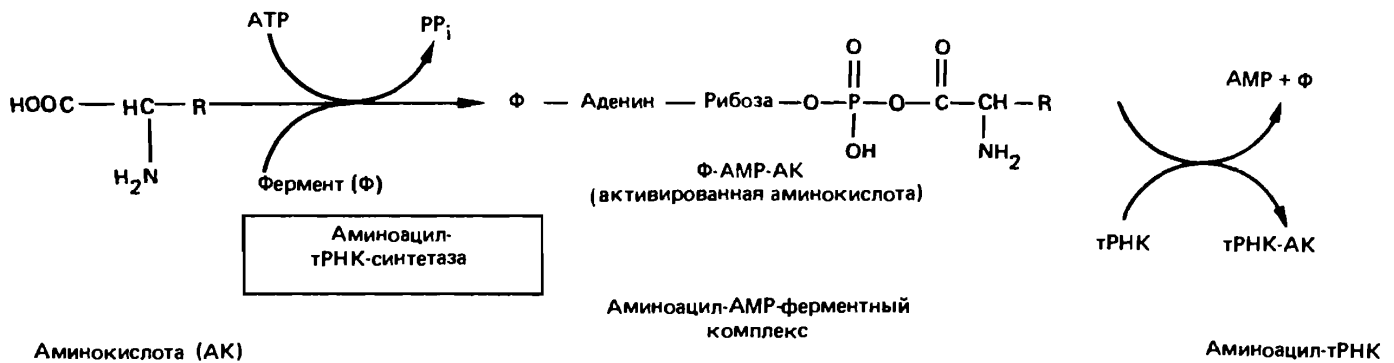


Рис. 40.1. Образование аминоксил-тРНК. Двухступенчатая реакция с участием аминоксил-тРНК-синтетазы приводит к образованию аминоксил-тРНК. В первой реакции образуется комплекс АМР—аминокислота—фермент. Активированная аминокислота переносится на соответствующую тРНК-молекулу. АМР и фермент высвобождаются, после чего фермент может снова участвовать в синтетазной реакции.

в направлении $3' \rightarrow 5'$, а генетический код от $5'$ к $3'$, так как кодон в мРНК и антикодонавая петля в тРНК — антипараллельны.

Вырожденность генетического кода касается в основном третьего нуклеотида кодона и предполагает, что образование комплементарной пары между ним и соответствующим нуклеотидом антикодона не должно быть абсолютно строгим. Как уже упоминалось, это явление принято называть неполным соответствием или качанием, поскольку в области взаимодействия последнего нуклеотида кодона с антикодоном допускается нестрогое связывание — «качание». Например, 2 кодона аргинина AGA

и AGG могут специфически связываться с одним и тем же антикодоном, содержащим на $5'$ -конце остаток урацила. Аналогично три кодона глицина GGU, GGC и GGA могут образовывать пары с антикодоном CCI. Инозин (I) — это еще одно из необычных (минорных) оснований, встречающихся в структуре тРНК.

Узнавание кодона молекулой тРНК не зависит от того, какая аминокислота присоединена к ее $3'$ -концу. Это было продемонстрировано в эксперименте, в котором радиоактивный цистеин, присоединенный к специфической молекуле тРНК (тРНК_{сис}), химическим путем превращали в аланин. При этом антико-

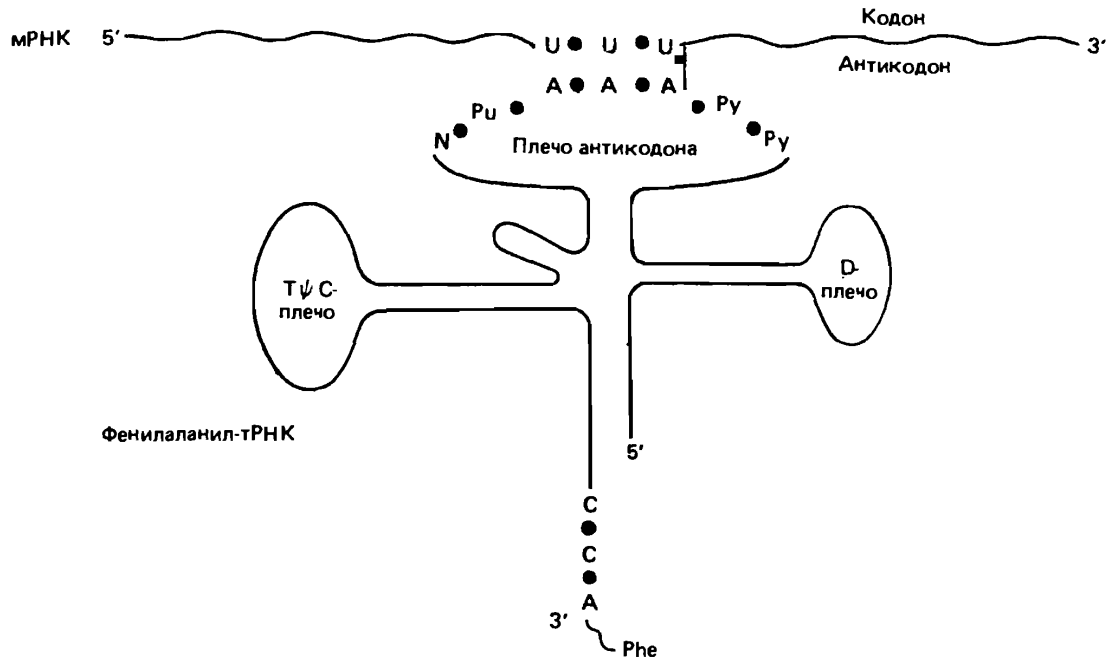


Рис. 40.2. Узнавание кодона антикодоном. UUU — один из кодонов фенилаланина. Молекула тРНК, «заряженная» фенилаланином (Phe), содержит в антикодонавом участке комплементарную последовательность AAA, образующую комплекс с кодоном из трех пар оснований. Антикодонавый участок, как правило, содержит следующую гептануклеотидную последовательность: варьируемый нуклеотид (N); модифицированный пурин (Pu*); антикодон (X, Y, Z); два пиримидина (Py) (ориентация $3' \rightarrow 5'$).

доновый участок самой тРНК_{сус} оставался неизменным. При использовании такой аланил-тРНК_{сус} в трансляции гемоглобиновой мРНК радиоактивный аланин обнаруживали в аминокислотной последовательности в положениях, в норме занимаемых остатками цистеина. Этот эксперимент продемонстрировал, что сам аминокислотный остаток не принимает участия в специфическом узнавании кодона. Как уже отмечалось, встраиваемые в полипептидную цепь аминокислотные остатки вообще не контактируют непосредственно с мРНК-матрицей.

МУТАЦИИ

Мутации — это изменения в нуклеотидной последовательности гена. Даже если первоначально мутация произошла в некодирующей цепи гена, одна из образующихся в ходе репликации дочерних молекул будет обязательно содержать мутацию в соответствующем месте кодирующей цепи и даст начало популяции мутантных клеток.

Мутации замены оснований

Различают два типа замены оснований: **транзиции** и **трансверсии**. Под транзициями понимают замену пуриновых оснований на пуриновые, а пиримидиновых — на пиримидиновые. Трансверсиями называют замены пуриновых оснований на пиримидиновые или пиримидиновых оснований на пуриновые (рис. 40.3).

Если нуклеотидная последовательность гена, содержащего замену, транскрибируется, то образовавшаяся молекула мРНК будет иметь комплементарную замену в соответствующем локусе. Точковая замена в молекуле мРНК при трансляции в аминокислотную последовательность может приводить к разным последствиям:

1) если замена приходится на третий нуклеотид кодона, то вследствие вырожденности генетического кода существует вероятность того, что аминокислотная последовательность останется неизменной и мутация **никак не проявится**;

2) может иметь место **миссенс-эффект**, когда одна аминокислота вследствие замены нуклеотида замещается другой аминокислотой. Такая замена, в зави-

симости от ее локализации в аминокислотной последовательности белка, может быть **приемлемой**, **частично приемлемой** или **неприемлемой** в отношении функции данного белка. Из анализа генетического кода можно заключить, что чаще всего точковые мутации будут приводить к заменам на аминокислоты с довольно похожими функциональными группами. Если происходит приемлемая замена, молекула белка может оказаться функционально неотличимой от нормальной. В результате частично приемлемой замены нарушается нормальное функционирование белка. И наконец, неприемлемая замена приводит к полной потере его функции;

3) в результате точковой мутации может возникнуть **нонсенс-кодон**, присутствие которого приводит к преждевременной терминации синтеза белка. Как правило, фрагмент, образующийся в результате преждевременной терминации, не способен выполнять функцию интактной молекулы белка.

Мутации глобиновых генов

Роль мутаций удобно проанализировать на примере генов гемоглобинов. В этой области накоплен большой фактический материал, касающийся аминокислотных последовательностей нормальных и измененных гемоглобинов (см. гл. 6). На примере гемоглобиновой молекулы можно продемонстрировать влияние точковых замен аминокислот, а также проиллюстрировать некоторые из рассмотренных ранее общих особенностей генетического кода.

Некоторые мутации не проявляются в явном виде. Отсутствие влияния отдельных точковых мутаций прямо можно показать только с помощью определения нуклеотидной последовательности гена гемоглобина или соответствующих мРНК большого числа людей с нормальным гемоглобином. Однако, на основании косвенных данных можно судить о том, что в гене β-цепи кодон 67 (кодирующий валин) не является идентичным у всех индивидов с нормальным β-глобином. В гемоглобине типа Милуоки в 67 положении β-цепи расположена глутаминовая кислота, а в гемоглобине Бристоль — аспарагиновая кислота. Если считать замены в положении 67 аминокислотной цепи β-глобина следствиями одонуклеотидных замен в соответствующем кодоне мРНК, то кодону аспарагиновой кислоты GAU или GAC гемоглобина Бристоль до точковой мутации могли предшествовать валиновые кодоны GUU или GUC. В то же время кодам глутаминовой кислоты в GAA или GAG в мРНК гемоглобина Милуоки должны были предшествовать валиновые кодоны GUA или GUG. Гемоглобин типа Сидней, имеющий в 67 положении аланин (кодоны GCU; GCC; GCA или GCG), мог произойти вследствие одонуклеотидной замены любого из четырех кодонов валина (GUU; GUC; GUA или GUG) (рис. 40.4).

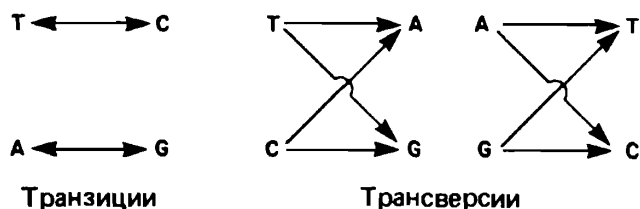


Рис. 40.3. Схема возникновения транзиций и трансверсий.

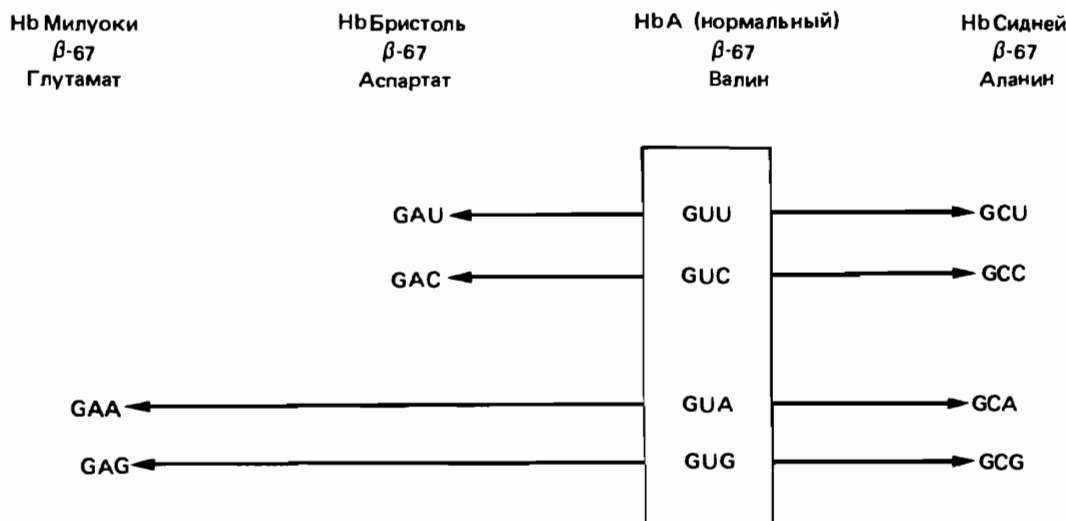


Рис. 40.4. В нормальной β-цепи гемоглобина А человека в 67-м положении находится валин, кодируемый одним из четырех кодонов, заключенных в прямоугольник. В аномальном гемоглобине типа Милуоки в этом положении обнаруживается глутамат, кодируемый либо GAA-, либо GAG-кодоном. Оба кодона могут возникнуть в результате единичной трансверсии валиновых кодонов GUA или GUG. Аналогично аланин в положении 67 β-цепи гемоглобина типа Сидней может быть результатом однонуклеотидной замены в любом из четырех валиновых кодонов. Аспарагиновая кислота в гемоглобине типа Бристоль может появиться в результате замены одного нуклеотида в одном из двух валиновых кодонов GUU или GUC.

Миссенс-мутации

А. Приемлемые миссенс-мутации. Примером приемлемых миссенс-мутаций в структурном гене β-

цепи гемоглобина (рис. 40.5, сверху) может служить мутация, которая выявляется по изменению электрофоретической подвижности гемоглобина эритроцитов практически здоровых людей. У представите-

	Молекула белка	Аминокислота	Кодоны
Приемлемая мутация	Нб А, β-цепь ↓ Нб Хикари, β-цепь	Лизин-61 ↓ Аспарагин	AAA или AAG ↓ AAU или AAC
Частично приемлемая мутация	Нб А, β-цепь ↓ Нб S, β-цепь	Глутамат-6 ↓ Валин	GAA или GAG ↓ GUA или GUG
Неприемлемая мутация	Нб А, α-цепь ↓ Нб М(Бостон), α-цепь	Гистидин-68 ↓ Тирозин	CAU или CAC ↓ UAU или UAC

Рис. 40.5. Примеры трех типов миссенс-мутаций, ведущих к появлению аномальных β-цепей гемоглобина. На рисунке указаны аминокислотные замены и возможные замены в соответствующих кодонах. У гемоглобина Хикари β-цепь обладает практически нормальными физиологическими функциями при измененной электрофоретической подвижности. Функция гемоглобина S в результате мутации в β-цепи частично утрачена: он может связывать кислород, но при деоксигенации выпадает в осадок. В гемоглобине М Бостон в результате мутации в α-цепи ион железа II, входящий в состав гема, окисляется до железа III, что полностью исключает связывание кислорода.

лей по крайней мере двух японских семей выявлен вариант гемоглобина, называемый гемоглобином Хикари. В молекуле гемоглобина этого типа аспарагин в положении 61 β -цепи замещает лизин. Соответствующий кодон AAA или AAG изменен однонуклеотидной трансверсией на AAU или AAC. Замещение лизина на аспарагин никак не сказывается на нормальной функции β -цепи гемоглобина Хикари.

Б. Частично приемлемые миссенс-мутации. Частично приемлемые миссенс-мутации лучше всего проиллюстрировать на примере серповидноклеточного гемоглобина S (рис. 40.5, середина). Миссенс-мутация в 6-м кодоне β -цепи гемоглобина приводит к замене глутаминовой кислоты на валин (вместо кодонов GAA или GAG образуются кодоны GUA или GUG). Такая замена мешает нормальному функционированию гемоглобина и в гомозиготном состоянии приводит к серповидноклеточной анемии. Заместу глутамин на валин можно рассценивать как частично приемлемую, поскольку измененный гемоглобин хотя и аномально, но связывает и высвобождает кислород.

В. Неприемлемые миссенс-мутации. Неприемлемые миссенс-мутации (рис. 40.5, внизу) приводят к образованию полностью нефункционального гемоглобина. Например, мутация в гене гемоглобина М приводит к тому, что ион Fe^{2+} , входящий в состав гема, окисляется до Fe^{3+} и гемоглобин переходит в мет-форму. Метгемоглобин не способен переносить кислород (см. гл. 6).

Мутации сдвига рамки считывания

Этот тип мутаций вызывается делециями или вставками нуклеотидов в последовательность гена, что соответствующим образом изменяет и последовательность считываемой с него мРНК. Делеция одного нуклеотида в кодирующей цепи приводит к сдвигу рамки считывания в мРНК. Поскольку в последовательности мРНК нет разграничивающих кодоны «знаков пунктуации», транслирующий механизм не узнает делеции. Это приводит к синтезу совершенно иной полипептидной цепи (рис. 40.6, пример 1), в том числе и в области, значительно удаленной от собственно делеции. В результате однонуклеотидной делеции или вставки считываемая информация совершенно искажается, кроме того, могут возникать нонсенс-кодоны, прерывающие дальнейший рост полипептидной цепи (рис. 40. 6, пример 3).

Если deletированы три или кратное трем число нуклеотидов, то с соответствующей мРНК будут считываться молекулы белка, у которых отсутствует определенное число аминокислот (рис. 40. 6, пример 2). Поскольку генетический код построен из триплетов, то в этом случае в области, удаленной от делеции, аминокислотная последовательность останет-

ся неискаженной. Если делеция одного или двух нуклеотидов произойдет непосредственно перед или внутри стоп-кодона, то может наблюдаться аномальное удлинение полипептидной цепи. Трансляция продлится вплоть до ближайшего стоп-кодона (рис. 40.6, пример 1). Яркие примеры таких мутаций приведены при обсуждении различных гемоглобинопатий.

Вставки одного, двух или любого, не кратного трем, числа нуклеотидов в ген также приводят к образованию измененной мРНК со сдвигом рамки считывания, что в свою очередь ведет к последствиям, принципиально не отличающимся от тех, что возникают в результате делеций. Это может быть **искажение аминокислотной последовательности** в протяженной области, вслед за местом вставки; образование **нонсенс-кодона** (в месте вставки или на некотором расстоянии от него) и преждевременная терминация синтеза белка или **сквозное считывание** при элиминировании нормального стоп-кодона. Вставка, возникающая в гене вслед за делецией (или наоборот), может восстановить правильную рамку считывания (рис. 40.6, пример 4). Трансляция такой мРНК приведет к образованию полипептида с искаженным участком, заключенным между сайтами вставки и делеции. За точкой восстановления рамки считывания аминокислотная последовательность будет нормальной. Можно представить множество комбинаций делеций и вставок, в результате которых образуются белки, содержащие участки с измененной структурой, окруженные участками с исходной аминокислотной последовательностью. Этот феномен был убедительно продемонстрирован на бактериофаге Т4, что внесло значительный вклад в доказательство триплетной природы генетического кода.

Супрессорные молекулы тРНК

Выше мы обсуждали появление измененных белковых продуктов в результате мутирования структурных генов, подразумевая, что все молекулы тРНК функционируют нормально. Однако в прокариотических организмах и у низших эукариот обнаружены **аномально функционирующие тРНК**, сами по себе являющиеся результатом мутаций. Некоторые из таких аномальных молекул тРНК способны супрессировать мутации структурных генов. Супрессорные молекулы тРНК обычно образуются в результате изменений в области антикодона. Они могут супрессировать миссенс-, нонсенс-мутации и мутации сдвига рамки. Однако поскольку супрессорные тРНК не способны отличать нормальный кодон от кодона, возникшего в результате мутации, их присутствие в клетке обычно сопровождается снижением выживаемости. Например, нонсенс-супрессорная тРНК будет супрессировать и нормальные

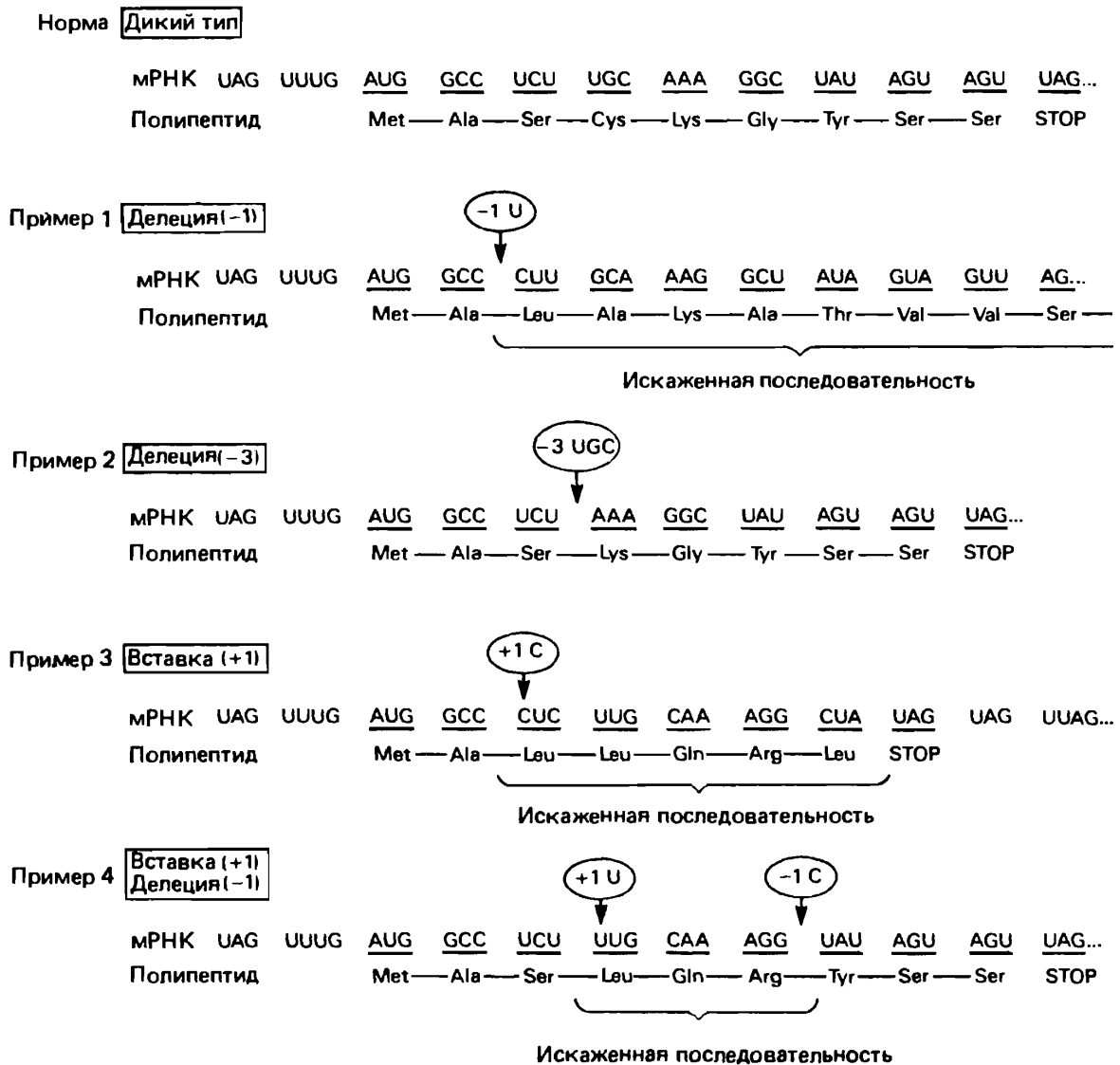


Рис. 40.6. Примеры различных вариантов изменений в структуре мРНК и в транслируемой аминокислотной последовательности, вызванных делециями и вставками в кодирующей области гена. Стрелками обозначены сайты вставок и делеций. Цифры в кружках указывают на число встроенных или удаленных нуклеотидов.

сигналы терминации, допуская таким образом нежелательное сквозное считывание нормальных генов. Молекулы тРНК—супрессоры мутаций сдвига рамки—могут считывать нормальный кодон и первый нуклеотид следующего за ним кодона, что приводит к сдвигу рамки, в том числе и в тех случаях, когда это нежелательно. Супрессорные тРНК, вероятно, могут присутствовать и в клетках млекопитающих, поскольку в них удавалось наблюдать феномен сквозной трансляции через стоп-кодон.

ПРОЦЕСС СИНТЕЗА БЕЛКА

Основные структурные характеристики рибосом и процесс их самосборки обсуждались в гл. 39. Эта особая структура выступает в роли «машины», обеспечивающей трансляцию последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот белковой молекулы.

Трансляция молекул мРНК начинается с 5'-конца с образованием N-конца растущей полипептидной цепи. Информация считывается в направлении 5' → 3' и заканчивается образованием С-конца белковой молекулы. Таким образом реализуется сформулированная ранее концепция полярности (однонаправленности) генетической информации. Как показано в гл. 39, транскрипция гена в соответствующую мРНК начинается с образования 5'-конца молекулы мРНК. У прокариот это позволяет начать трансляцию мРНК еще до завершения транскрипции. У эукариот процесс транскрипции происходит в ядре, а трансляция мРНК—в цитоплазме. Такая компартментализация процессов исключает одновременное протекание транскрипции

и трансляции и делает неизбежным процессинг первичных гРНК-транскриптов с образованием зрелых молекул мРНК.

Процесс синтеза белка так же, как репликация ДНК и транскрипция генов, разбивается на три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация (рис. 40.7)

У большинства мРНК-молекул эукариот 5'-конец «экспонирован», (гл.39). Кэп представляет собой остаток метилгуанозилтрифосфата и, возможно, участвует в связывании РНК-молекул с 40S-субъединицей рибосомы. Как правило, трансляция начинается с кодона AUG. Рибосомная 18S-РНК (рРНК) 40S-субъединицы связывается с областью мРНК, предшествующей первому кодону. Связывание мРНК с 40S-субъединицей требует участия белкового фактора — **фактора инициации 3 (ФИ-3)**.

Первая аминоацил-тРНК, участвующая в трансляции первого кодона, взаимодействует с GTP и **фактором инициации 2 (ФИ-2)**. Образовавшийся комплекс в присутствии **фактора инициации 1 (ФИ-1)** присоединяет тРНК к первому кодону матрицы и образует инициаторный комплекс с 40S-субъединицей рибосомы. После высвобождения факторов инициации (ФИ-1, ФИ-2 и ФИ-3) к GTP присоединяется субъединица 60S, при этом происходит гидролиз молекулы GTP. Так завершается образование полной 80S-рибосомной частицы.

Полностью собранная рибосома содержит два функциональных участка для взаимодействия с молекулами тРНК. Пептидилный участок (Р-участок) содержит растущую полипептидную цепь в составе пептидил-тРНК в комплексе с последним протранслированным кодоном мРНК. Аминоацильный участок (А-участок) содержит аминоацил-тРНК, соединенную с соответствующим кодоном мРНК. После образования инициаторного комплекса с первым кодоном аминоацил-тРНК попадает в формирующийся Р-участок, оставляя А-участок свободным. Таким образом, рамка считывания определяется прикреплением первой тРНК к первому транслируемому кодону. Узнавание этого инициаторного кодона, по-видимому, зависит от вторичной структуры молекулы мРНК. Кроме того, в специфической инициации трансляции у прокариот, а возможно, и у эукариот принимает участие входящая в состав мРНК нуклеотидная последовательность, комплементарная фрагменту 16S (18S)-рибосомной РНК.

У прокариот в инициацию синтеза большинства, если не всех, белков вовлечена специальная аминоацил-тРНК — N-формилметионил-тРНК. У эукариот метионил-тРНК не подвергается формилированию, хотя сам метионин является N-концевой аминокислотой большинства белков.

Возможно, что у прокариот N-формилирование

остатка метионина в тРНК создает аналогию с пептидной связью, благодаря которой становится возможным перемещение инициаторного комплекса в пептидилный участок. У прокариот также имеется фермент, отщепляющий формильную группу или весь N-концевой формилметионильный или метионильный остаток от белка. Во многих случаях это происходит еще до полного завершения трансляции.

Элонгация (рис. 40.8)

В полностью сформированной на стадии инициации трансляции 80S-рибосоме А-участок свободен. Присоединение соответствующей аминоацил-тРНК в А-участке требует точного узнавания кодона. **Фактор элонгации 1 (ФЭ-1)** образует комплекс с GTP и молекулой аминоацил-тРНК. Благодаря этому аминоацил-тРНК может присоединиться к рибосоме. При этом произойдет высвобождение комплекса ФЭ-1-GDP и фосфата. Как показано на рис. 40.8, комплекс ФЭ-1-GDP затем вновь превращается в ФЭ-1-GTP при участии других свободных белковых факторов и GTP.

α -Аминогруппа новой аминоацил-тРНК в участке А осуществляет нуклеофильную атаку этерифицированной карбоксильной группы пептидил-тРНК, занимающей Р-участок. Эта реакция катализируется **пептидилтрансферазой** — белковым компонентом, входящим в состав 60S-рибосомной субъединицы. Поскольку аминокислота в аминоацил-тРНК уже «активирована», для этой реакции не требуется дополнительной энергии. В результате реакции растущая полипептидная цепь оказывается прикрепленной к тРНК, находящейся в А-участке.

После удаления пептидилного остатка с тРНК в Р-участке свободная молекула тРНК быстро покидает Р-участок. Комплекс GTP с **фактором элонгации 2 (ФЭ-2)** участвует в процессе **транслокации** новообразованной пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок. При этом происходит гидролиз GTP, используемого в качестве кофактора ФЭ-2, до GDP и фосфата. В результате транслокации вновь сформированная пептидил-тРНК и соответствующий ей кодон переходят в Р-участок, освобождая А-участок для нового цикла узнавания следующего кодона соответствующей молекулой аминоацил-тРНК и элонгации.

Присоединение аминокислотного остатка к тРНК требует гидролиза АТФ до АМФ, что эквивалентно гидролизу двух молекул АТФ до АДФ и фосфата. Внедрение аминоацил-тРНК в А-участок сопровождается гидролизом GTP до GDP. Для транслокации пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок также необходим гидролиз GTP до GDP и фосфата. Таким образом, энергетические потребности образования одной пептидной связи обеспечиваются за счет гидролиза двух молекул АТФ до АДФ и двух моле-

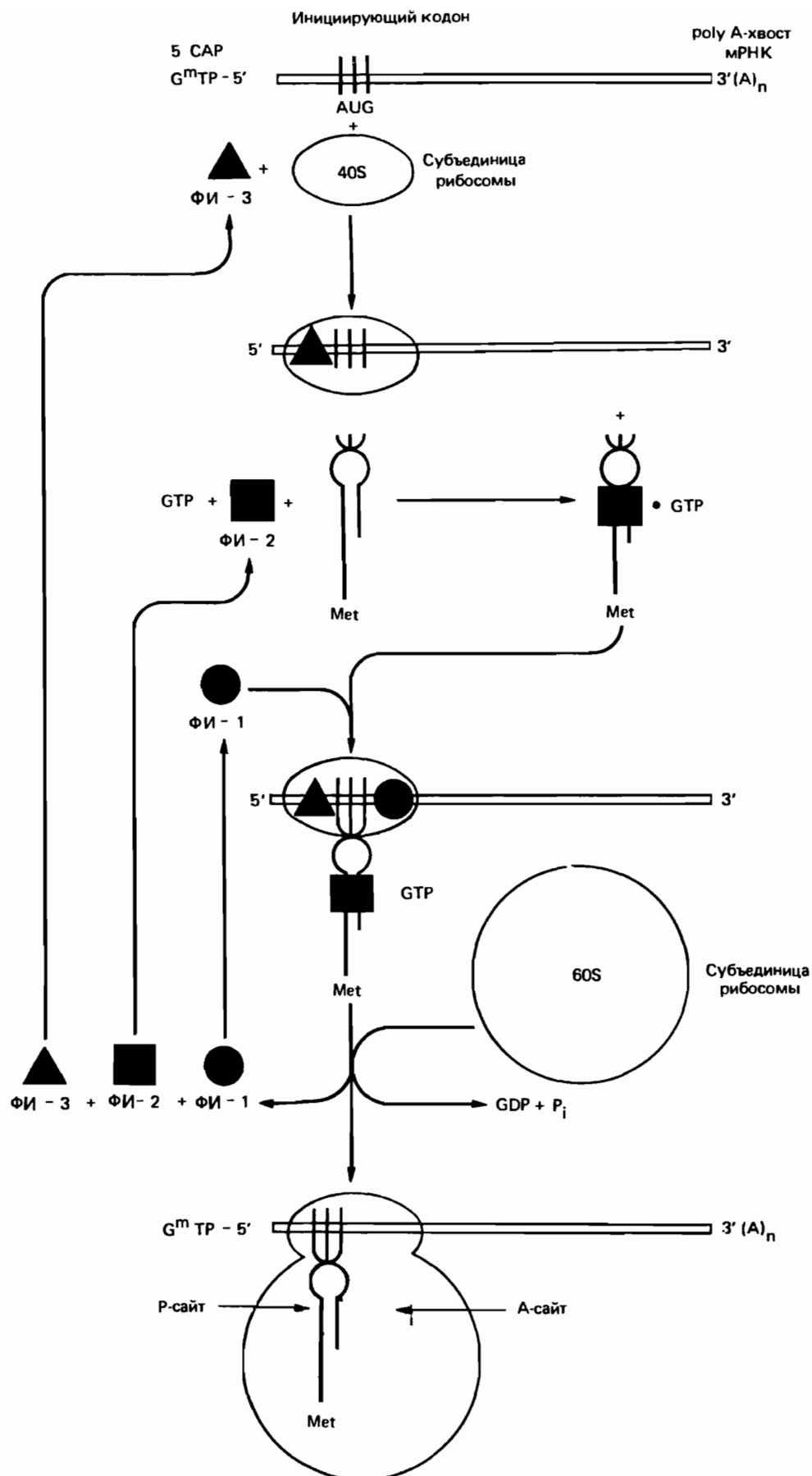


Рис. 40.7. Схема инициации синтеза белка на мРНК, содержащей 5'-экспонированную структуру и 3'-poly A-конец. ФИ-1, ФИ-2 и ФИ-3 — факторы инициации 1, 2 и 3 соответственно. Шпильчатая структура с остатком Met на конце обозначает метионил-тРНК. Буквами Р и А обозначены участки связывания на рибосоме — пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК соответственно.

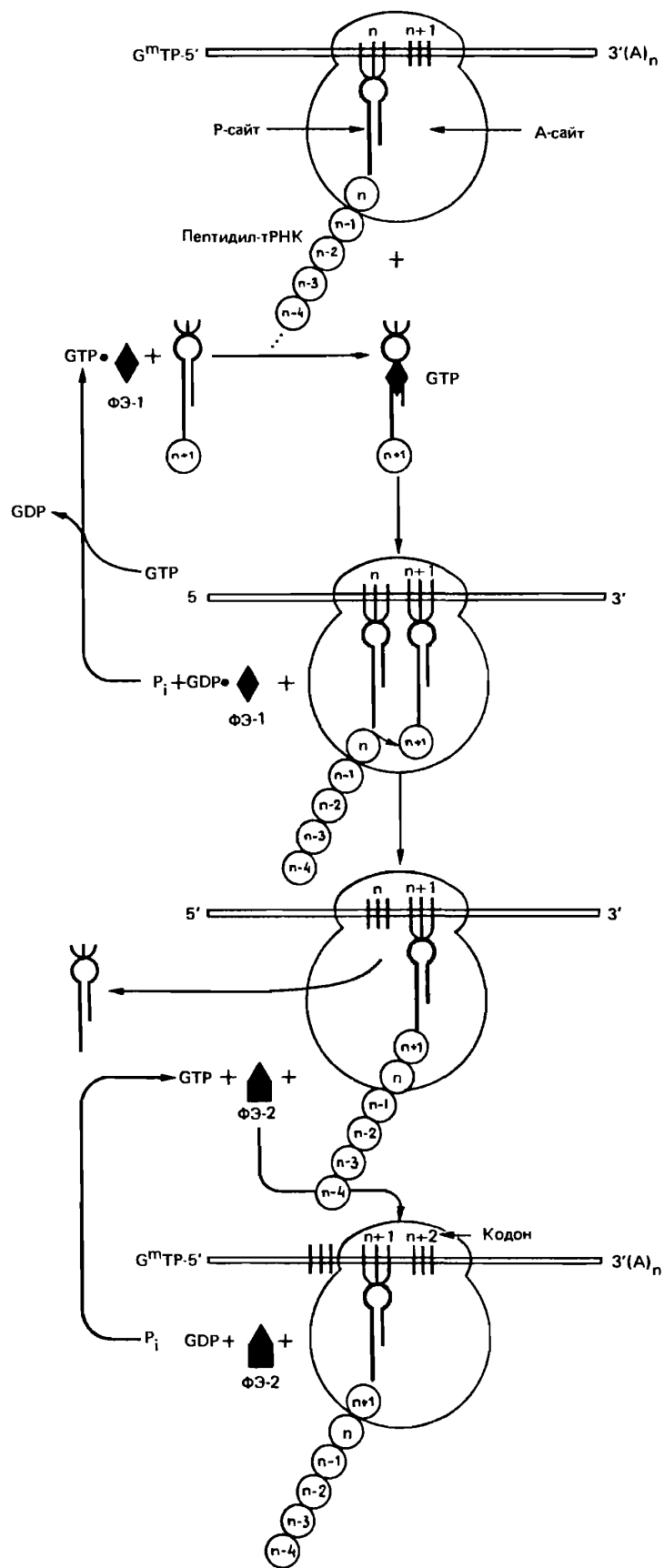


Рис. 40.8. Схема процесса элонгации синтеза белка. Кружками с обозначениями $n-1, n, n+1$ и т. д. отмечены аминокислотные остатки синтезируемой белковой молекулы. ФЭ-1 и ФЭ-2 — факторы элонгации 1 и 2 соответственно.

кул GTP до GDP, т. е. гидролиза четырех макроэргических фосфатных связей.

Терминация (рис. 40.9)

После многих циклов элонгации, в результате которых синтезируется полипептидная цепь белка, в А-участке появляется терминирующий или нонсенс-кодон. В норме отсутствуют молекулы тРНК, способные узнавать нонсенс-кодона. Появление в А-участке терминирующего кодона распознается так называемыми **факторами высвобождения (R-факторами)**. R-факторы при участии GTP и пептидилтрансферазы обеспечивают гидролиз связи между полипептидом и молекулой тРНК, занимающей Р-участок. После гидролиза и высвобождения синтезированного полипептида и тРНК **80S-рибосома диссоциирует** на 40S- и 60S-субъединицы, которые могут затем вновь использоваться в трансляции новых мРНК. Таким образом, факторы высвобождения — это белки, гидролизующие пептидил-тРНК при попадании в А-участок нонсенс-кодона.

Одну и ту же цепь мРНК могут транслировать одновременно множество рибосом. Из-за довольно большого собственного размера их расстояние на мРНК не меньше чем 80 нуклеотидов. Рибосомы, расположенные на одной молекуле мРНК, образуют так называемую **полирибосому** или **полисому**. В отсутствие ограничений число рибосом, присоединенных к мРНК (а значит, и размер полисомы), коррелирует с длиной цепи мРНК. Масса самой молекулы мРНК значительно ниже, чем масса даже единичной рибосомы.

Одна рибосома млекопитающих может осуществлять синтез около 100 пептидных связей ежеминутно.

Полисомы, активно синтезирующие белки, могут существовать в виде свободных частиц или быть прикрепленными к внутриклеточной мембранной сети, называемой эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР). Многочисленные полисомы, прикрепленные к мембранам эндоплазматического ретикула, создают регистрируемую электронным микроскопом «шероховатую» структуру. Белки, синтезируемые на прикрепленных полисомах, вытесняются в пространство между слоями шероховатого ЭПР и подвергаются последующей экскреции. Для этого некоторые белковые продукты упаковываются в зимогенные частицы при участии аппарата Гольджи (см. гл. 42). Цитоплазматические полисомы синтезируют белки, необходимые для выполнения внутриклеточных функций.

Процессинг белков

Некоторые вирусы животных, в особенности полиовирус (РНК-содержащий вирус), синтезируют

длинные полицистронные белки, считываемые с одной протяженной цепи мРНК. Такие белковые молекулы расщепляются в определенных участках с образованием нескольких специфических вирусных белков. В клетках животных многие белки синтезируются по РНК-матрице в виде молекул-предшественников, которые затем для образования активных молекул должны быть модифицированы. В качестве примера такого белка можно привести инсулин — низкомолекулярный белок, состоящий из двух полипептидных цепей с внутрицепочечными и межцепочечными дисульфидными мостиками. Молекула инсулина синтезируется в виде одноцепочечного предшественника инсулина. Затем специфическая протеаза удаляет сегмент, соединяющий две цепи, обнаруживаемые в составе зрелого функционально активного инсулина (см. рис. 51.4 и 51.5).

Многие другие полипептиды синтезируются в виде **пробелков**, требующих дальнейшей модификации для приобретения биологической активности. Посттрансляционная модификация часто включает стадию удаления N-концевых аминокислотных остатков специфическими аминопептидазами. Коллаген — основной белок межклеточного пространства у высших эукариот — синтезируется в виде проколлагена. Три полипептидных молекулы проколлагена (часто неидентичные по первичной структуре) выстраиваются в четвертичную структуру в зависимости от присутствия у них на N-конце определенных пептидов. Специализированные ферменты направляют гидроксилирование и окисление определенных аминокислотных остатков проколлагеновых цепей с целью образования стабилизирующих перекрестных сшивок. Далее происходит отщепление аминоконцевых пептидов и образуется конечный продукт — прочная нерастворимая молекула коллагена (см. гл. 56). Известны и многие другие посттрансляционные модификации белков. Например, широко распространены ковалентные модификации, такие, как ацетилирование, фосфорилирование и гликозилирование.

Ингибиторы синтеза белка

Рибосомы бактерий и митохондрий клеток высших эукариот отличаются от рибосом клеток млекопитающих, описанных в гл. 37. Бактериальные рибосомы меньше (70S вместо 80S) и содержат другой, несколько более простой набор РНК и белков. Это различие широко используется в клинической практике, поскольку многие эффективные антибиотики избирательно взаимодействуют с белками прокариотических рибосом и ингибируют бактериальный синтез белка. При этом бактерии либо гибнут, либо приостанавливается их развитие. Лучшие антибиотики этого класса не взаимодействуют со специфическими белками эукариотических рибосом и, таким

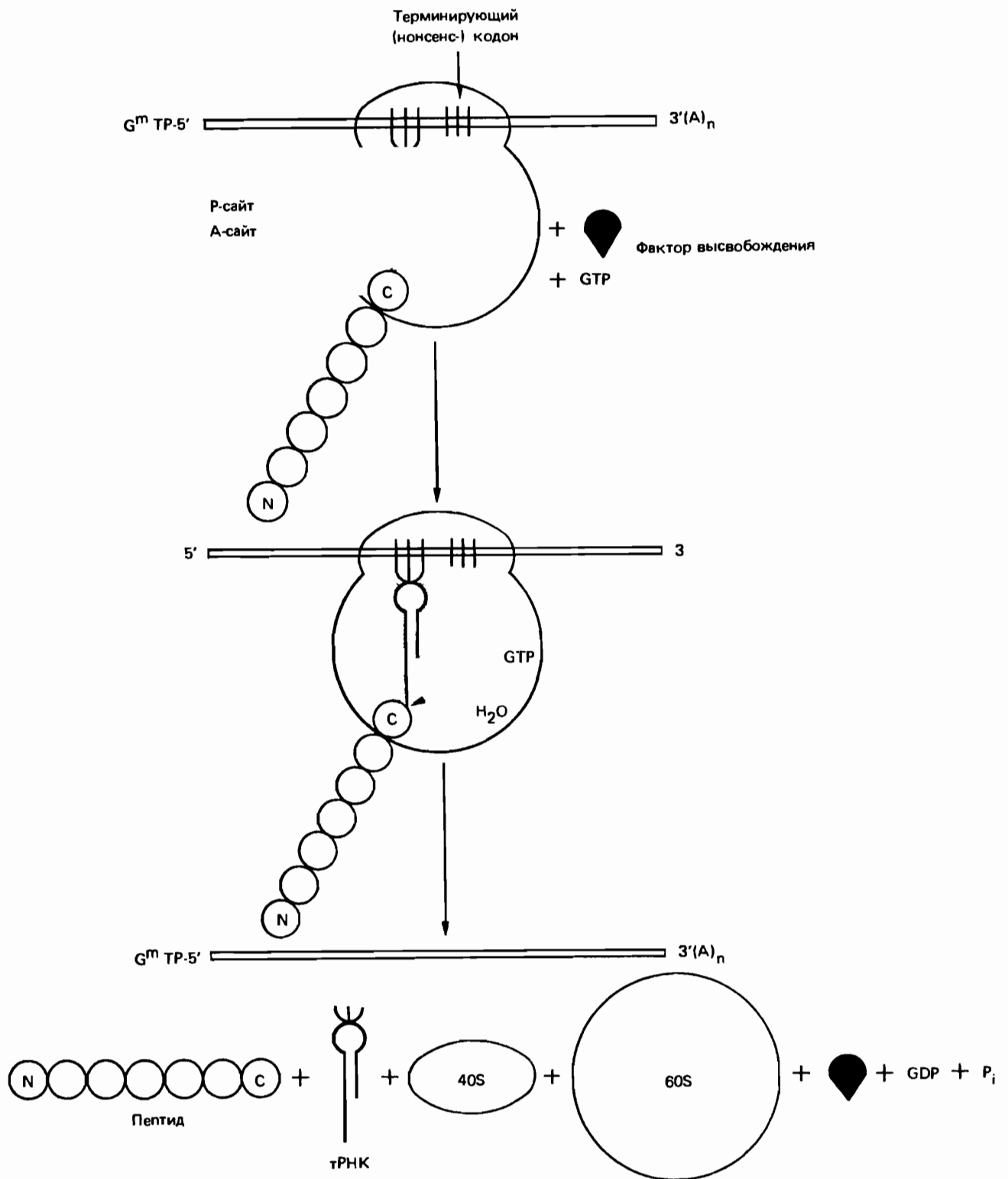


Рис. 40.9. Схема процесса терминации синтеза белка. Буквами Р и А обозначены участки связывания на рибосоме — пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК соответственно. Гидролиз пептидил-тРНК-комплекса представлен в виде атаки молекулы H₂O. Для иллюстрации направленности процесса трансляции буквами N и C помечены N- и C-концевые аминокислоты.

Таблица 40.2. Антибиотики – ингибиторы трансляции

	Эукариоты (цитоплаз- ма)	Эукариоты (митохонд- рии)	Прокариоты
Инициация			
Ауринитрикарбоксилловая кислота	—	—	+
Элонгация			
Амицетин	?	?	+
Анизомидин	—	?	+
Хлорамфеникол	—	+	+
Циклогексимид	+	—	—
Фузидовая кислота	?	?	+
Линколин	—	?	+
Пуромицин	+	+	+
Спарсомидин	+	+	+
Тетрациклины	—	+	+
Терминация			
Анизомидин	?	?	*
Амицетин	?	?	+
Хлорамфеникол	—	+	+
Эритромицин	—	+	+
Линколин	?	?	+
Спарсомидин	+	+	+
Стрептомицин	+	±	+
+ ингибирование; нет ингибирования; * стимуляция; ? неизвестно			

образом, нетоксичны для эукариотических организмов. Некоторые из них в табл. 40.2, суммирующей данные по влиянию антибиотиков на синтез белка, выделены жирным шрифтом.

Существуют антибиотики, ингибирующие синтез белка или для всех типов рибосом (пуромицин), или только для эукариотических (циклогексимид). Пуромицин, структура которого представлена на рис. 40.10, представляет собой структурный аналог тирозил-тРНК. Пуромицин включается через участок А рибосомы в С-концевое положение растущей полипептидной цепи и вызывает ее преждевременную диссоциацию и соответственно терминацию синтеза белка. Пуромицин как аналог тирозил-тРНК эффективно ингибирует синтез белка как у прокариот, так и у эукариот.

Дифтерийный токсин — это экзотоксин, продуцируемый лизогенными по специфическому фагу клетками *Corynebacterium diphtheriae*. Этот токсин катализирует ADP-рибозилирование ФЭ-2 в клетках млекопитающих. Такая модификация инактивирует ФЭ-2 и, следовательно, ингибирует синтез белка. Многие животные (например, мышь) устойчивы к дифтерийному токсину. Эта устойчивость обусловлена неспособностью дифтерийного токсина проникать через клеточную мембрану, а не устойчивостью мышинного ФЭ-2 к катализируемому токсином ADP-рибозилированию.

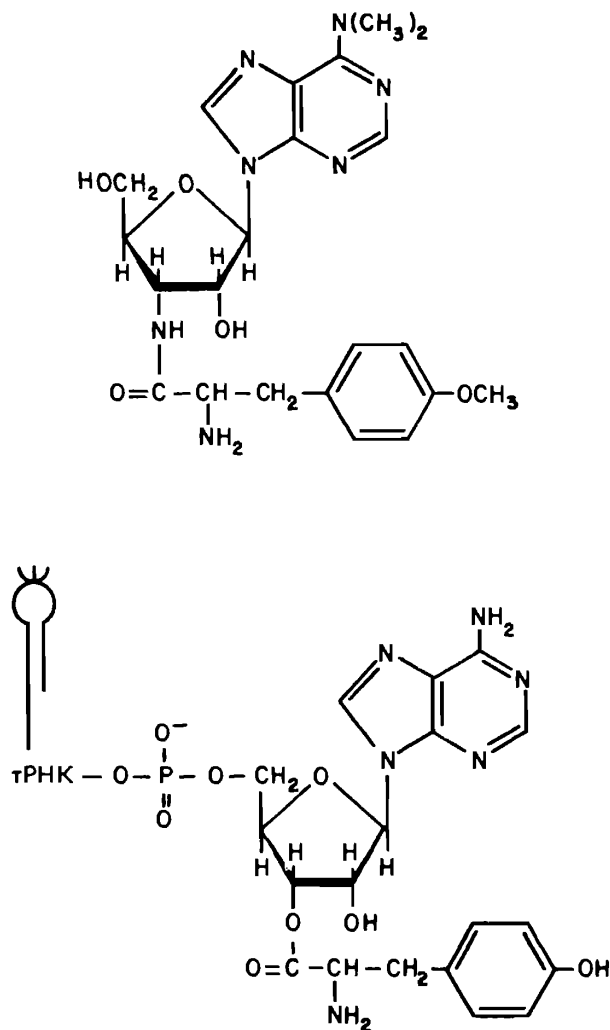


Рис. 40.10. Сравнение структур антибиотика пуромицина и 3'-концевого участка тирозил-тРНК.

Многие из вышеупомянутых соединений, например пуромицин и циклогексимид, не используются в клинической практике. Однако они оказались очень полезными в экспериментах по изучению роли синтеза белка в регуляции метаболических процессов, особенно индукции ферментов при действии гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

- Barrell B. G. et al. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 3164.
 Caskey C. T. Peptide chain termination, Trends Biochem. Sci., 1980, 5, 234.
 Darnell J. et al. Molecular Cell Biology, Scientific American Books, 1986.
 Drake J. W., Baltz R. H. The biochemistry of mutagenesis, Annu. Rev. Biochem., 1975, 45, 11.
 Forget B. G. Molecular genetics of human hemoglobin synthesis, Ann. Intern. Med., 1979, 91, 605.

- Hesekorn R., Rothman-Denes L. B.* Protein synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, 1973, **42**, 397.
- Hunt T.* DNA Makes RNA Makes Protein, Elsevier, 1983.
- Levin B.* Genes, 2nd ed., Wiley, 1985.
- Roth J. R.* Frameshift mutations, *Annu. Rev. Genet.*, 1974, **8**, 319.
- Schafritz D. A. et al.* Evidence for the role of M⁷G⁵-phosphate group in recognition of eukaryotic mRNA by inhibition factor IF-M₁, *Nature*, 1976, **261**, 291.
- Schlessinger D.* Genetic and antibiotic modification of protein synthesis, *Annu. Rev. Genet.*, 1974, **8**, 135.
- Shatkin A. J.* mRNA cap binding proteins: Essential factors for initiating translation, *Cell*, 1985, **40**, 223.
- Weatherall D. J., Clegg J. B.* Thalassemia revisited, *Cell*, 1982, **29**, 7.
- Weissbach G., Ochoa S.* Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, 1976, **45**, 191.
- Wool I.* The structure and function of eukaryotic ribosomes, *Annu. Rev. Biochem.*, 1979, **48**, 719.

Регуляция экспрессии генов

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Один из основных путей адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды — регуляция экспрессии генов. Этот процесс, детально изученный для бактерий и вирусов, заключается в специфическом взаимодействии определенных белков с различными участками ДНК, расположенными рядом с сайтами инициации транскрипции. Такие взаимодействия могут характеризоваться как позитивным (положительным), так и негативным (отрицательным) влиянием на уровень транскрипции. В эукариотических клетках используются и другие механизмы регуляции транскрипции. В контроле экспрессии генов могут участвовать амплификация, генные перестройки, переключение классов и посттранскрипционные модификации.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Многие механизмы, контролирующие экспрессию генов, принимают участие в ответе организма на воздействие гормональных и лекарственных средств. Ясное представление об этих процессах может способствовать созданию соединений, ингибирующих функции или подавляющих развитие патогенных организмов.

Генетическая информация, заключенная в каждой соматической клетке многоклеточного организма, практически идентична. Исключения выявлены только для тех немногих клеток, у которых с целью выполнения специализированных функций гены амплифицированы или подверглись перестройке. Экспрессия генетической информации должна регулироваться в ходе онтогенеза организма и дифференцировки составляющих его клеток. Более того, для того чтобы организм мог приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды, для экономии энергии и питательных веществ, система экспрессии генетической информации должна отвечать на внешние сигналы. По мере эволюционного

Таблица 41.1. Влияние позитивной и негативной регуляции на уровень экспрессии генов

	Уровень экспрессии гена	
	Негативная регуляция	Позитивная регуляция
В присутствии регулятора	Снижается	Увеличивается
В отсутствие регулятора	Увеличивается	Снижается

развития появлялись все более сложные механизмы, обеспечивающие необходимый уровень приспособления организма и его клеток к различным условиям. Клетки млекопитающих обладают объемом генетической информации в 1000 раз большим, чем клетки *Escherichia coli*. При этом основная часть дополнительной информации, по-видимому, необходима для регуляции экспрессии генов.

Упрощая, можно сказать, что существуют лишь два типа регуляции экспрессии генов — **позитивная** и **негативная** (табл. 41.1). Когда благодаря действию специфических регуляторных элементов уровень экспрессии генетической информации количественно **возрастает**, регуляция называется **позитивной**. Если уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов **понижается**, говорят о **негативной** регуляции. Регуляторный элемент или молекулу, участвующие в качестве «посредников» в негативной регуляции, называют негативными регуляторами; элементы, осуществляющие позитивную регуляцию — позитивными регуляторами. Однако **позитивный** эффект получается и при **двойном негативном** воздействии. То есть эффектор, ингибирующий действие негативного регулятора, оказывает в итоге позитивное регуляторное влияние. Во многих регуляторных системах, функционирующих как индуцибельные, на молекулярном уровне в действительности имеет место так называемая **дерепрессия**. (Описание этих терминов см. в гл. 10.)

Для биологических систем можно выделить три типа ответов на регуляторный сигнал. Эти три типа

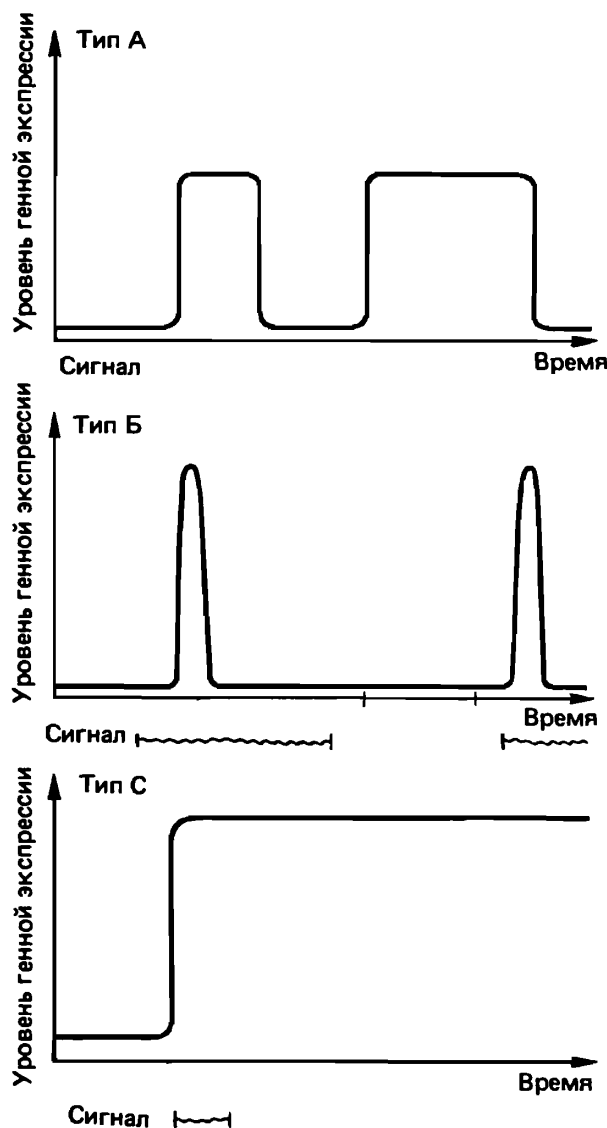


Рис. 41.1. Диаграмма возможных типов ответа со стороны системы регуляции уровня экспрессии гена на действие регуляторного сигнала (например, гормона).

ответов изображены в виде диаграмм динамики экспрессии генов в ответ на индуцирующий сигнал на рис. 41.1.

Тип А. Ответ характеризуется повышенным уровнем экспрессии гена при постоянном присутствии индуцирующего сигнала. Когда агент, выполняющий функцию индуцирующего сигнала, удаляется, экспрессия падает до исходного уровня и возрастает опять при повторном появлении индуцирующего сигнала. Этот тип ответа широко распространен у высших организмов при использовании таких индукторов, как стероидные гормоны (см. гл. 44).

Тип Б. Ответ проявляется лишь как временное усиление экспрессии даже при постоянном присутствии регуляторного сигнала. После удаления индуцирующего агента и по истечении времени, необходимого клеткам для возвращения в исходное физио-

логическое состояние, в ответ на повторный сигнал может наблюдаться повторное временное усиление экспрессии в ответ на тот же агент. Этот тип ответа наблюдается при развитии организма, когда необходимо лишь временное повышение уровня содержания продукта экспрессии определенного гена, несмотря на постоянное присутствие сигнала.

Тип В. Ответ реализуется как повышение уровня экспрессии гена в ответ на регуляторный сигнал. При этом достигнутое повышение уровня экспрессии остается неизменным в течение неопределенно длительного времени даже после полного прекращения воздействия самого сигнала. В данном случае сигнал действует по триггерному механизму. После инициации в одной клетке экспрессия данного гена не может быть прекращена даже в дочерних клетках и потому является необратимым и наследуемым изменением.

Модельные системы для изучения регуляции экспрессии генов

В последние 20 лет были достигнуты большие успехи в понимании того, каким путем генетическая информация через матричную РНК воплощается в молекулу белка; кроме того, высокий уровень развития получили представления об основах регуляции экспрессии генов в прокариотических клетках. К сожалению, до недавнего времени все важнейшие сведения о молекулярных механизмах регуляции ограничивались данными, полученными при изучении прокариотических и простейших эукариотических организмов. Это объясняется тем, что использованные методы генетического анализа эффективны лишь в применении к наиболее примитивным организмам. Последние достижения генной инженерии позволили начать изучение сложнейших механизмов регуляции экспрессии генов у млекопитающих. В этой главе мы сначала обсудим то, что характерно для прокариотических систем. При этом мы не будем описывать генетические эксперименты, а сделаем акцент на том, что может быть названо физиологией экспрессии генов. Однако нужно подчеркнуть, что почти все важнейшие выводы основаны на результатах генетических исследований.

Перед тем как обратиться к физиологии, необходимо остановиться на некоторых терминах, принятых для прокариотических систем.

Цистрон — наименьшая единица генетической экспрессии. Как показано в гл. 10, некоторые ферменты и белки состоят из нескольких неидентичных субъединиц. Таким образом, известная формула «один ген — один фермент» не является абсолютно строгой. Цистрон — это минимальная экспрессируемая генетическая единица, кодирующая одну субъединицу белковой молекулы. Поэтому вышеупомянутую формулу можно перефразировать как «один цистрон — одна субъединица».

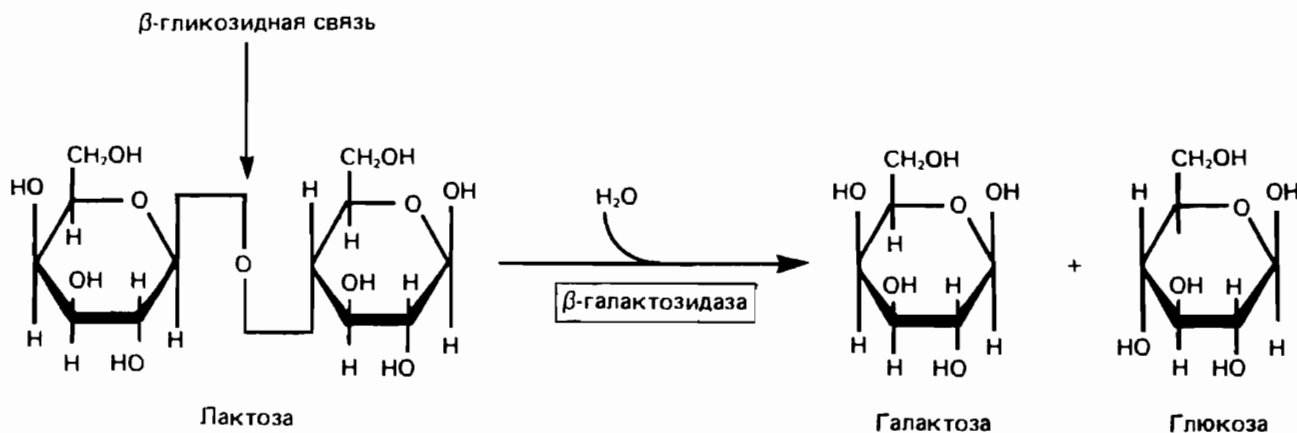


Рис. 41.2. Гидролиз лактозы до галактозы и глюкозы ферментом β-галактозидазой.

Индукцибельный ген — ген, экспрессия которого усиливается в ответ на действие **индуктора** — специфического регуляторного сигнала.

Понятие **конститутивной** экспрессии используется в отношении генов, которые экспрессируются на определенном постоянном уровне и не подвержены специфической регуляции. Некоторые индуцибельные гены могут стать конститутивными в результате мутации. Соответствующие мутации называют конститутивными мутациями.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ

Лас-оперон

В 1961 г. Франсуа Жакоб и Жак Моно описали ставшую теперь классической модель **оперона**. Их концепция в значительной мере была основана на изучении регуляции метаболизма лактозы у кишечной палочки *E. coli*. Молекулярный механизм регуляции генов, участвующих в метаболизме лактозы, на сегодняшний день наиболее изучен. Фермент β-галактозидаза гидролизует лактозу до галактозы и глюкозы (рис. 41.2). Структурный ген β-галактозидазы (ген *LacZ*) локализован в одном кластере с геном, ответственным за синтез галактозидпермеазы, осуществляющей активный транспорт галактозы в клетку (ген *Y*) и геном галактозидацетилазы (ген *A*), функциональное значение которой неизвестно. Структурные гены трех соответствующих ферментов связаны физически и образуют так называемый Лас-оперон (рис. 41.3). Такая генетическая компоновка структурных и соответствующих регуляторных генов обеспечивает **скоординированную экспрессию** всех трех ферментов метаболизма лактозы. Все три гена транскрибируются в виде общей молекулы мРНК, содержащей независимые кодоны на-

чала трансляции (AUG) и стоп-кодона (UAA) для каждого цистрона. Такой тип мРНК называется **полицистронной мРНК**. Образование полицистронных мРНК характерно главным образом для прокариотических организмов.

Когда в растущую культуру клеток *E. coli* добавляют лактозу или некоторые ее аналоги, экспрессия активностей β-галактозидазы, галактозидпермеазы и галактозидацетилазы возрастает в 10–100 раз. Индукция лактозного оперона по вышеприведенной классификации ответов относится к типу А (рис. 41.1). После удаления индуктора (сигнала) интенсивность наработки всех трех ферментов падает. Поскольку сами ферменты в клетках *E. coli* не подвергаются существенной деградации, уровень активности β-галактозидазы и двух других ферментов остается на прежнем уровне и падает лишь в связи с «разбавлением» в результате клеточного деления.

Когда клетки *E. coli* выращивают в среде, содержащей смесь лактозы и глюкозы, в качестве единственных источников углерода, то в первую очередь метаболизируется глюкоза. После истощения глюкозы в среде рост клеток временно приостанавливается, пока не пройдет индукция лактозного оперона, в результате которой достигается уровень экспрессии соответствующих ферментов, достаточный для обеспечения метаболизма лактозы. Несмотря на то, что лактоза присутствует с самого начала, Лас-оперон не

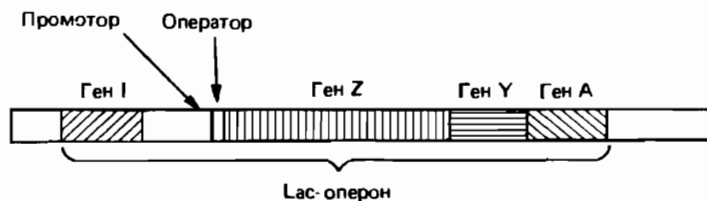


Рис. 41.3. Взаимное расположение структурных и регуляторных генов в Лас-опероне.

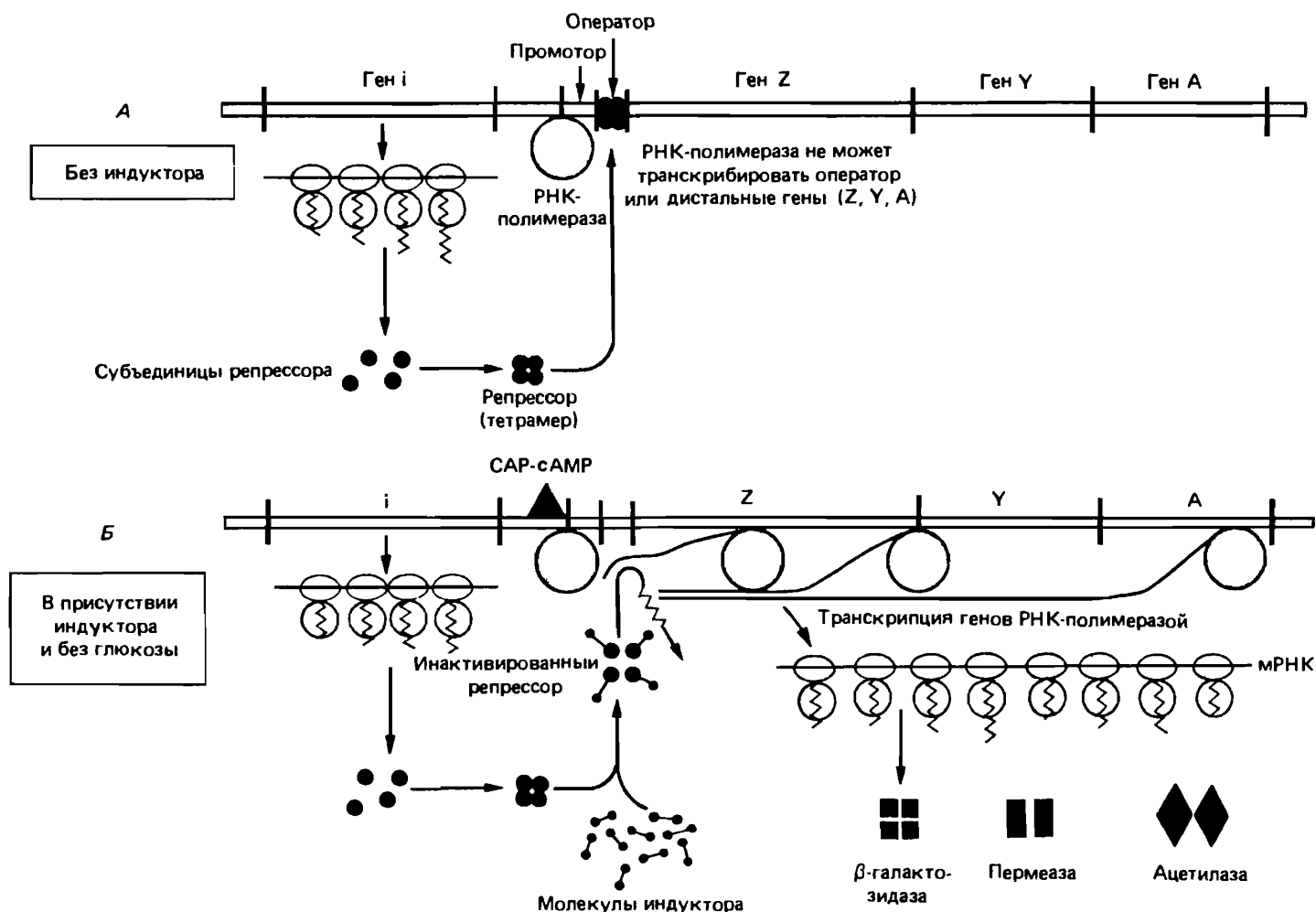
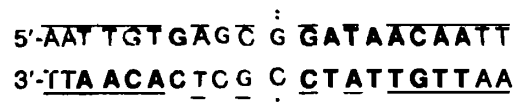


Рис. 41.4. Механизм репрессии и дерепрессии Лас-оперона. В отсутствие индуктора (*А*) репрессор (продукт конститутивно экспрессируемого гена *i*), связываясь с оператором, препятствует посадке РНК-полимеразы на локус промотора и соответственно предотвращает транскрипцию структурных генов *Z*, *Y*, *A*. В присутствии индуктора (*Б*) конститутивно синтезируемый репрессор инактивируется и не может связаться с оператором. В этом случае при наличии сАМР — сАР-комплекса РНК-полимераза транскрибирует структурные гены *Z*, *Y*, *A*. Образующаяся полицистронная цепь мРНК транслируется с образованием белковых молекул β-галактозидазы, пермеазы и ацетилазы, обеспечивающих нормальный катаболизм лактозы.

индуцируется до полного истощения глюкозы. Этот феномен сначала объясняли исходя из предположения о репрессии оперона одним из продуктов катаболизма глюкозы. Поэтому он получил название — «катаболитная репрессия». Сейчас уже известно, что «катаболитная репрессия» в действительности опосредуется действием **белка-активатора катаболитных генов** — так называемого сАР-белка (от англ. catabolite gene activator protein) — совместно с сАМР. Уровень экспрессии многих индуцибельных ферментных систем или оперонов у *E. coli* и других прокариот чувствителен к катаболитной репрессии (см. ниже).

Физиология индукции Лас-оперона в настоящее время хорошо изучена (рис. 41.4). Экспрессия нормального гена *i* Лас-оперона конститутивна, она

проявляется в наработке с постоянной скоростью субъединиц Лас-репрессора. Белковая молекула Лас-репрессора состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых имеет мол. массу 38 000. Репрессор — продукт гена *i* — обладает высоким сродством к соответствующему операторному локусу (K_d около 10^{-12} моль/л). **Операторный локус** — это определенный участок последовательности двухцепочечной ДНК длиной 27 пар оснований. В рамках этого участка последовательность длиной 21 п. о. характеризуется двойной симметрией вращения (показано сплошными линиями, ось симметрии обозначена точками):



Минимальный эффективный размер оператора, с которым может связаться молекула Лас-репрессора, составляет 17 пар оснований (выделены жирным шрифтом). В каждый данный момент времени с оператором связаны две субъединицы репрессора. Внутри последовательности в 17 пар оснований по крайней мере одно основание каждой пары принимает участие в узнавании и связывании репрессора. Связывание происходит в основном в **большой бороздке** ДНК без нарушения нормальной двухспиральной структуры области оператора. Участок молекулы репрессора, включающий первые 52 аминокислотных остатка, связывается с ДНК, не проявляя, судя по всему, специфичности к какой-то определенной последовательности. Другая область репрессора (остатки с 53 по 58) строго специфично связывается с 17-звенным фрагментом операторной области протяженностью 6—7 нм. Аминокислотные остатки в положении 74—75 особенно важны для связывания индуктора с молекулой репрессора. **Операторный локус** находится между **промотором**, к которому перед началом транскрипции присоединяется ДНК-зависимая РНК-полимераза, и началом гена *Z* — структурного гена β -галактозидазы (рис. 41.3). Присоединившись к оператору, репрессор препятствует транскрипции операторного локуса и дистальных структурных генов *Z*, *Y* и *A*. Таким образом, репрессор является **негативным регулятором**; в его присутствии подавляется экспрессия *Z*, *Y* и *A*-генов. Обычно на клетку приходится 20—40 тетрамерных молекул репрессора и 1—2 операторных локуса.

Аналог лактозы, способный индуцировать экспрессию Лас-оперона и не являющийся в то же время истинным субстратом β -галактозидазы, можно назвать **нерасходуемым индуктором**. Добавление лактозы или нерасходуемого индуктора к культуре бактерий, выращиваемой на плохо утилизируемом источнике углерода (например, сукцинате), вызывает незамедлительную индукцию ферментов Лас-оперона. Небольшие количества лактозы или индуктора способны проникать в бактериальную клетку и в отсутствие пермеазы. Молекулы репрессора, как связанные с операторным локусом, так и находящиеся в свободном виде в цитоплазме, обладают сродством к молекулам индуктора. Связывание индуктора с молекулой репрессора, прикрепленной к операторному локусу, вызывает конформационные изменения структуры репрессора и приводит к диссоциации комплекса с ДНК. Если к этому моменту ДНК-зависимая РНК-полимераза уже связана с кодирующей цепью в промоторной области, то начинается транскрипция. Образующаяся при этом полицистронная мРНК имеет на 5'-конце последовательность, комплементарную кодирующей цепи оператора. Таким образом, индуктор дерепрессирует Лас-оперон и обеспечивает возможность транскрипции структурных генов β -галактозидазы, галакто-

зидпермеазы и галактозидацетилазы. Трансляция полицистронной мРНК может начаться еще до полного завершения транскрипции. Дерепрессия Лас-оперона позволяет клетке синтезировать ферменты, необходимые для катаболизма лактозы как источника энергии.

Для связывания РНК-полимеразы с последовательностью промотора необходимо наличие комплекса белка-активатора катаболитных генов (CAP) с сАМР. Накопление сАМР происходит независимым образом только при недостатке в питательной среде источника углерода. В присутствии глюкозы или глицерола в концентрациях, обеспечивающих рост, концентрация сАМР в бактерии оказывается недостаточной для образования комплекса с CAP и ДНК-зависимая РНК-полимераза не может начать транскрипцию Лас-оперона. Транскрипция начинается только при наличии комплекса CAP—сАМР, связанного с промотором. Комплекс CAP—сАМР действует как **позитивный регулятор**, поскольку его присутствие необходимо для обеспечения экспрессии генов. Таким образом, Лас-оперон является объектом как позитивной, так и негативной регуляции.

Если ген *i* мутирует таким образом, что его продукт — Лас-репрессор — утрачивает способность связываться с оператором, то экспрессия Лас-оперона становится конститутивной. И наоборот, если мутация приводит к неспособности репрессора связываться с индуктором, то дерепрессии Лас-оперона (необходимым условием которой является именно образование комплекса между индуктором и репрессором, связанным с операторной областью) не наблюдается даже при высоких концентрациях индуктора в среде.

Мутантная бактерия, у которой операторная последовательность изменена так, что нормальный репрессор оказывается неспособным связаться с ней, также приобретает способность к конститутивной экспрессии Лас-оперона.

Бактериофаг лямбда

Некоторые бактерии несут вирусы (умеренные бактериофаги), которые либо встроены в хромосому клетки-хозяина и реплицируются вместе с ней, либо существуют в клетке автономно и реплицируются самостоятельно, что в конечном итоге приводит к лизису и гибели бактерий. Один из таких умеренных бактериофагов — бактериофаг лямбда (λ). При инфицировании чувствительных бактерий *E. coli* он «инъекцирует» в бактериальную клетку свой геном, состоящий из линейной двухцепочечной ДНК размером 45 000 пар оснований (рис. 41.5). В зависимости от физиологического статуса микроорганизма дальнейшее развитие фага может протекать либо по **лизогенному** пути, который заключается в **интеграции** фаговой ДНК с хозяйским геномом и сохранении

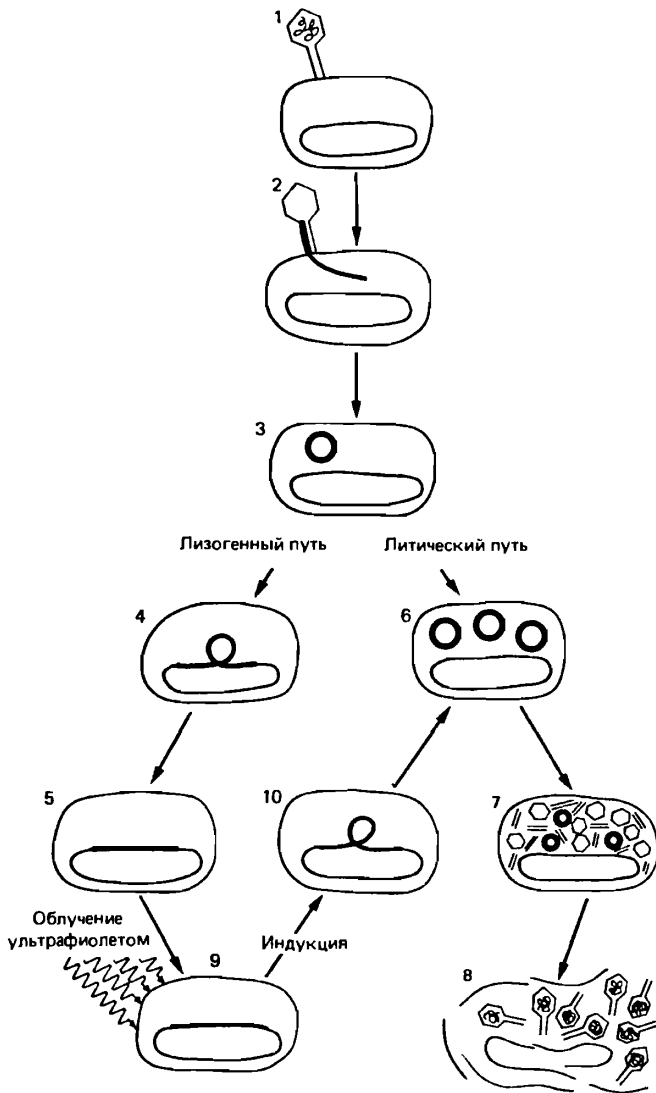


Рис. 41.5. Заражение *E. coli* фагом λ начинается с адсорбции фаговой частицы на поверхности бактериальной клетки (1). Следующий этап — инъекция фаговой ДНК (темная линия) в клетку (2, 3). Далее события развиваются в одном из двух возможных направлений. При лизогенном пути фаговая ДНК встраивается в бактериальную хромосому (4, 5). В этом случае ДНК фага реплицируется, как интегральная часть хромосомы — пассивно, при клеточном делении. Клетки, несущие интегрированный («спящий») вирус, называют лизогенными, а сам интегрированный фаг — профагом. При альтернативном литическом пути развития инфекции фаговая ДНК реплицируется независимо (6) и направляет синтез фаговых белков (7). Образуется около 100 новых фаговых частиц. Размножение фага в конечном итоге приводит к лизису клетки-хозяина (8). Профаг может быть индуцирован при воздействии различных факторов, например при ультрафиолетовом облучении (9). Индуцирующий агент осуществляет переключение в работе двух альтернативных наборов генов. При этом ДНК фага вырезается из хозяйской хромосомы (10) и начинается литический цикл. (Reproduced, with permission, from Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O A genetic switch in a bacterial virus. *Sci. Am.* [Nov.] 1982, 247, 128.)

в скрытой форме вплоть до «активации» (см. ниже), либо по пути **литического развития**. При этом происходит серия репликаций ДНК фага и образуется примерно 100 копий фагового генома. Каждый из них упаковывается в белковый капсид, зрелые фаговые частицы вызывают лизис хозяйской клетки. Освободившиеся бактериофаги могут вновь инфицировать чувствительные бактериальные клетки.

Будучи интегрированной с геномом клетки-хозяина, ДНК фага λ сохраняется в «скрытом» состоянии (в виде профага) до тех пор, пока не будет подвержена активации в результате воздействия на лизогенную клетку тех или иных ДНК-повреждающих агентов. В ответ на такое воздействие профаг «индуцируется» — начинается транскрипция и трансляция фаговых генов, необходимых для вырезания фаговой ДНК из хозяйской хромосомы, ее репликации, упаковки в белковый капсид и клеточного лизиса. Это развитие запускается с помощью механизма, подобного триггерному, что соответствует варианту С на рис. 41.1. Это означает, что после акта индукции профага обратное развитие становится невозможным: процесс протекает вплоть до клеточного лизиса и высвобождения новых фаговых частиц. **Переключение** пути развития с лизогенного (состояние профага) на **литический** (вирулентный фаг) прекрасно изучено на молекулярном и генетическом уровнях и будет далее представлено в виде парадигмы.

В переключении пути развития фага участвует область ДНК размером в 80 пар оснований, называемая «правым оператором» (O_R) (рис. 41.6. А). **Правый оператор** фланкирован слева структурным геном **репрессора** фага лямбда, а справа — структурным геном другого регуляторного белка, называемого **cro**. Единственным фаговым геном, экспрессирующимся при нахождении фаговой ДНК в составе хозяйской хромосомы, т.е. в состоянии профага, является **ген репрессора**. При литическом развитии ген репрессора не экспрессируется, но идет активная экспрессия гена *cro*, равно как и многих других фаговых генов. Таким образом, когда **ген репрессора включен**, **ген *cro* — включен**, и наоборот, когда **ген *cro* включен**, **ген репрессора — выключен**. Как мы увидим далее, эти два гена регулируют друг друга, что в конечном счете и определяет выбор между литическим и лизогенным путями развития фага λ .

Область оператора состоит из трех расположенных друг за другом дискретных похожих, но не идентичных участков последовательности длиной по 17 пар оснований (рис. 41.6. Б). Каждый из этих трех участков O_{R1} , O_{R2} и O_{R3} может связывать репрессор или *cro*-белок главным образом за счет контактов между молекулой белка и большой бороздкой двойной спирали ДНК. Область ДНК между генами репрессора и *cro* также содержит две промоторные по-

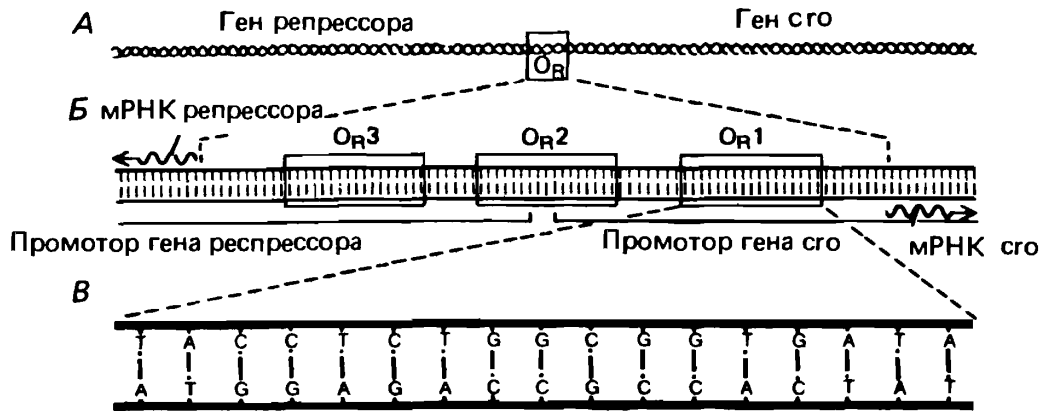


Рис. 41.6. Схематическое изображение правого оператора (O_R) фага λ (серия рисунков с последовательным увеличением количества деталей структуры). Область оператора — это участок фаговой ДНК размером около 80 п. о. **А.** Операторная область фланкируется геном лямбда-репрессора (слева) и геном регуляторного белка *cro* (справа). **Б.** Область оператора состоит из трех функциональных участков O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} , каждый длиной 17 пар оснований. Все три участка узнаются как репрессором, так и белком *cro*. Эти участки перекрываются с последовательностями двух промоторов, т. е. с участками связывания РНК-полимеразы, что необходимо для начала синтеза мРНК (волнистая линия), по которой затем идет синтез соответствующего белка. **В.** Нуклеотидная последовательность участка O_{R1} . (Reproduced with permission from Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O. A genetic switch in a bacterial virus. *Sci. Am.* [Nov.] 1982, 247, 128.)

следовательности, которые определяют связывание РНК-полимеразы в определенной ориентации. Один промотор направляет транскрипцию **вправо**, и потому с него транскрибируется *cro* и другие дистальные гены. Другой промотор направляет транскрипцию **влево**, т. е. в направлении транскрипции гена **репрессора** (рис. 41.6, **В**).

Продукт гена репрессора, **белок-репрессор**, состоящий из 236 аминокислот, организован в **двухдоменную** структуру, в которой **Н-концевой домен связывается с ДНК операторного участка**, а **С-концевой домен отвечает за связывание с другой молекулой репрессора с образованием димера**. Димерный репрессор связывается с **ДНК оператора** более прочно, чем мономер (рис. 41.7, **А—В**).

Продукт гена *cro*, **cro-белок**, состоящий из 66 аминокислот, обладает **однодоменной** структурой, но также связывается более прочно с оператором в **димерной** форме (рис. 47.7, **Г**). Очевидно, что единственный домен *cro*-белка отвечает как за связывание с ДНК, так и за димеризацию.

В лизогенной бактерии, содержащей фаг λ в состоянии профага, λ -репрессор связывается **преимущественно с O_{R1}** , и при этом за счет кооперативных взаимодействий способствует связыванию другой димерной молекулы репрессора с участком O_{R2} (рис. 41.8). Из трех участков оператора наименьшим сродством к репрессору характеризуется участок O_{R3} . Связывание репрессора с O_{R1} приводит к двум основным эффектам. Во-первых, **РНК-полимераза не может связаться с правонаправленным промотором**, и, следовательно, *cro*-ген не экспрессируется. Во-вторых, как сказано выше, репрессорный димер, связавшись с O_{R1} , усиливает связывание другого ди-

мера с O_{R2} . Связывание репрессора с O_{R2} дает **важный дополнительный эффект, проявляющийся в повышении эффективности связывания РНК-полимеразы с левонаправленным промотором**, перекрывающимся с O_{R2} , что приводит к усилению экспрессии гена репрессора. Такое усиление, по-видимому, опосредовано взаимодействием белок—белкового характера между репрессором, связанным с O_{R2} , и РНК-полимеразой, связанной с промотором. Следовательно, λ -репрессор служит одновременно и **негативным регулятором**, препятствующим транскрипции гена *cro*, и **позитивным регулятором**, усиливающим транскрипцию своего собственного гена. Этот двойственный характер действия репрессора обуславливает стабильность состояния профага: репрессор не только подавляет экспрессию генов литического развития, но и усиливает свою собственную экспрессию. И то и другое способствует поддержанию лизогенного статуса клетки (т. е. существование бakteорифага в форме профага). Когда концентрация репрессора достигает очень высоких значений, становится возможным его связывание с O_{R3} , что в свою очередь понижает эффективность транскрипции гена репрессора с левого промотора. Как следствие этого, концентрация репрессора снижается до таких значений, при которых происходит диссоциация комплекса репрессора с участком O_{R3} .

Когда ДНК-повреждающий сигнал, например ультрафиолетовое облучение, оказывает воздействие на лизогенную бактериальную клетку, образующиеся фрагменты одноцепочечной ДНК активируют специфическую бактериальную **протеазу**, кодируемую геном *recA* (рис. 41.8). Активированная *recA*-протеаза расщепляет ту часть молекулы ре-

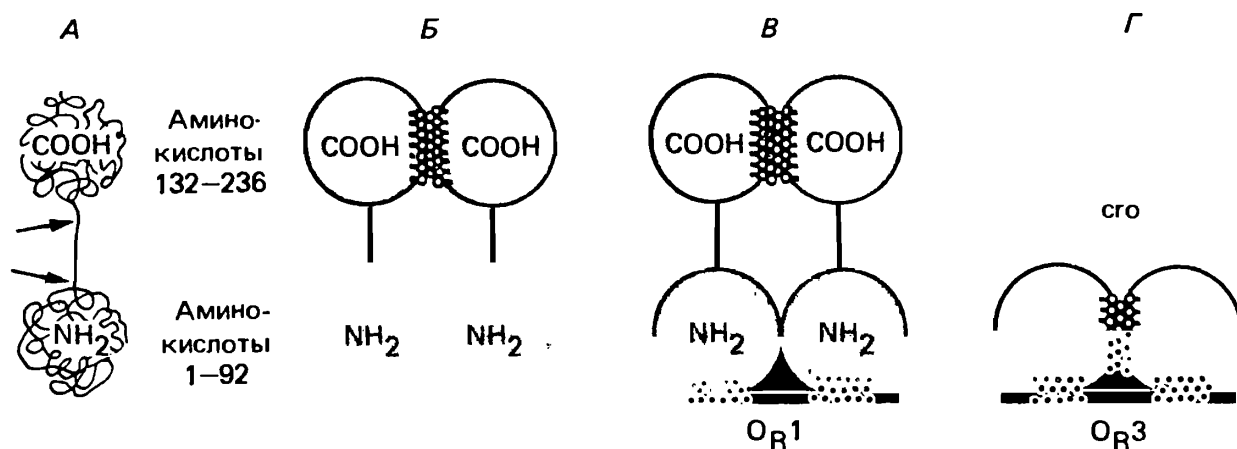


Рис. 41.7. Белок лямбда-репрессора представляет собой полипептид длиной 236 аминокислот. Полипептид сворачивается в гантелеобразную структуру, в рамках которой можно выделить два домена — N- и С-концевой. Эти два домена соединены между собой участком полипептидной цепи, чувствительным к действию протеаз (А). Единичные молекулы репрессора (мономер) ассоциируют в димеры (Б). Димер способен вновь диссоциировать до мономеров. Момеры удерживаются в димере в основном за счет взаимодействия С-концевых доменов (область контакта заштрихована). Димеры репрессора способны обратимо связываться с операторным участком, проявляя наибольшее сродство к участку O_R1 (В). Контакты с ДНК (заштрихованная область) осуществляются в основном при участии N-концевых доменов. Белок *cro* (Г) — однодоменный белок, обладающий сайтами димеризации; в димерной форме этот белок связывается с оператором, предпочитительно с участком O_R3 . (Reproduced with permission from Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O. A genetic switch in bacterial virus *Sci. Am* [Nov.] 1982, 247, 128.)

репрессора, которая соединяет его N- и С-концевые домены. Такое расщепление приводит к диссоциации димера репрессора, а затем и его комплекса с O_R2 и с O_R1 . Последствия удаления репрессора с участков O_R1 и O_R2 легко предсказуемы. РНК-полимераза немедленно получает доступ к правонаправленному промотору и начинает транскрипцию гена *cro*. Кроме того, утрачивается и усиливающий эффект комплекса репрессор— O_R2 на левостороннюю транскрипцию (рис. 41.8).

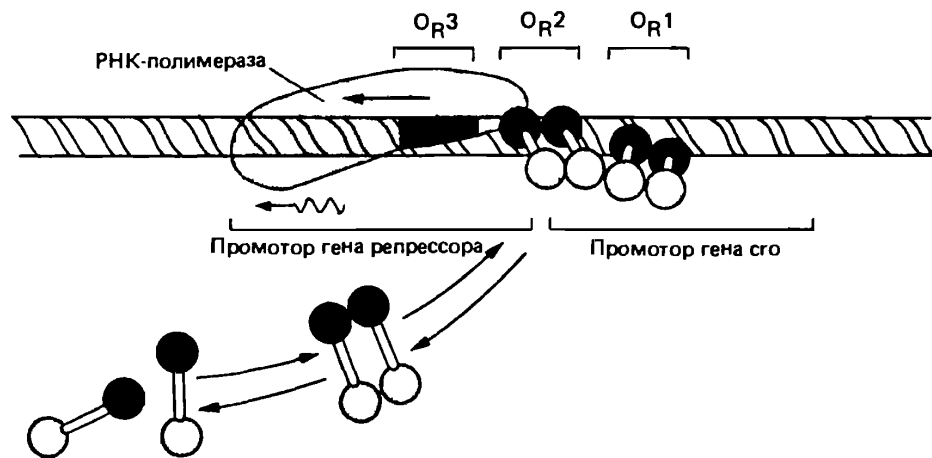
Белок *cro*, образующийся при трансляции новообразованного транскрипта, также связывается

с операторной областью в димерной форме, но порядок предпочтения операторных участков у *cro*-белка — обратный по сравнению с белком-репрессором. То есть *cro*-белок наиболее прочно связывается с O_R3 , при этом полностью отсутствует какой-либо кооперативный эффект связывания с O_R3 в отношении связывания другой димерной молекулы с участком O_R2 . При повышении концентрации *cro*-белка начинает связываться с O_R2 , а затем и с O_R1 .

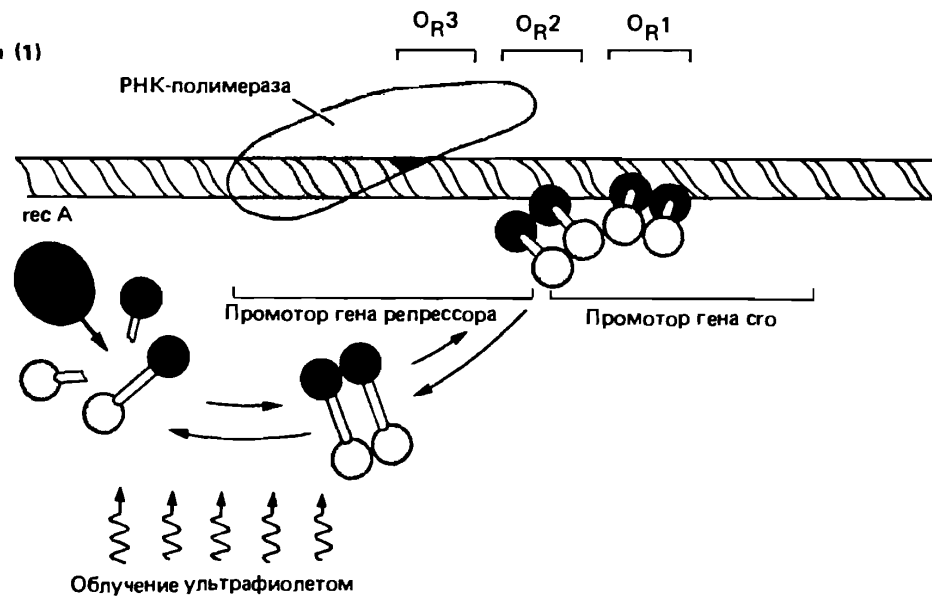
«Посадка» *cro*-белка на O_R3 незамедлительно отключает левостороннюю транскрипцию и, следова-

Рис. 41.8. Четыре стадии жизненного цикла фага λ и схема переключения пути развития. Лизогенный путь (вирус в состоянии профага) избирается при связывании димерного репрессора с O_R1 . Посадка репрессора на O_R1 способствует связыванию другой молекулы репрессора с O_R2 . В состоянии профага (вверху) димеры репрессора, связавшись с O_R1 и O_R2 , препятствуют посадке РНК-полимеразы на расположенный справа промотор и таким образом блокируют синтез *cro*-белка (негативный контроль). При этом одновременно стимулируется связывание полимеразы с расположенным слева промотором (позитивный контроль), что приводит к более активной транскрипции гена репрессора (репрессорная мРНК изображена волнистой линией) и соответственно к более эффективной наработке белка-репрессора, обеспечивающего поддержание лизогенного состояния. Профаг может быть индуцирован, когда активированная ультрафиолетовым облучением протеаза *гес А* начинает расщеплять момеры репрессора. Равновесие между свободными молекулами мономеров, димеров и связанных с оператором димеров нарушается, и димеры покидают операторный участок. Ничто более не способствует связыванию РНК-полимеразы с левым промотором, и синтез репрессора прекращается. В процессе индукции высвобождаются все операторные участки, полимеразы связываются с правым промотором и начинается наработка *cro*-белка. На ранних этапах литического цикла единичный димер *cro*-белка связывается с участком O_R3 , к которому он обладает повышенным сродством. Теперь полимеразы не могут связаться с левым промотором, а правый промотор остается доступным. Полимераза продолжает связываться с ним. Происходит транскрипция гена *cro* и других ранних литических генов. Устанавливается литический путь развития. (Reproduced with permission from Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O. A genetic switch in bacterial virus. *Sci. Am.* [Nov.] 1982, 247, 128.)

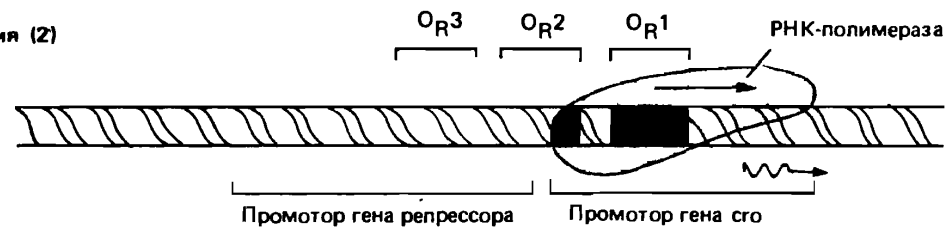
Профаг



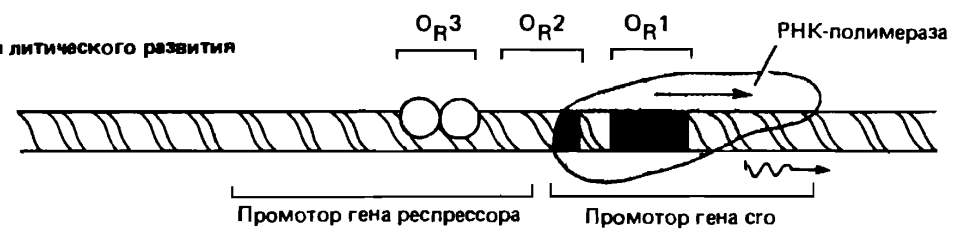
Индукция (1)



Индукция (2)



Ранние этапы литического развития



тельно, препятствует дальнейшей экспрессии гена репрессора. Таким образом происходит полное переключение — экспрессируется *cro*-ген, а ген репрессора выключен. Это событие необратимо, вслед за ним начинается экспрессия остальных фаговых генов, т. е. запускается цикл нормального литического развития фага λ . Когда концентрация σ -белка становится достаточно высокой, он связывается с участком O_R1 и таким образом снижает уровень экспрессии собственного гена, что существенно для реализации последних стадий цикла литического развития.

И для σ -белка, и для белка-репрессора с помощью методов рентгеновской кристаллографии установлена пространственная структура. Предложены и проверены модели связывания данных белков с ДНК, проанализированы и имеющие к этому отношение молекулярные и генетические события. До настоящего времени фаг λ остается наиболее изученным и в отношении молекулярного механизма регуляции экспрессии генов.

Аттенуация транскрипции

Бактериальные опероны, ответственные за биосинтез аминокислот, часто обладают дополнительной системой контроля экспрессии, основанной на преждевременной **терминации транскрипции**. Этот процесс, называемый **аттенуацией**, функционирует независимо от промоторно — операторной системы регуляции экспрессии. Аттенуация используется для регуляции экспрессии в ответ на воздействие различных физиологических факторов. Процесс регуляции на основе аттенуации включает начало трансляции, остановку рибосомы и переключение альтернативных вариантов **вторичной структуры РНК**, один из которых формирует терминатор транскрипции, а другой — препятствует образованию терминаторной структуры. У *E. coli* объектами аттенуации являются опероны триптофана, фенилаланина, гистидина, треонина, лейцина, изолейцина и валина.

Остановимся на аттенуации триптофанового (Trp) оперона, как наиболее полно изученной системе. Структура триптофанового (Trp) оперона представлена на рис. 41.9. Его промоторно — операторная система регуляции аналогична описанной выше для Lac-оперона. Репрессия Trp-оперона приводит к 70-кратному снижению уровня транскрипции, однако мутанты, лишенные функциональной системы репрессии, тем не менее сохраняют способность отвечать на триптофановое голодание 8 — 10-кратным повышением уровня синтеза Trp-мРНК. При анализе других типов мутаций в *E. coli* стало ясно, что процесс аттенуации связан скорее с эффективностью трансляции триптофановых кодонов, чем с непосредственным влиянием изменения концентрации свободного триптофана в среде. Вскоре было установлено, что в TrpL-участке (рис. 41.9) оперона

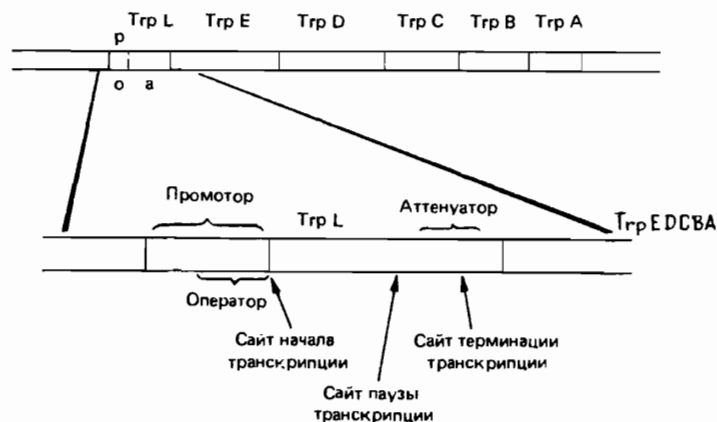


Рис. 41.9. Регуляторная область и структурные гены Trp-оперона *E. coli*. Инициация транскрипции контролируется промотором-оператором. Терминация транскрипции контролируется аттенуатором в области 162-звенной лидерной последовательности Trp L. Все молекулы полимеразы, осуществляющие транскрипцию оперона, прежде чем двигаться дальше, делают временную остановку на участке аттенуации. (Reproduced with permission from Yanofsky C. Attenuation in control of expression of bacterial operons. Nature 1981, 289, 751.)

может происходить преждевременная герминация транскрипции, предотвращающая транскрипцию дистальных генов (TrpEDCBA) оперона. Эта преждевременная терминация происходит тогда, когда трансляция триптофановых кодонов в TrpL протекает с нормальной скоростью. В результате такой терминации (аттенуации) образуется так называемый **лидерный транскрипт** длиной 140 нуклеотидов вместо протяженного полицистронного транскрипта всего оперона, необходимого для образования всех ферментов пути биосинтеза триптофана. С помощью методов генной инженерии удалось получить мутации по аттенуаторному участку и провести анализ соответствующих нуклеотидных последовательностей. Комбинация генетических и генно-инженерных подходов позволила воссоздать следующую динамическую картину процесса аттенуации.

На участке Trp-промотора РНК-полимераза, свободная от контроля со стороны репрессора, начинает транскрипцию оперона и доходит до 90-го нуклеотида (рис. 41.10), где она делает временную остановку. Во время этой паузы к образовавшемуся 5'-концу лидерного транскрипта в области 27—29 стартового кодона AUG прикрепляется рибосома, происходит трансляция лидерного пептида длиной 14 аминокислот. Начиная с положения 54, в транскрипте последовательно расположены два триптофановых кодона, поэтому для продолжения трансляции необходимо присутствие тРНК^{Trp}. Следует отметить, что триптофан — относительно редкая аминокислота. Еще реже два остатка триптофана располагаются друг за другом в составе полипептидов,

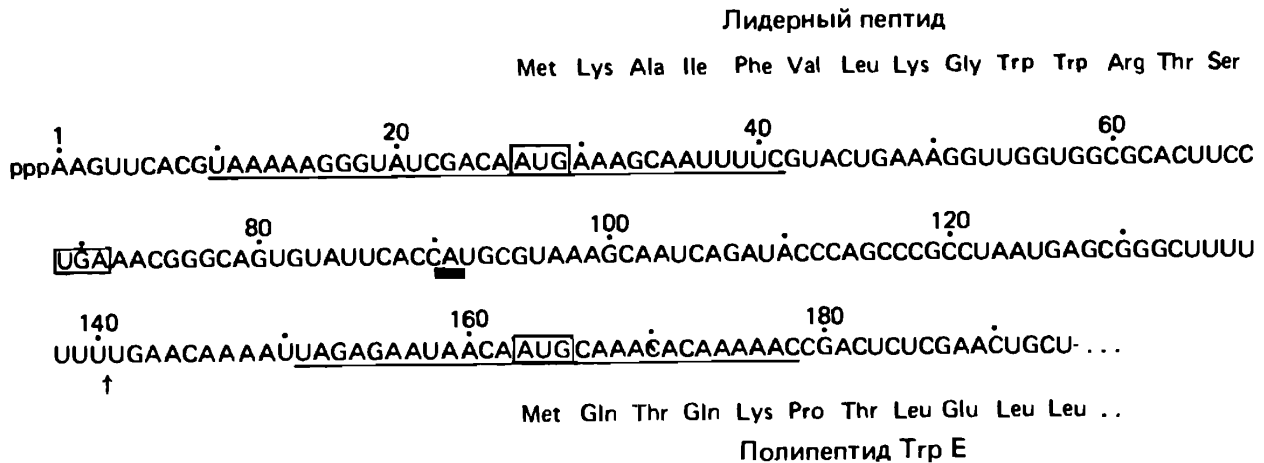


Рис. 41.10. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Trp-мРНК. Показан нетерминированный транскрипт. При терминеции транскрипции на аттенуаторе образуется 140-нуклеотидный транскрипт. Его 3'-конец обозначен стрелкой. 3'-Конец 90-членного транскрипта, образованного при остановке в сайте паузы транскрипции, показан жирной чертой. Два сайта связывания рибосомы с триплетами AUG в центре подчеркнуты. Заключены в квадраты кодоны начала (AUG) и конца (UGA) трансляции. Показаны предполагаемые аминокислотные последовательности лидерного пептида и начала белка Trp E. (Reproduced with permission from Yanofsky C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature 1981 289, 751.)

поэтому трансляция лидерного пептида является способом «тестирования» уровня тРНК^{Trp}, который в свою очередь зависит от уровня триптофана в клетке. Когда РНК-полимераза возобновляет транскрипцию после сайта остановки (в положении 90), рибосома, транслирующая лидерный пептид, доходит до стоп-кодона (в положении 70) при наличии в достаточных количествах тРНК^{Trp}. При недостатке тРНК^{Trp} рибосома останавливается раньше — на участке, содержащем два tandemных триптофановых кодона. Положение рибосомы на лидерном транскрипте определяет выбор одной из двух альтернативных вторичных структур, образуемых РНК-транскриптом.

Нуклеотидная последовательность лидерного транскрипта такова, что между областями, обозначенными цифрами 1 и 2, 3 и 4, возможно формирование **шпильчатых структур** (рис. 41.11) в соответствии с правилами образования комплементарных пар (A:U, G:C). Шпилька между областями 3 и 4 служит сигналом терминации транскрипции. В этом случае транскрипция завершается примерно за 140-м нуклеотидом с образованием преждевременно терминированного транскрипта длиной 140 нуклеотидов.

Области 2 и 3 транскрипта также способны образовывать шпильку. Это приводит к образованию альтернативной вторичной структуры, препятствующей формированию терминирующего сигнала шпильки 3:4. Когда рибосома временно останавливается на двух Trp-кодонах (рис. 41.11, Б), область 1 оказывается «защищена», а области 2 и 3 образуют шпильчатую структуру. Тем самым исключается преждевременная терминация и РНК-полимераза может

продолжить транскрипцию за 140-й нуклеотид с образованием полицистронной мРНК, которая кодирует ферменты биосинтеза триптофана.

Если в клетке имеется достаточное количество Trp—тРНК^{Trp}, рибосома проходит Trp-кодоны в лидерной последовательности и доходит до сигнала остановки трансляции (UGA) в области 2, экранируя таким образом обе области — 1 и 2. При этом сегменты 3 и 4 могут образовать шпильку — сигнал преждевременной терминации транскрипции, далее которого РНК-полимераза не сможет вести транскрипцию оперона. Вместо полицистронной мРНК, кодирующей ферменты триптофанового оперона, образуется преждевременно терминированный транскрипт длиной 140 нуклеотидов. Образование взаимоисключающих вторичных структур (между областями 2 и 3 или 3 и 4) и является внутриклеточным сигналом, информирующим РНК-полимеразу о способности клетки транслировать триптофановые кодоны.

На рис. 41.12 представлены аминокислотные последовательности лидерных пептидов, предсказанные по соответствующим нуклеотидным последовательностям, для нескольких других оперонов *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. Из рисунка видно, что в кодирующей последовательности существенно преобладает именно та аминокислота, ферменты биосинтеза которой кодируются данным опероном.

Недавно феномен аттенуации был описан и для клеток млекопитающих. Механизм аттенуации для них неизвестен, однако очевидно, что он должен сильно отличаться от вышеописанного, поскольку транскрипция и трансляция у эукариот происходят в разных внутриклеточных компартментах.

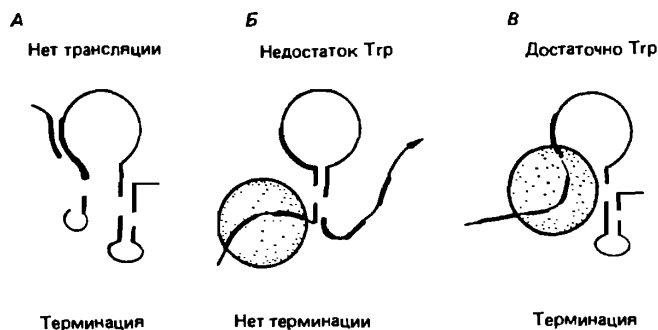


Рис. 41.11. Модель процесса аттенуации для Тгр-оперона *E. coli*. При избытке триптофана рибосома, транслирует лидерную РНК, в результате синтезируется полный лидерный пептид. Рибосома маскирует области 1 и 2 цепи мРНК и препятствует таким образом образованию шпильки из последовательностей 1:2 и 2:3. В этих условиях свободно образуется только шпилька 3:4, РНК-полимераза (не показана) транскрибирует лидерный пептид до полной остановки транскрипции. При недостатке триптофана заряженная тРНК^{Тгр} будет лимитирующим фактором и рибосома задержится на tandemных триптофановых кодонах лидерного пептида. В данном случае рибосома маскирует только область, поэтому может образоваться шпилька 2:3, что исключает возможность образования терминирующей шпильки 3:4. В связи с этим РНК-полимераза продолжает транскрипцию области структурных генов. Когда лидерный транскрипт не транслируется, становится возможным образование шпильки 1:2 непосредственно после синтеза соответствующих участков в ходе транскрипции, что в свою очередь создает благоприятные условия для формирования терминирующей шпильки 3:4. (Reproduced with permission from Oxender D., Zurawski G., Yanofsky C. Attenuation of the *Escherichia coli* tryptophan operon: Role of RNA secondary structure involving tryptophan codon region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979. 76, 5524.)

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ

В эукариотических клетках ядерная мембрана физически разделяет процессы транскрипции и трансляции, поскольку рибосомы присутствуют только в цитоплазме. Экспрессия генов у эукариот включает гораздо большее число этапов, нежели у прокариот, особенно это относится к процессингу РНК. Соответственно у эукариот существует ряд точек приложения регуляторных воздействий, полностью отсутствующих в прокариотических системах. Так, процессинг РНК у эукариот включает экзпирование 5'-конца первичного транскрипта, добавление полиаденилатного «хвоста» к 3'-концу транскрипта и вырезание интронов. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют, что экспрессия генов эукариот регулируется на уровне **транскрипции, процессинга РНК в ядре и стабильности мРНК**. Кроме того, было показано, что на экспрессию эукариотических генов оказывают влияние **амплификация и перестройка генов**.

Лидерные пептиды Phe, His, Leu, Thr, и Ile

PheA: Met-Lys-His-Ile-Pro-PHE-PHE-PHE-Ala-PHE-PHE-PHE-Thr-PHE-Pro
His: Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-HIS-HIS-HIS-HIS-HIS-HIS-HIS-Pro-Asp
Leu: Met-Ser-His-Ile-Val-Arg-Phe-Thr-Gly-LEU-LEU-LEU-LEU-Asn-Ala-Phe-Ile-Val-Arg-Gly-Arg-Pro-Val-Gly-Gly-Ile-Gln-His
Thr: Met-Lys-Arg-Ile-Ser-THR-THR-Ile-THR-THR-THR-Ile-THR-Ile-THR-THR-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly
Ile: Met-Thr-Ala-LEU-LEU-Arg-VAL-ILE-Ser-LEU-VAL-VAL-ILE-Ser-VAL-VAL-VAL-ILE-ILE-ILE-Pro-Pro-Cys-Gly-Ala-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Lys-Ala

Рис. 41.12. Установленные по нуклеотидной последовательности первичные структуры лидерных пептидов Phe A-, His-, Leu-, Thr- и Ile (изолейцин, лейцин, валин)-оперонов *E. coli* или *S. typhimurium*. Аминокислоты, регулирующие данный оперон, выделены шрифтом и подчеркнуты. (Reproduced with permission from Yanofsky C. Attenuation in control of expression of bacterial operons. Nature 1981, 289, 751.)

Благодаря достижениям генной инженерии за последние годы достигнут значительный прогресс в понимании процесса экспрессии эукариотических генов. Однако, поскольку большинство эукариот содержит значительно больше генетической информации, чем прокариоты, а возможности манипуляций с генами эукариот существенно ограничены, молекулярные аспекты регуляции эукариотических генов изучены гораздо хуже. В этой части главы очень кратко представлено несколько типов регуляции эукариотических генов.

Амплификация генов в ходе развития

На ранних этапах развития многоклеточных возникла необходимость в резком увеличении числа определенных молекул, например рибосомных РНК или мРНК белков, формирующих такие специфические образования, как, например, яичная скорлупа. Одним из путей интенсификации синтеза таких молекул может служить увеличение числа копий соответствующих генов. Так, например, повторяющиеся последовательности ДНК включают сотни копий генов рРНК и тРНК. Многокопийность этих генов заложена в геномном материале гамет изначально и, следовательно, передается от поколения к поколению. У некоторых организмов, таких, как плодовая мушка (*Drosophila*), амплификация нескольких определенных генов, например генов белков хориона, происходит в ходе оогенеза. В этом случае увеличение числа копий данного гена, вероятно, достигается путем многократной инициации синтеза ДНК в од-

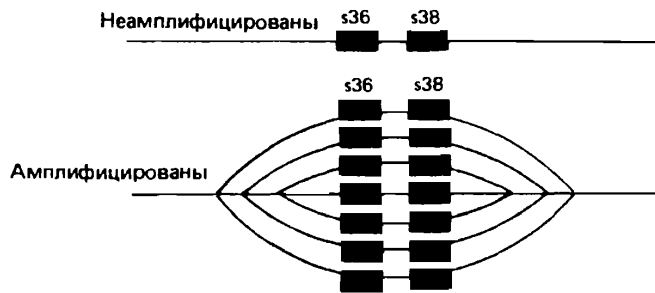


Рис. 41.13. Схема процесса амплификации генов хорионических белков s36 и s38. (Reproduced with permission from Chisholm R. Gene amplification during development. Trends Biochem. Sci. 1982, 7, 161.)

ном и том же репликационном пузыре, благодаря чему возникают множественные сайты инициации транскрипции соответствующих генов (рис. 38.16 и 41.13).

В последние годы появилась возможность вызывать амплификацию специфических областей генома культивируемых клеток млекопитающих. В некоторых случаях последовательное применение увеличивающихся доз селективного агента приводит к амплификации специфического гена в несколько тысяч раз. Так, у онкологических больных, получавших метотрексат (противораковый препарат), развивалась устойчивость опухолевых клеток к этому лекарству. В основе этой лекарственной резистентности лежит амплификация гена дигидрофолатредуктазы, которая сама по себе является точкой приложения в терапевтическом действии метотрексата. Спонтанно произошедшая амплификация генов *in vivo*, т. е. в отсутствие экзогенных селективных агентов, может закрепиться в геноме при соответствующем давлении отбора.

Перестройка генов иммуноглобулинов

Один из наиболее интересных и сложных вопросов, вставших перед биологами в последние десятилетия, был связан с генетическими и молекулярными основами множественности антител (см. гл. 55). Кроме того, благодаря достижениям в области иммунологии было показано, что клетки иммунной системы человека, дифференцируясь, производят антитела с одной и той же специфичностью, но с различными эффекторными функциями. В последние несколько лет исследования ряда лабораторий внесли весомый вклад в понимание генетической основы множественности антител и регуляции экспрессии генов иммуноглобулинов в ходе развития и клеточной дифференцировки.

Как описано в гл. 39, нуклеотидные последовательности, кодирующие ту или иную белковую молекулу, в геноме млекопитающих часто оказываются разделенными на отдельные сегменты, непосред-

ственно не связанные между собой. Впервые раздельная локализация фрагментов одного и того же гена была продемонстрирована на примере сегментов ДНК, кодирующих переменный и константный домены легкой цепи молекулы иммуноглобулинов (антител). Иммуноглобулины, как описано в гл. 55, состоят из двух различных полипептидных цепей — легкой (L) и тяжелой (H) (рис. 55.3). Как L-, так и H-цепи имеют на N-конце переменные (V) и на C-конце константные (C) участки. Переменные области ответственны за распознавание антигенов (чужеродных молекул), а константные — за эффекторные функции, определяющие дальнейшую судьбу комплекса антиген-антитело.

За формирование молекулярной структуры иммуноглобулинов отвечают три несцепленных семейства генов. Два из них кодируют легкие λ - и κ -цепи и одно — тяжелые цепи иммуноглобулинов.

Каждая легкая цепь детерминирована тремя отдельными сегментами — переменным (V_L), соединительным (J_L) и константным (C_L). Гаплоидный геном млекопитающих содержит около 500 различных V_L -сегментов, 5—6 J_L -сегментов и, вероятно, 10 или 20 C_L -сегментов. При дифференцировке лимфоидных В-клеток V_L -сегмент переносится с дистального участка данной хромосомы ближе к J_L - и C_L -сегментам. Такая перестройка хромосомной ДНК позволяет осуществить транскрипцию всех трех сегментов в виде единого первичного транскрипта РНК-предшественника, образующего после процессинга зрелую молекулу мРНК легкой цепи иммуноглобулинов данного вида. Перестановка различных V_L -, J_L - и C_L -сегментов в геноме позволяет иммунной системе организма создать чрезвычайно разнообразную библиотеку антигенспецифических молекул иммуноглобулинов. Такие перестановки при образовании генов легких цепей называют V — J -соединением.

Тяжелая цепь кодируется четырьмя сегментами: V_H , D (от англ. diversity — разнообразие), J_H и C_H . Переменная область тяжелой цепи образуется при соединении V_H -, J_H - и D-сегментов. Образовавшаяся V_H —D— J_H -область ДНК в свою очередь соединяется с одним из восьми C_H -генов. Эти C_H -гены (C_{μ} , C_{δ} , $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2b}$, $C_{\alpha 2a}$, C_{α} и C_{ϵ}) определяют классы и подклассы — IgM, IgG, IgA и т. д. — иммуноглобулиновых молекул (см. гл. 55). Пример перестройки и процессинга, приводящих к образованию тяжелой цепи $C_{\gamma 2b}$, представлен на рис. 41.14.

В результате дифференцировки В-клетки, секретирующие антитела против определенного антигена, получают возможность секретировать антитела различных классов, характеризующихся одинаковой антигенной специфичностью, но различной биологической функцией. Различные классы иммуноглобулинов построены из одинаковых легких цепей и V_H -областей тяжелых цепей, но содержат различные C_H -

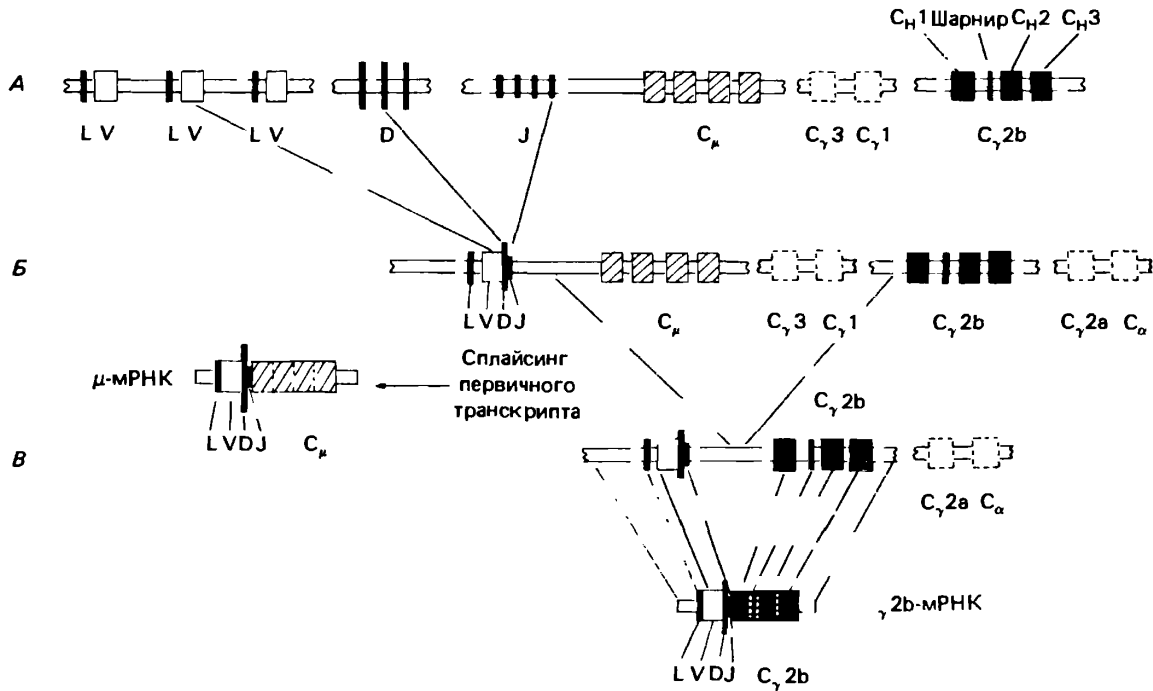


Рис. 41.14. Рекомбинационные события, ведущие к образованию полноценного гена $\gamma 2b$ -иммуноглобулиновой тяжелой цепи. *А.* ДНК клеток зародышевой линии до перестроек. В геноме клеток зародышевой линии часть вариабельной области (V) молекулы кодируется кластером из по крайней мере 50 генов, каждый из которых обладает собственной короткой лидерной последовательностью (L). Кластер D-генов кодирует большую часть третьей гипервариабельной области. На некотором расстоянии расположены четыре J-сегмента, завершающие кодирующую V-область. На расстоянии около 8000 п. о. от J-сегментов расположен ген C_μ — первый из кластера генов C-области. Гены в C-области прерываются некодирующими последовательностями. Экзоны этой области структурно совпадают с доменами и шарнирным участком соответствующей аминокислотной последовательности. *Б.* При первой перестановке по одному сегменту каждого кластера (V, D, J) объединяются в единую структуру, формируя полноценную транскрипционную единицу μ -цепи. Транскрипт представляет собой копию показанного на рисунке гена. При удалении интронов образуется μ -мРНК, содержащая непрерывную кодирующую последовательность. *В.* При второй перестановке, отвечающей этапу переключения типа тяжелой цепи, делятируются сегменты C_μ , $C_\gamma 3$ и $C_\gamma 1$, а V—D—J-сегмент вместе с частью J— C_μ -интрона переносится к $C_\gamma 2b$ -гену. После завершения транскрипции интроны удаляются и формируется $\gamma 2b$ -мРНК, содержащая непрерывную кодирующую последовательность. (Reproduced, with permission, from Molgaard N. V. Assembly of immunoglobulin heavy chain genes. *Nature* 1980, 286, 659.)

области тяжелых цепей. Следовательно, единичная В-клетка и ее клоновые производные способны претерпевать «переключение классов» продуцируемых иммуноглобулинов. Переключение классов вызывается перестройкой ДНК другого типа, происходящей при дифференциации иммунной системы. Следует подчеркнуть, что соединение V- и J-сегментов для экспрессии легкой цепи и соединение сегментов V—D—J тяжелой цепи по стадии развития и по времени предшествуют перестройкам ДНК, вызывающим переключение классов синтезируемых иммуноглобулинов.

Переключение классов

В онтогенезе иммуноглобулин-секретирующих В-клеток и их клональных производных, включая окончательно дифференцированные клетки плазмы, последовательность синтеза и секреции иммуногло-

булинов начинается с IgM, затем переключается на синтез IgA или IgG и т. д. В геноме клеток зародышевой линии J_H -сегменты непосредственно соседствуют с C_H -генами и, таким образом, при произошедшей перестройке V_H —D— J_H -сегментов возможна прямая транскрипция предшественника мРНК для μ -цепи, не требующая каких-либо дополнительных перестроек. Однако при последующей дифференровке для переключения синтеза IgM на IgA V—D—J-область должна быть подвергнута перестановке для соединения с C_α -геном. Только после этого становится возможным синтез предшественника мРНК α -цепи, содержащей тот же самый антигенспецифичный вариабельный участок.

Порядок расположения восьми тесно сцепленных C_H -генов следующий: C_μ , C_α , $C_\gamma 3$, $C_\gamma 1$, $C_\gamma 2b$, $C_\gamma 2a$, C_α и C_ϵ . Порядок переключения синтеза классов во времени повторяет физический порядок расположения C_H -генов — слева направо. В большинстве изученных на

сегодняшний день случаев перестройки, связанные с переключением классов иммуноглобулинов, судя по всему, представляют собой делеции C_H -генов, расположенных между V—D—J-областью и 5'-концом присоединяемого C_H -гена.

Пример рекомбинационных событий или перестановок, приводящих к образованию полного C_{H2b} -гена, приведен на рис. 41.14. Вначале происходит перестановки, связанные с образованием V—D—J-области, а затем перестройка или делеция соответствующих C_H -генов. Последовательности участков гена соответствуют доменам, расположенным в области «шарнира» (гл. 55). Промежуточные последовательности или интроны удаляются из первичного транскрипта при сплайсинге, механизм которого рассмотрен в гл. 39.

Описанная комбинаторика сочетаний отдельных сегментов со всей очевидностью значительно увеличивает закодированный в геноме объем информации. Этот механизм не только обеспечивает множественность вариантов структур переменных областей, но позволяет закрепить полезные перестройки при изменении функции клеточной линии в ходе точной дифференцировки.

Кажущийся сложным процесс перестройки ДНК при развитии и дифференцировке клеток может быть объектом достаточно простой регуляции, основанной на своевременной индукции и репрессии специфических сшивающих белков, узнающих высококонсервативные последовательности, фланкирующие соответствующие кодирующие последовательности.

Транскрипционный контроль

В гл. 39 дано определение промотора как такого участка последовательности гена, с которым должна связываться РНК-полимераза, чтобы начать транскрипцию с соответствующего сайта. Промоторные последовательности точно определяют, где РНК-полимераза начнет транскрипцию. Решение вопроса о том, **когда** (или как часто) такая транскрипция должна происходить, представляет собой более сложную и значительно менее понятную проблему. Как показано в гл. 39, два отдельных фрагмента ДНК в комплексе со специфическими связывающимися белками определяют именно эти «где» и «когда». В предельном случае, когда транскрипция находится на нулевом уровне, вопросы «где» и «когда» не имеют особого смысла, поскольку транскрипция не начинается вовсе. Поэтому сигнал типа «где» является потенциальным сигналом, не имеющим смысла в том случае, если сигнал «когда» принимает значение «не сейчас». Как показано в гл. 38, в хроматине ядра можно выделить как достаточно обширные транскрипционно-неактивные области (конститутивно или факультативно), так и области потенциально-активного хроматина. Кроме того, как отмечалось

в гл. 38, метилирование дезоксицитидиновых остатков ДНК может приводить к значительным изменениям хроматина, препятствующим его транскрипции. Например, в клетках печени мыши экспрессируются только неметилированные рибосомные гены. Ряд данных указывает на то, что при метилировании ДНК вирусов животных она утрачивает транскрипционную активность. Однако из всего сказанного нельзя делать выводов общего характера о том, что вся метилированная ДНК транскрипционно-неактивна, или, что весь неактивный хроматин метилирован, или, что транскрипционно-активная ДНК обязательно не метилирована.

Роль энхансеров

В дополнение к крупным изменениям структуры хроматина, влияющим на транскрипционную активность, в молекуле ДНК существуют специфические сигналы-усилители, способствующие повышению эффективности транскрипции. Например, у вируса обезьян SV40 промотору ранних генов предшествуют (на расстоянии около 200 пар оснований) две идентичные тандемные последовательности длиной 72 пары оснований, способные значительно усиливать экспрессию генов *in vivo*. Эти так называемые **энхансерные элементы** (от англ. to enhance — усиливать) отличаются от промоторов двумя основными чертами. Они могут влиять на транскрипцию генов, даже будучи удалены от промоторов на тысячи пар оснований, и второе — их усиливающий эффект не зависит от ориентации. Действие энхансеров имеет неспецифический характер — они могут усиливать транскрипцию с любых доступных промоторов. Так, введение энхансерного элемента вируса SV40 в плазмиду, несущую клонированный ген β -глобина, может привести к 200-кратному усилению транскрипции этого гена. Энхансерный элемент, судя по всему, не кодирует какого-либо специфического эффектора, непосредственно воздействующего на промотор, поскольку его действие проявляется только по отношению к промоторам, находящимся на той же молекуле ДНК, что и сам энхансер (*цис-эффект*). В настоящее время уже выделены белки, связывающиеся с энхансерами. Изучение их функций, вероятно, поможет понять механизм действия этих регуляторных элементов. Энхансеры придают тем областям ДНК, где они расположены, гиперчувствительность к действию нуклеаз (см. гл. 38).

Уже выявлено много генов, обладающих энхансерами, расположенными самым различным образом относительно кодирующих участков. В дополнение к простому усилению транскрипции некоторые энхансерные элементы обладают тканевой специфичностью. Так, энхансер, расположенный между J- и C-областями генов иммуноглобулинов, усиливает экспрессию этих генов преимущественно в лимфоид-

ных клетках. Энхансерные элементы генов панкреатических ферментов способны избирательно усиливать экспрессию сцепленных с ними чужеродных генов в клетках поджелудочной железы мыши (введенных в составе генно-инженерной конструкции на стадии одноклеточного эмбриона методом микрохирургии). Таким образом, тканеспецифичная экспрессия генов может быть опосредована действием энхансеров или энхансероподобных элементов.

Другие регуляторные элементы

С помощью лигирования определенных областей ДНК, несущих предполагаемые регуляторные последовательности, с различными репортерными генами (метод **слияния** или **конструирования химерных генов**, рассмотренный в гл. 36) можно определить, какой именно из участков ДНК, расположенных вблизи структурного гена, оказывает влияние на его экспрессию. Во многих случаях было показано, что последовательности, расположенные в 5'-области по отношению к старту транскрипции, оказывают весьма существенное влияние на частоту инициации транскрипции. Рассмотрим в качестве примера **металлотионеин** — белок, связывающий тяжелые металлы и содержащий много остатков цистеина, который присутствует в большинстве органов млекопитающих. Если организм или культивируемая клеточная линия подвергаются обработке ионами металлов, таких, как цинк или кадмий, то наблюдается усиление транскрипции металлотионеинового гена и соответствующее повышение уровня белка металлотионеина, способного связывать потенциально токсичные ионы. С использованием методов генной инженерии стало возможным выделение области ДНК размером в несколько сот пар оснований, расположенной вблизи сайта инициации транскрипции гена металлотионеина. К этому **металлотионеиновому регуляторному элементу** можно присоединить другой структурный ген, например ген тимидинкиназы. Полученную химерную конструкцию можно ввести в культивируемые клетки, при этом в некой небольшой доли клеток реализуется встраивание чужеродной ДНК в геном. При обработке трансформированных таким образом клеток ионами тяжелых металлов наблюдается индукция тимидинкиназы с металлотионеинового промотора. Используя все более короткие участки исследуемой ДНК, можно точно определить положение искомого регуляторного элемента. Недавно подобный эксперимент был проведен на мышах. Металлотионеиновый промотор присоединяли к структурным генам тимидинкиназы или гормона роста. Генно-инженерные конструкции были введены в пронуклеус одноклеточного эмбриона самца, а эмбрион в свою очередь был введен в матку мыши для последующего развития. Мыши из полученного таким образом потомства

отвечали на присутствие цинка в питьевой воде усилением экспрессии тимидинкиназы или гормона роста. В последнем случае трансгенные животные достигали вдвое большего размера, чем контрольные нормальные особи.

Глюкокортикоиды — это класс стероидных гормонов, регулирующих экспрессию генов (см. гл. 44). При попадании молекул глюкокортикоидов в клетку млекопитающих они связываются со стероид-специфичным рецептором, который претерпевает при этом конформационные изменения в цитоплазме и проникает в ядро. Комплекс глюкокортикоид — рецептор взаимодействует со специфическим рецептор-связывающим сайтом ДНК в 5'-регуляторной области стероид-зависимых генов, например гена вируса рака молочной железы мыши, на расстоянии в несколько сот пар оснований от сайта инициации транскрипции. Посадка комплекса на рецептор-связывающий сайт, судя по всему, приводит к более эффективному использованию промотора РНК-полимеразой, усиливая таким образом экспрессию стероид-зависимых генов. Область ДНК, связывающаяся с гормон-рецепторным комплексом, также может быть клонирована и присоединена к другому структурному гену. После встраивания таких химерных конструкций в геном культивируемых клеток млекопитающих репортерные структурные гены приобретают способность контролироваться содержанием глюкокортикоидов в среде, т. е. становятся стероид-индуцибельными генами. Постепенно укорачивая нуклеазной обработкой концы клонируемого фрагмента и вводя в него мутации, можно идентифицировать районы ДНК, которые непосредственно участвуют в связывании с гормон-рецепторным комплексом. Создается впечатление, что связывание гормон-рецепторного комплекса с определенным участком ДНК превращает его в активный энхансерный элемент. В ближайшем будущем мы, вероятно, сможем разобраться в молекулярном механизме точной регуляции экспрессии эукариотических генов, в частности на примере стероид-зависимых генов.

Процессинг РНК как механизм регуляции экспрессии

Помимо регуляции экспрессии генов путем воздействия на эффективность использования промотора эукариотические клетки обладают дополнительным механизмом контроля экспрессии генов, основанным на **альтернативном процессинге РНК**. Существуют два общих типа контроля процессинга РНК: первый тип контроля основан на принятии решения о том, какие именно из первичных транскриптов вообще **подлежат процессингу**. Второй тип — **дифференциальный процессинг**. В отношении первого механизма очевидно, что первичные транскрипты, содержащие интроны, прежде, чем попасть в цито-

плазму в виде зрелых экспрессирующихся мРНК, должны обязательно подвергнуться сплайсингу, в ходе которого происходит удаление интронов. В ядре содержится значительно больший набор первичных транскриптов, чем соответствующих мРНК в цитоплазме. Таким образом, на каком-то уровне обязательно должно приниматься решение о том, какие транскрипты подлежат, а какие не подлежат процессингу. Что касается выбора первичных транскриптов, подлежащих процессингу, то механизм этого процесса неизвестен так же, как нет и прямого доказательства того, что выбор этот может меняться в ходе развития или в ответ на факторы окружающей среды.

Прямое доказательство дифференциального процессинга первичных транскриптов получено при изучении регуляции синтеза иммуноглобулинов.

Дифференциальный процессинг РНК

Выше уже говорилось о том, что первым иммуноглобулином, синтезирующимся при дифференцировке В-клеток, является IgM. Однако на самых ранних стадиях развития В-клеток IgM при секреции не проходит полностью через клеточную мембрану. С-концевая область μ -цепи, подобно мембранным белкам, остается встроенной в мембрану (см. гл. 42). μ -Цепь нормально секретируемого IgM обозначают μ_s , а μ -цепь IgM, остающегося связанным с мембраной, — μ_m . Аминокислотные последовательности μ_s и μ_m -цепей единичной В-клетки или клеточной линии идентичны вплоть до домена $C_{\mu}4$ С-концевой области (см. рис. 55.3). Вслед за доменом $C_{\mu}4$ в цепи μ_s расположен гидрофильный 20-звенный сегмент, в то время как С-конец μ_m -цепи содержит гидрофобный 38-звенный сегмент, заканчивающийся последова-

тельностью -Lys-Val-Lys. Этот гидрофобный сегмент вплоть до первого заряженного остатка Lys может встраиваться в двуслойную клеточную мембрану. Очевидно, что μ_s - и μ_m -цепи должны быть транскрибированы с различных молекул мРНК.

Такие различные молекулы мРНК были выделены, их нуклеотидные последовательности удалось определить по последовательности полученных с них кДНК-копий. Выяснилось, что μ_m -мРНК состоит из 2700 оснований, а μ_s -мРНК из 2400 оснований. Анализ нуклеотидной последовательности клонированного геномного участка, кодирующего молекулы μ -мРНК, показал, что оба вида μ -мРНК образуются из общего транскрипта-предшественника в результате альтернативного процессинга РНК в ядре. На рис. 41.15 представлены два возможных пути сплайсинга для образования μ_s - и μ_m -мРНК молекул, транскрибированных с единичного μ -гена.

Общий мРНК-предшественник содержит два потенциальных сайта полиаденилирования (см. гл. 39): один — между экзонами $C_{\mu}4$ и М и второй — со стороны 3'-конца от экзона М. В зависимости от того, какой из двух возможных сайтов полиаденилирования подвергается эндонуклеазной атаке в ходе подготовки к полиаденилированию, образуется тот или иной из двух типов μ -мРНК (μ_m - или μ_s -) тяжелых цепей с различными 3'-концами. Возможно, что именно выбор сайта полиаденилирования и определяет один из двух альтернативных вариантов сплайсинга экзонов первичного транскрипта.

Стабильность мРНК

Стабильность молекул матричной РНК в цитоплазме представляет собой фактор, изменение кото-

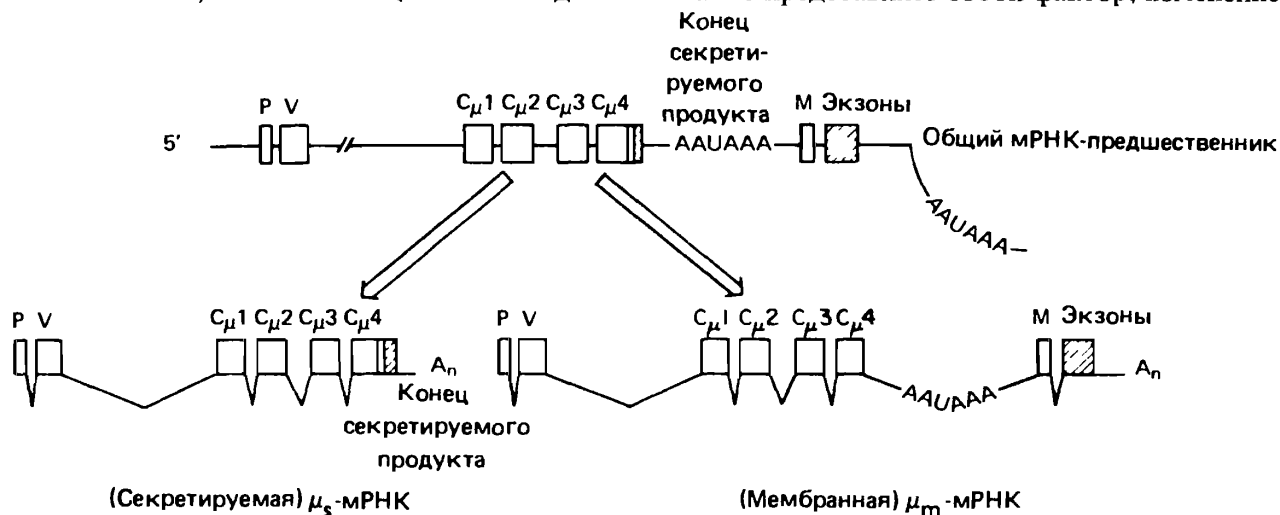


Рис. 41.15. Предполагаемый путь альтернативного сплайсинга μ_s - и μ_m -мРНК. На 5'-концах обеих молекул находится последовательность $C_{\mu}4$. Пустыми квадратами обозначены экзоны. 3'-Нетранслируемые последовательности заштрихованы. Р — экзон сигнального пептида, V — перестроенный V_H -экзон. Ломаными линиями обозначен путь сплайсинга. A_n — альтернативные сайты полиаденилирования (AAUAA) в транскриптах. (Reproduced, with permission, from Early et al. Two mRNAs can be produced from single immunoglobulin μ -gene by alternative RNA processing pathways. Cell 1980, 20, 313.)

Таблица 41.2. Частоты встречаемости различных типов контроля (с разрешения Darnell J. E. Variety in the level of gene control in eukariotic cells, Nature 1982, 297, 359 Copyright © 1982 by Macmillan Journals Ltd).

	Доказанные или строго обоснованные примеры	Возможные
Ядро		
Транскрипция:	Множество (> 100)	
Инициация		
Терминация		
Преждевременная остановка считывания (аттенуация)	1	+
Процессинг РНК		
Полиаденилирование	~ 3	
Альтернативный сплайсинг	1	
Цитоплазма		
Стабильность мРНК	~ 5 конкретных и множество общего характера	
Эффективность трансляции мРНК	~ 10 конкретных и множество общего характера	

Предполагается, что количество примеров будет расти для тех вариантов контроля, которые пока представлены лишь одним или несколькими примерами. На сегодняшний день бессмысленно даже предполагать, каковы же истинные частоты использования различных типов контроля экспрессии генов.

рого может влиять как положительно, так и отрицательно на уровень экспрессии данного гена. Стабилизация мРНК при фиксированной скорости транскрипции будет приводить к ее накоплению, и наоборот. О механизмах, вовлеченных в систему деградации мРНК, известно немного, и все же можно привести несколько описанных примеров контроля этого процесса. Эстрадиол продлевает время полужизни мРНК вителлогенина с нескольких до более чем 200

часов. Кроме того, известно, что эстрогены усиливают транскрипцию данного гена в 4—6 раз. Все это вместе приводит к значительному накоплению вителлогениновой мРНК. Время полужизни мРНК основного молочного белка — казеина — также значительно увеличивается при инкубации клеток молочной железы с гормоном пролактином.

Дифференциальная трансляция мРНК

Известны примеры определенных организмов или культивируемых клеточных линий, способных к дифференциальной трансляции зрелых мРНК, эффективность трансляции которых не удается достаточно четко различить in vitro. Это предполагает существование неких факторов, способных распознавать специфические зрелые молекулы мРНК и избирательно изменять скорость их трансляции по сравнению с другими молекулами мРНК.

В табл. 41.2 сравнивается частота различных типов контроля экспрессии эукариотических генов.

ЛИТЕРАТУРА

Comper S. J., Palmiter R. D. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells, *Cell*, 1981, **25**, 233.

Darnell J. E. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells, *Nature*, 1982, **297**, 365.

Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in protein synthesis, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 318.

McKnight S., Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells, *Cell*, 1986, **46**, 795.

Ptashne M., Johnson A. D., Pabo C. O. A genetic switch in a bacterial virus. *Sci. Am.* (Nov.), 1982, **247**, 128.

Shimizu A., Honjo T. Immunoglobulin class switching, *Cell*, 1984, **36**, 801.

Swift G. H. et al. Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice, *Cell*, 1984, **38**, 639.

Wu R., Bahl C. R., Narang S. A. Lactose operator-repressor interaction, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 1978, **13**, 137.

Yamamoto K. Steroid receptor regulated transcription of specific gene and gene networks, *Annu. Rev. Genet.*, 1985, **19**, 209.

Yanofsky C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons, *Nature*, 1981, **289**, 751.

Раздел V

Биохимия внутри- и межклеточных коммуникаций

Глава 42

Мембраны: структура, сборка и функции

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Мембраны — это чрезвычайно вязкие, но тем не менее пластичные структуры, окружающие все живые клетки. Плазматическая мембрана образует замкнутый отсек (компаратмент), внутри которого находится цитоплазма; это обеспечивает изоляцию одной клетки от другой и обуславливает их индивидуальность. Плазматическая мембрана обладает селективной проницаемостью и является барьером, с помощью которого поддерживается различный состав вне- и внутриклеточной среды. Селективная проницаемость обеспечивается работой каналов и насосов, транспортирующих различные ионы и субстраты, и специфическими рецепторами, например рецепторами гормонов. Кроме того, с помощью плазматических мембран осуществляется обмен веществами между клеточным содержимым и окружающей средой путем экзо- и эндоцитоза; существуют также особые мембранные структуры — щелевые контакты, через которые соседние клетки обмениваются веществами.

Мембраны формируют также специализированные компартменты внутри клетки. Такие внутриклеточные мембраны образуют многочисленные морфологически различные структуры (органеллы) — митохондрии, эндоплазматический ретикулум, саркоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, секреторные гранулы, лизосомы и ядерные мембраны. В мембранах локализованы ферменты, функционирующие как интегральные элементы процесса возбуждения и ответа на него, а также ферменты, участвующие в преобразовании энергии в таких процессах, как фотосинтез и окислительное фосфорилирование.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Изменения в мембранных структурах могут сказываться на водном балансе и ионных потоках, а следовательно, на любых процессах, протекающих внутри клетки. Отсутствие какого-то мембранного компонента или его модификация приводят к различным заболеваниям. В качестве примеров можно указать на отсутствие в лизосомах кислой мальтазы, приводящее к нарушению запасаения гликогена типа II; дефицит переносчика иода, вызывающий появление врожденного зоба (см. рис. 46.2); нарушение эндоцитоза липопротеинов низкой плотности, приводящее к развитию гиперхолестеролемии и артериальной коронарной недостаточности. Очевидно, что нормальное функционирование клеток начинается с формирования нормальных мембран.

ПОДДЕРЖАНИЕ НОРМАЛЬНОГО СОСТАВА СРЕДЫ

Поддержание нормального состава среды внутри клетки и вокруг нее — это основа жизнедеятельности. Жизнь возникла в водной среде, следовательно, ферментативные реакции, клеточные, субклеточные и другие биологические процессы эволюционировали именно в этом окружении. Сейчас большинство млекопитающих обитают в газообразной среде. Как же поддерживается у них водный статус? Вода удерживается в организме благодаря мембранам, которые пронизывают водную среду и образуют компартменты.

Внутренние водные компартменты

Вода составляет около 56% мышечной массы тела человека и распределена между двумя большими компартментами.

А. Внутриклеточная жидкость: этот компартмент содержит две трети всей массы и создает условия, необходимые для 1) преобразования, хранения и использования энергии; 2) осуществления гомеостаза; 3) репликации; 4) выполнения специфических функций.

Б. Внеклеточная жидкость: этот компартмент содержит примерно одну треть всей воды, которая распределена между плазмой и интерстициальным пространством. Внеклеточная жидкость обеспечивает систему доставки. С ее помощью к клеткам поступают питательные вещества (например, глюкоза, жирные кислоты, аминокислоты), кислород, различные ионы и микроэлементы, а также многочисленные молекулы регуляторов (гормонов), координирующих работу пространственно разобщенных клеток. Внеклеточная жидкость удаляет CO_2 , отходы метаболизма и токсичные или обезвреженные вещества из непосредственного окружения клетки.

Состав клеток и внеклеточной жидкости

Как видно из табл. 42.1, ионный состав **внутриклеточной жидкости** сильно отличается от **состава внеклеточной среды**. Внутриклеточная среда богата ионами K^+ и Mg^{2+} , а основным анионом является фосфат, тогда как внеклеточная жидкость содержит в большом количестве ионы Na^+ и Ca^{2+} , а основным анионом является Cl^- . Отметим также, что концентрация глюкозы во внеклеточной жидкости выше, чем в клетке, а для белков наблюдается обратная ситуация. Чем обусловлено такое различие? Пола-

гают, что в первичном океане, где и возникла жизнь, была высока концентрация ионов K^+ и Mg^{2+} , а поэтому ферментативные реакции и другие биологические процессы эволюционировали таким образом, что оптимальной для них стала именно такая среда. Впоследствии состав первичного океана стал постепенно изменяться, в нем стали превалировать ионы Na^+ и Ca^{2+} , и клетки подверглись сильному давлению отбора. В этих условиях для формирования в них совершенно нового комплекса биохимических и физиологических процессов потребовались бы колоссальные изменения. Вместо этого между клеткой и средой образовался барьер — мембрана с встроенными в нее насосами, обеспечивающая постоянство внутренней микросреды.

СТРУКТУРА МЕМБРАН

Мембраны — это сложные структуры, состоящие из липидов, белков и углеводов. Различные мембраны внутри клеток и между ними имеют неодинаковый состав, характеризуемый отношением белки: липиды (рис. 42.1). Это неудивительно, если учесть, какие разнообразные функции выполняют мембраны. Мембраны являются асимметричными плоскими замкнутыми структурами, обладающими внешней и внутренней поверхностями. Эти плоские структуры образованы не с помощью ковалентных связей, и тем не менее они термодинамически стабильны и метаболически активны. В мембранах «заякорены» особые белковые молекулы, которые осуществляют функции, специфические для определенных оргanelл, клеток или организмов.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ

Большинство липидов в мембранах млекопитающих представлены фосфолипидами, гликофинголипидами и холестеролом.

Фосфолипиды

Фосфолипиды в составе мембран подразделяются на две основные группы. Наиболее распространены **фосфоглицериды**, состоящие из остатка глицерола, к которому присоединены эфирными связями две жирнокислотные молекулы и фосфорилированный спирт (рис. 42.2). Жирные кислоты обычно содержат четное число атомов углерода, в основном 14 или 16. Их углеродные цепочки не разветвлены и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Наиболее простым фосфоглицеридом является фосфатидная кислота — 1, 2-диацилглицерол-3-фосфат — ключевой интермедиат при образовании

¹⁾ Указанное соотношение анионов характерно в основном для клеток животных. — *Прим. перев.*

Таблица 42.1. Средние концентрации различных веществ снаружи и внутри клеток млекопитающих

Вещество	Внеклеточная жидкость	Внутриклеточная жидкость
Na^+	140 мМ	10 мМ
K^+	4 мМ	140 мМ
Ca^{2+} (свободный)	2,5 мМ	0,1 мкМ
Mg^{2+}	1,5 мМ	30 мМ
Cl^-	100 мМ	4 мМ
HCO_3^-	27 мМ	10 мМ
PO_4^{3-}	2 мМ	60 мМ
Глюкоза	5,5 мМ	0–1 мМ
Белок	2 г/дл	16 г/дл

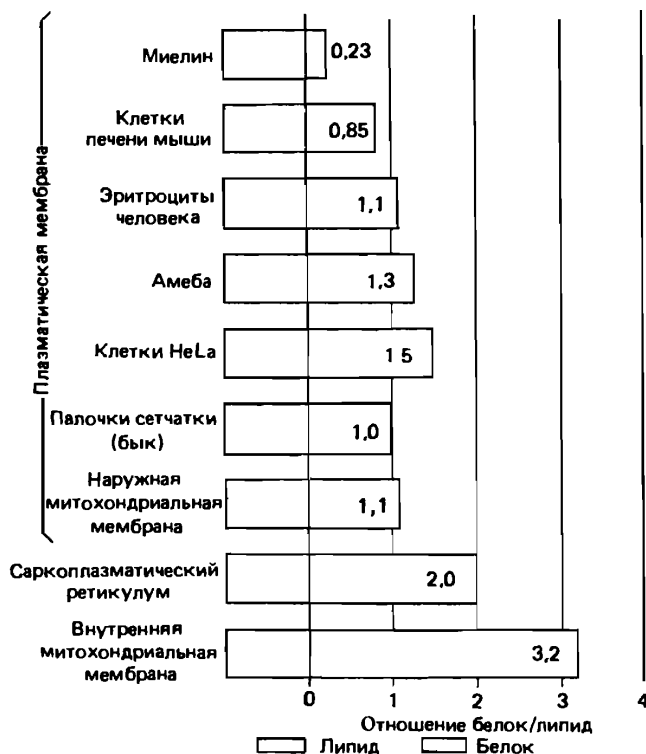


Рис. 42.1. Отношение белок/липид в разных мембранах. Количество белка равно или превышает количество липида почти во всех мембранах. Исключением из этого правила является лишь миелин — электрический изолятор, обнаруженный во многих нервных волокнах. (Из работы Singer S.J.: Architecture and topography of biologic membranes. Chapter 4 In: Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology, Weissman G., Claiborne R. [editors] HP Publising Co, 1975, с любезного разрешения.)

всех других фосфолипидов (см. гл. 25). В других фосфолипидах фосфат этерифицирован спиртовой группой таких соединений, как этаноламин, холин, серин, глицерол или инозитол.

Второй класс фосфолипидов представлен **сфингомиелинами**, содержащими остаток сфингозина вме-

сто глицерола. Жирная кислота присоединена к аминогруппе сфингозина амидной связью. Первичная гидроксильная группа сфингозина этерифицирована фосфорилхолином (см. с. 157). Сфингомиелины, как следует из их названия, входят в состав миелиновой оболочки.

Гликосфинголипиды

Гликосфинголипиды — это липиды, содержащие остатки сахаров. Сюда входят цереброзиды и ганглиозиды, а также производные сфингозина. **Цереброзиды и ганглиозиды** отличаются от сфингомиелина тем, какие группы присоединены к первичной гидроксильной группе сфингозина. В сфингомиелине к спиртовой группе присоединен фосфохолин, а цереброзид содержит в этом положении остаток гексозы, глюкозы или галактозы (см. с. 157). Ганглиозид содержит цепочку из трех и более сахаров, причем по крайней мере один из них — это сialовая кислота, связанная с первичной спиртовой группой сфингозина.

Стеролы

Наиболее распространенным стеролом в мембранах является **холестерол**, который содержится почти исключительно в плазматической мембране клеток млекопитающих, но в меньшем количестве может присутствовать также в митохондриях, мембранах аппарата Гольджи и ядерных мембранах. Содержание холестерина обычно увеличивается в направлении к наружной стороне плазматической мембраны. Холестерол встраивается между фосфолипидными молекулами, причем его гидроксильная группа контактирует с водной фазой, а остальная часть располагается внутри гидрофобного слоя. При температуре выше температуры фазового перехода (см. описание жидкостно-мозаичной модели) его жесткое стерольное кольцо взаимодействует с ацильными группами фосфолипидов, ограничивая их подвижность; это приводит к уменьшению текучести мембран. С другой стороны, при температурах, близких к температуре фазового перехода, взаимодействие холестерина с ацильными цепями препятствует их взаимному упорядочиванию. В результате снижается температура, при которой происходит переход жидкость — гель, а это помогает поддерживать текучесть мембраны при более низких температурах.

Амфифильная природа мембран

Все основные липиды мембран содержат как гидрофобные, так и гидрофильные области и поэтому называются **амфифильными** соединениями. Таким образом, мембраны тоже амфифильны. Если бы основу молекулы составляли гидрофобные группы, она была бы нерастворима в воде и растворима

Жирные кислоты

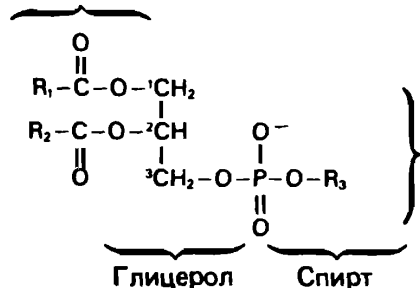


Рис. 42.2. Фосфоглицерид, состоящий из остатков жирных кислот (R_1 и R_2), глицерола и фосфорилированных спиртовых компонентов. В фосфатидной кислоте R_3 — это атом водорода.

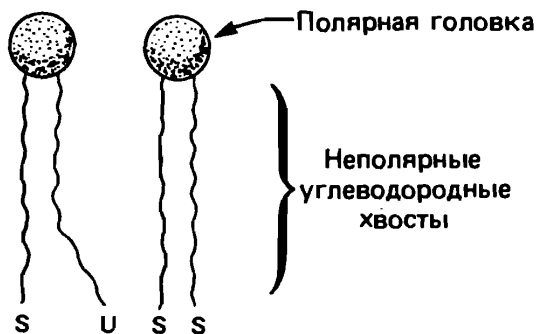


Рис. 42.3. Схематическое представление фосфолипида или другого мембранного липида. Полярная головка гидрофильна, а углеводородные хвосты гидрофобны или липофильны. Жирнокислотные хвосты могут быть насыщенными (S) или ненасыщенными (U); первые обычно присоединены к атому углерода 1 остатка глицерола, а последние — к атому углерода 2.

в маслах. Напротив, если бы основу молекулы составляли гидрофильные участки, то она была бы нерастворима в маслах и растворима в воде. Амфифильные мембранные липиды содержат полярную «головку» и неполярные «хвосты» (рис. 42.3).

Насыщенные жирнокислотные «хвосты» находятся в вытянутой конформации, а ненасыщенные, находящиеся в мембране в основном в *цис*-форме, могут иметь изломы. Чем больше таких изломов, тем менее плотна упаковка липидов в мембране и соответственно тем больше ее текучесть. Важную роль в биохимии и быту играют такие амфифильные соединения, как детергенты. Их структура не так уж далека от структуры липидов.

ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

Амфифильный характер фосфолипидов означает, что две области молекулы по своей растворимости противоположны, поэтому в водных растворителях фосфолипиды самоорганизуются в особую структуру, обеспечивающую термодинамическую стабильность обеих областей. Этой структурой является мицелла (рис. 42.4): ее гидрофобные области защищены от воды, а гидрофильные экспонированы в водную среду.

Липидный бислой

Примерно 60 лет назад Гортер и Грендел установили, что амфифильные молекулы образуют в водной среде термодинамически стабильный бимолекулярный слой (бислой). Бислой — это плоская структура, в которой гидрофобные области фосфолипидов недоступны для воды, а гидрофильные в нее погружены (рис. 42.5). В неблагоприятное водное окружение экспонирован только край (или края) би-

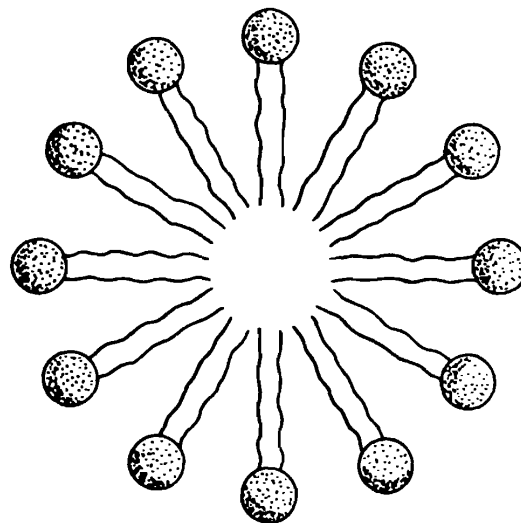


Рис. 42.4. Мицелла (поперечный разрез). Полярные головки выступают в воду, а гидрофобные углеводородные хвосты находятся в окружении других углеводородов и, таким образом, с водой не контактируют.

слоя, но даже этот край можно ликвидировать, если плоскость замкнуть на себя, чтобы образовалась замкнутая везикула. Замкнутый бислой обеспечивает одно из основных свойств мембраны: он непроницаем для большинства водорастворимых молекул, поскольку они не растворяются в его гидрофобной сердцевине.

Здесь сразу возникают два вопроса. Во-первых, многие ли биологически активные вещества жирорастворимы и, следовательно, легко проникают в клетку? Такие газы, как кислород, CO_2 и азот, с малым размером молекул и слабо взаимодействующие с растворителями, легко диффундируют через гидрофобную область мембраны. Молекулы липидной природы, например стероидные гормоны, тоже без труда проникают через бислой. Скорость диффузии органических незаряженных молекул пропорциональна их коэффициенту распределения между ма-

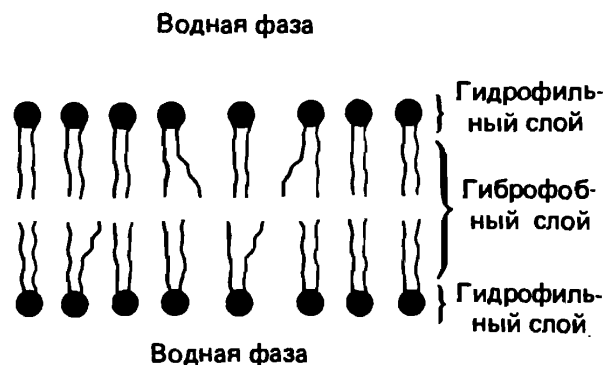


Рис. 42.5. Схематическое представление бислойной фосфолипидной мембраны. (Из книги Stryer L.: Biochemistry, 2nd ed. Freeman, 1981, с небольшими изменениями.)

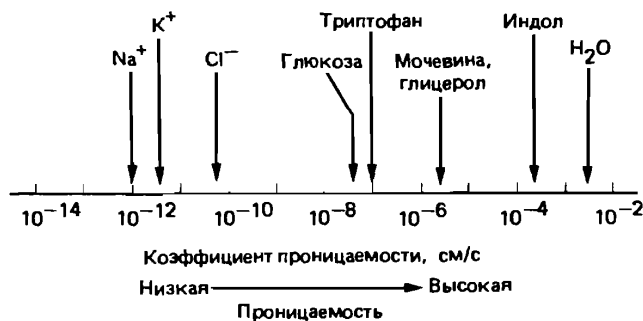


Рис. 42.6. Коэффициенты проницаемости для липидных бислоевых мембран воды, некоторых ионов и других малых молекул. (Из книги Stryer L.: Biochemistry, 2nd ed. Freeman, 1981, с небольшими изменениями.)

слом и водой (рис. 42.6); чем больше растворимость молекулы в липидах, тем больше скорость ее диффузии через мембрану.

Второй вопрос касается молекул, нерастворимых в жирах. Каким образом поддерживаются трансмембранные градиенты концентраций таких веществ? Объясняется это следующим: мембраны содержат белки, а белки также являются амфифильными молекулами и могут соответствующим образом встраиваться в бислой. Эти белки формируют каналы, по которым могут перемещаться ионы и малые молекулы, а также служат переносчиками для больших молекул, которые другим способом не могут пересечь бислой. Все эти процессы мы рассмотрим ниже.

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Белки, ассоциированные с бислоем

Мембранные фосфолипиды играют роль растворителя для мембранных белков, создавая микроокружение, в котором последние могут функционировать. Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, шесть являются в высшей степени гидрофобными из-за боковых групп, присоединенных к α -атому углерода, несколько аминокислот слабо гидрофобны, а остальные гидрофильны. Как мы видели в гл. 5, при образовании α -спирали гидрофобность самих пептидных групп минимизируется. Таким образом, белки могут образовывать единое целое с мембраной. Для этого нужно, чтобы их гидрофильные участки выступали из мембраны внутрь клетки и наружу, а гидрофобные пронизывали гидрофобную сердцевину бислоя. И в самом деле, те участки белковых молекул, которые погружены в мембрану, содержат большое количество гидрофобных аминокислот и характеризуются высоким содержанием α -спиралей или β -слоев.

Число разных белков в мембране варьирует от 6—8 в саркоплазматическом ретикулуме до более чем 100 в плазматической мембране. Это ферменты,

Таблица 42.2. Ферментные маркеры различных мембран¹⁾

Мембрана	Фермент
Плазматическая	5'-Нуклеотидаза Аденилатциклаза Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза
Аппарат Гольджи	Галактозилтрансфераза
Внутренняя митохондриальная мембрана	АТРсинтаза

¹⁾Мембраны содержат много белков; многие из них обладают ферментативной активностью. Некоторые ферменты локализованы в определенных мембранах и могут, таким образом, служить маркерами при очистке этих мембран.

транспортные белки, структурные белки, антигены (т.е. белки, определяющие гистосовместимость) и рецепторы для разных молекул. Поскольку каждая мембрана характеризуется своим набором белков, говорить о существовании некой типичной структуры мембран нельзя. В табл. 42.2 представлены ферментативные активности, присущие некоторым типам мембран.

Мембраны являются динамическими структурами. Мембранные белки и липиды постоянно обновляются. Скорости обновления разных липидов, как и разных белков, варьируют в широком диапазоне. Сами мембраны могут обновляться даже быстрее, чем любой их компонент. Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в разделе, посвященном эндоцитозу.

Асимметрия мембран

Асимметрия является важным свойством мембран и, по-видимому, отчасти связана с неравномерным распределением белков в мембране. Трансмембранная асимметрия может быть обусловлена и разной локализацией углеводов, связанных с мембранными белками. Кроме того, на внешней или внутренней стороне мембраны могут быть расположены какие-то специфические ферменты; это касается как митохондриальных, так и плазматических мембран.

Мембраны обладают также локальной асимметрией. В некоторых случаях (например, в щеточной каемке клеток слизистых оболочек) она проявляется почти на макроскопическом уровне. В других случаях (например, в области щелевых контактов, плотных контактов и синапсов, занимающих очень небольшую часть площади мембраны) области локальной асимметрии невелики.

Наблюдается также асимметрия в распределении фосфолипидов между наружной и внутренней сторонами мембран (поперечная асимметрия). Так, холин-содержащие фосфолипиды (фосфатидилхолин и сфингомиелин) располагаются в основном в наружном молекулярном слое, а аминофосфолипиды

(фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин)— преимущественно во внутреннем. Холестерол обычно содержится в наружном слое в больших количествах, чем во внутреннем. Очевидно, что если такая асимметрия в принципе существует, то поперечная подвижность (флип-флоп) мембранных фосфолипидов должна быть ограничена. И в самом деле, для фосфолипидов в синтетических бислоях характерна исключительно низкая скорость перескоков — время существования асимметрии может измеряться днями или неделями. Однако при искусственном включении в синтетические бислои некоторых мембранных белков, например эритроцитарного белка гликофорина, частота флип-флоп-переходов фосфолипидов может возрасти в сотню раз.

Механизмы асимметричного распределения липидов пока не установлены. Участвующие в синтезе фосфолипидов ферменты локализованы на цитоплазматической стороне мембран микросомных везикул. Таким образом, можно предположить, что существуют транслоказы, переносящие определенные фосфолипиды от внутреннего слоя к наружному. Кроме того, в обоих слоях могут присутствовать специфические белки, преимущественно связывающие те или иные фосфолипиды и приводящие к их асимметричному распределению.

Интегральные и периферические мембранные белки

Большинство мембранных белков являются интегральными компонентами мембран (они взаимодействуют с фосфолипидами); почти все достаточно полно изученные белки имеют протяженность, превышающую 5—10 нм, — величину, равную толщине бислоя. Эти интегральные белки обычно представляют собой глобулярные амфифильные структуры. Оба их конца гидрофильны, а участок, пересекающий сердцевину бислоя, гидрофобен. После установления структуры интегральных мембранных белков стало ясно, что некоторые из них (например, молекулы белков-переносчиков) могут пересекать бислой многократно, как это показано на рис. 42.7.

Интегральные белки распределены в бислой асимметрично (рис. 42.8). Если мембрану, содержащую асимметрично распределенные интегральные белки, растворить в детергенте, а затем детергент медленно удалить, то произойдет самоорганизация фосфолипидов и интегральных белков и сформируется мембранная структура, но белки в ней уже не будут специфическим образом ориентированы. Таким образом, асимметричная ориентация в мембране по крайней мере некоторых белков может задаваться при их включении в липидный бислой. Наружная гидрофильная часть амфифильного белка, которая, конечно, синтезируется внутри клетки, должна затем пересечь гидрофобный слой мембраны и в конечном итоге оказаться снаружи. Молекулярные механизмы

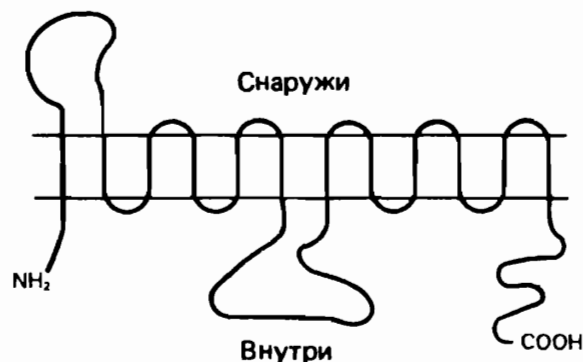


Рис. 42.7. Предполагаемая модель переносчика глюкозы у человека. Предполагается, что переносчик пересекает мембрану 12 раз. Пересекающие мембрану участки могут образовывать амфифильные α -спирали с амидной и гидроксильной боковыми группами и, по-видимому, связывают глюкозу или образуют канал для ее переноса. Амино- и карбоксильный концы цепи находятся на цитоплазматической поверхности. (Из работы Mueckler et al.: Sequence and structure of a human glucose transporter. Science, 1985. 229, 941, с любезного разрешения.)

организации мембран мы обсудим позже.

Периферические белки не взаимодействуют с фосфолипидами в бислой непосредственно; вместо этого они образуют слабые связи с гидрофильными участками специфических интегральных белков. Например, анкирин, периферический белок, связан с интегральным белком полосы III эритроцитарной мембраны. Спектрин, образующий скелет мембраны эритроцита, в свою очередь связан с анкирином и, таким образом, играет важную роль в поддержании двояковогнутой формы эритроцита. Молекулы иммуноглобулина являются интегральными белками плазматической мембраны и высвобождаются только вместе с небольшим фрагментом мембраны. Интегральными белками являются многие рецепторы различных гормонов, и специфические полипептидные гормоны, связывающиеся с этими рецепторами, можно, таким образом, считать периферическими белками. Такие периферические белки, как пептидные гормоны, могут даже детерминировать распределение в плоскости бислоя интегральных белков — их рецепторов (см. ниже).

ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ

Искусственные мембраны получают с помощью специально разработанных методик. Такие мембранные системы обычно состоят из одного фосфолипида (природного или синтетического) или их смеси. В соответствующих условиях (например, при мягкой обработке ультразвуком) эти фосфолипиды образуют сферические бислоиные везикулы. Везикулы, ограниченные липидным бислоем, называются **липосомами**.

Рассмотрим несколько примеров использования

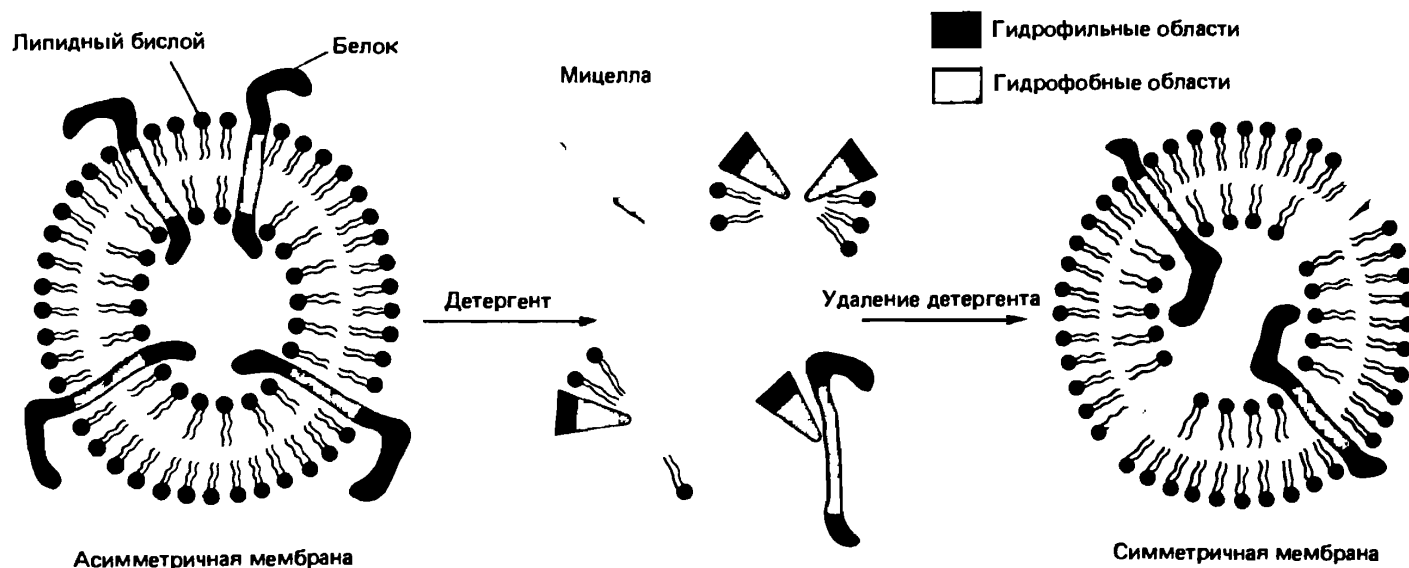


Рис. 42.8. При самосборке мембраны сохраняется ее принципиальная структура, но не асимметрия. Мембраны разрушаются при обработке их детергентами в высокой концентрации; амфифильные молекулы детергента образуют маленькие капельки, называемые мицеллами. Детергент растворяет компоненты мембраны, обволакивая гидрофобные участки липидов и белков и заключая их в мицеллы, где они защищены от воды. После удаления детергента липиды спонтанно образуют новый бислой с интегрированными в него белками. Однако последние включаются в основном в случайной ориентации. Эксперименты, подобные описанному здесь, показали, что все клеточные мембраны не способны к правильной самосборке; по крайней мере некоторые интегральные белки должны встраиваться в уже готовую мембрану, имеющую определенную ориентацию. (Из работы Lodish H. F., Rothman J. E.: *The assembly of cell membranes*. Sci. Am. [Jan] 1979, **240**, 43, с любезного разрешения.)

искусственных мембранных систем и укажем их преимущества перед природными мембранами.

1. Содержание разных липидов в искусственных мембранах можно варьировать; это позволяет проводить систематическое исследование влияния липидного состава мембран на ту или иную функцию. Например, можно получить везикулы исключительно из фосфатидилхолина или, наоборот, из смеси фосфолипидов известного состава с включением гликолипидов и холестерина. Можно строить мембраны из липидов с разными остатками жирных кислот. Это позволяет провести систематические исследования влияния жирнокислотного состава на определенные функции мембран (например, на транспорт).

2. В везикулы можно встраивать очищенные мембранные белки или ферменты. Это позволяет выявить, какие молекулы (например, специфические липиды или вспомогательные белки) необходимы для реконструкции функции очищенных белков. Исследования очищенных белков, например Ca^{2+} -АТРАЗы саркоплазматического ретикулума, показывают, что в некоторых случаях для реконструкции ионного насоса достаточно одного белка и одного липида.

3. Микроокружение искусственных систем можно жестко контролировать и целенаправленно варьировать (например, изменять концентрацию ионов). Их можно подвергать действию лигандов, специфичных к определенным белковым рецепторам, содержащимся в липосоме.

4. При формировании липосом ими могут захватываться те или иные компоненты, например лекарственные вещества или изолированные гены. Весьма перспективным представляется использование липосом для доставки лекарств к конкретным тканям. Для этого в мембраны липосом необходимо включить компоненты (например, антитела к определенным молекулам клеточной поверхности), позволяющие адресовать их конкретным тканям или опухолям. Терапевтический эффект такого способа доставки лекарства должен быть весьма значительным. ДНК, заключенная внутри липосом, по-видимому, менее чувствительна к нуклеазам; это следует учитывать при генной терапии.

ЖИДКОСТНО-МОЗАИЧНАЯ МОДЕЛЬ МЕМБРАН

Функционирующие мембраны представляют собой двумерный раствор глобулярных интегральных белков, диспергированных в жидком фосфолипидном матриксе. Жидкостно-мозаичная модель мембранной структуры была предложена в 1972 г. Сингером и Николсоном (рис. 42.9). Первые данные об адекватности этой модели были получены при искусственно индуцированном слиянии двух разных родительских клеток. Оказалось, что при образовании межвидовой гибридной клетки в плазматической мембране происходит быстрое стохастическое перераспределение видоспецифичных белков. Впослед-

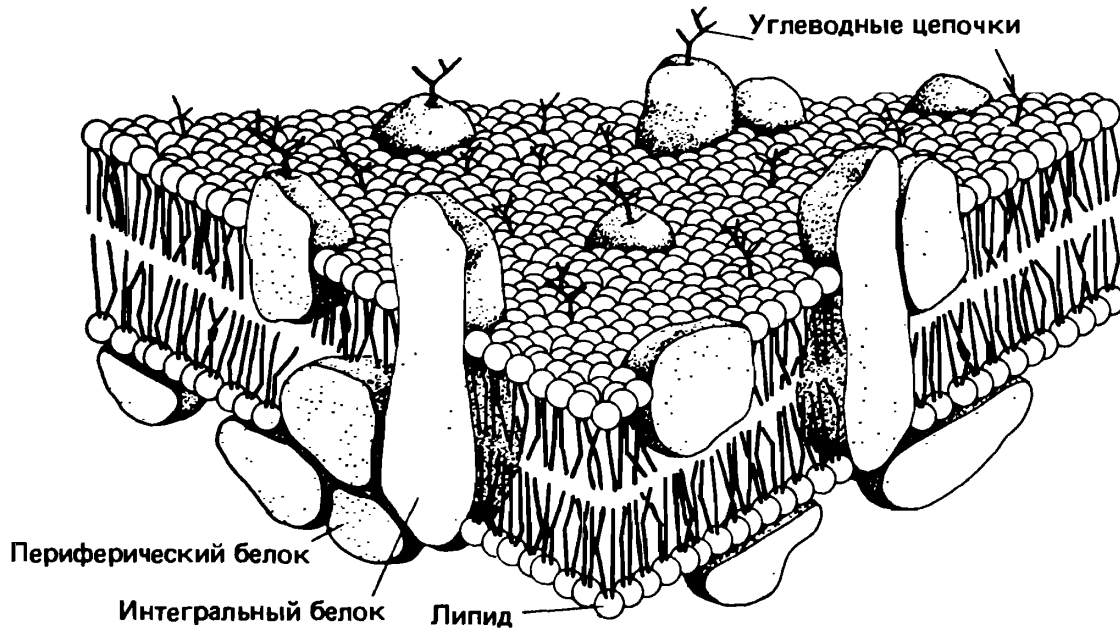


Рис. 42.9. Жидкостно-мозаичная модель мембранной структуры. Основой мембраны является липидный бислой; с ним связаны белки, либо погруженные в бислой, либо присоединенные к цитоплазматической поверхности. Интегральные мембранные белки жестко закреплены в липидном бислое. Некоторые из этих белков пронизывают бислой и называются трансмембранными, другие погружены либо в наружный, либо во внутренний слой. Белки, слабо связанные с внутренней поверхностью мембраны, называются периферическими. Многие белки и липиды несут олигосахаридные цепочки, выступающие во внешнюю среду. (Из работы Junqueira L. C., Carneiro J., Long J. A.: Basic Histology, 5th ed. Appleton and Lange, 1986, с любезного разрешения.)

ствии было показано, что фосфолипиды тоже способны быстро перераспределяться в плоскости мембраны. Такая диффузия в плоскости мембраны, называемая **латеральной**, может осуществляться довольно быстро: одна молекула фосфолипида перемещается за 1 с на расстояние несколько микрометров.

Фазовые переходы и, следовательно, текучесть мембран сильно зависят от липидного состава мембран. В липидном бислое гидрофобные цепочки жирных кислот ориентированы практически параллельно друг другу, в результате чего образуется достаточно жесткая структура. При повышении температуры гидрофобный слой переходит из упорядоченного состояния в неупорядоченное, и образуется более жидкая, текучая система. Температура, при которой вся структура претерпевает переход из упорядоченного состояния в беспорядочное, называется температурой перехода. Более длинные и более насыщенные жирнокислотные цепи обладают более высокой температурой перехода, т.е. для повышения текучести образованной ими структуры необходима более высокая температура. Наличие ненасыщенных связей в *цис*-конфигурации приводит к повышению текучести бислоя из-за снижения компактности упаковки цепей без изменения гидрофобности (рис. 42.3). Фосфолипиды клеточных мембран обычно содержат по крайней мере одну ненасыщенную жирную кислоту, имеющую по крайней мере одну двойную связь в *цис*-положении.

Холестерол играет роль молекулярного модификатора мембран, включение которого приводит к образованию состояний с промежуточной текучестью. Если ацильные боковые цепи находятся в неупорядоченном состоянии, то холестерол вызывает их конденсацию; если же они образуют какую-то кристаллоподобную структуру, то холестерол переводит ее в неупорядоченное состояние. При высоком отношении холестерол/липид фазовый переход вообще не происходит.

Текучесть мембраны сильно влияет на ее функционирование. При увеличении текучести мембрана становится более проницаемой для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков. Если активный центр интегрального белка, осуществляющий некую функцию, располагается исключительно в гидрофильной его части, то изменение текучести липидов, вероятно, не скажется слишком сильно на активности белка. Но если белок выполняет транспортную функцию и транспортный компонент пересекает мембрану, то изменения свойств липидной фазы могут привести к значительному изменению скорости транспорта. Превосходным примером является зависимость функционирования инсулинового рецептора от текучести мембран (гл. 51). Когда концентрация ненасыщенных жирных кислот в мембране растет (при культивировании клеток в среде, богатой этими соединениями), увеличивается теку-

часть, а это приводит к тому, что рецептор связывает больше инсулина.

Текучесть мембраны и соответственно латеральная подвижность могут быть неодинаковыми в разных ее участках. Например, в плоскости мембраны могут возникать белок-белковые взаимодействия, приводящие к образованию жесткого белкового матрикса в отличие от обычного липидного матрикса. Такие области белкового матрикса могут сосуществовать с обычным липидным матриксом в одних и тех же мембранах. Примерами такого тесного соседства различных матриксов являются области щелевых контактов, плотных контактов, а также бактериородопсинсодержащие фрагменты пурпурных мембран галобактерий.

Некоторые латеральные белок-белковые взаимодействия опосредуются периферическими белками; например, образуются сшивки через антитела и лектины и формируются так называемые кэп-структуры на поверхности мембраны. Таким образом, периферические белки, участвуя в специфических взаимодействиях, могут ограничивать подвижность интегральных белков внутри мембраны.

СБОРКА МЕМБРАН

Как мы уже говорили, ферменты, ответственные за синтез фосфолипидов, располагаются на цитоплазматической стороне везикул эндоплазматического ретикула. По мере синтеза фосфолипидов происходит их самосборка с образованием термодинамически стабильных бимолекулярных слоев, которые включаются в мембрану везикул. Липидные везикулы, происходящие от эндоплазматического ретикула, по-видимому, перемещаются к аппарату Гольджи, фрагменты которого в свою очередь сливаются с плазматической мембраной. Мембраны аппарата Гольджи и везикул эндоплазматического ретикула асимметричны в поперечном направлении как по фосфолипидам, так и по белкам, и эта асимметрия сохраняется до слияния с плазматической мембраной. Внутренняя поверхность везикулярных мембран оказывается с наружной стороны плазматической мембраны, а цитоплазматическая остается на ее цитоплазматической стороне (рис. 42.10). Поскольку поперечная асимметрия в мембранах везикул, происходящих из эндоплазматического ретикула, существует еще до слияния с плазматической мембраной, основной проблемой сборки мембран становится вопрос о том, каким образом интегральные белки асимметрично включаются в липидный бислой эндоплазматического ретикула.

Интегральные и секреторируемые белки сразу после их синтеза содержат гидрофобную лидерную последовательность длиной 15—30 аминокислот на N-конце. Внутренней гидрофобная лидерная последо-

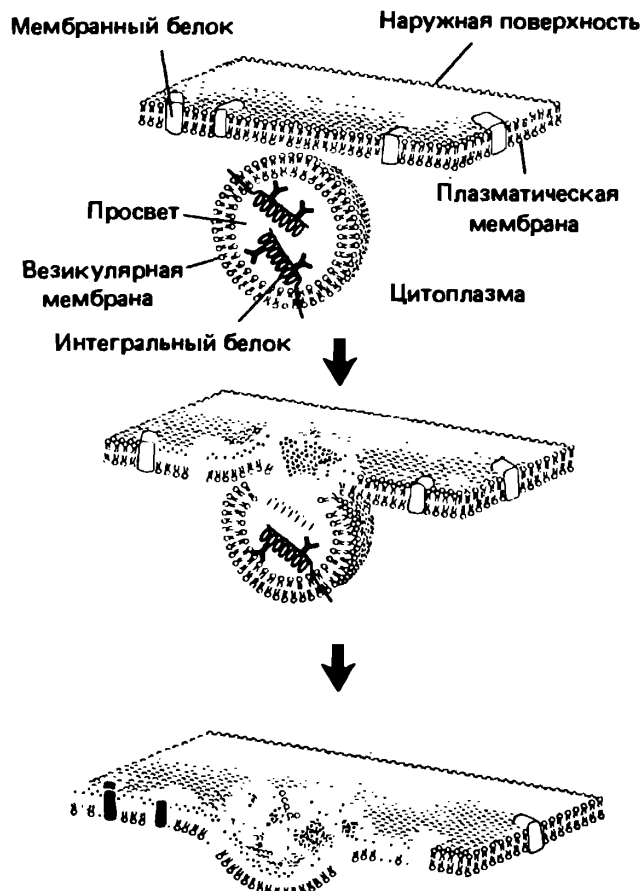


Рис. 42. 10. При слиянии везикул с плазматической мембраной сохраняется ориентация всех интегральных белков, включенных в бислой везикулы. Исходно N-конец белка смотрит внутрь везикулы. После слияния N-конец оказывается на наружной поверхности плазматической мембраны. Неизменность ориентации белка становится еще более очевидной, если проследить за расположением другого конца молекулы — С-конца, который всегда обращен в цитоплазму. Внутренняя поверхность везикулы и наружная — клетки топологически эквивалентны. (Из работы Ladish H. F., Rothman J. E.: The assembly of cell membranes. Sci. Am. [Jan.] 1979, 240, 43, с изменениями.)

вательность бывает очень редко. N-концевая лидерная последовательность обычно отщепляется от белка при его встраивании в мембрану или сразу после него, при этом получается зрелый секреторируемый или интегральный белок.

Существуют убедительные данные о том, что лидерная последовательность участвует в процессе встраивания белка. Мутантные белки, содержащие модифицированную лидерную последовательность, в которой какая-либо гидрофобная аминокислота заменена на гидрофильную, не включаются в мембраны. В то же время немембранные белки с присоединенной к ним лидерной последовательностью (для этого используются методы генной инженерии) способны включаться в мембрану и даже секретироваться.

Сигнальная гипотеза

Белки встраиваются в мембрану разными способами (рис. 42.11); детали этого процесса во многих случаях еще не установлены. Для объяснения механизма встраивания предложены две модели: сигнальная гипотеза и мембранная триггерная гипотеза. В сигнальной гипотезе предполагается, что белок включается в мембрану параллельно его трансляции на мРНК в полирибосомах; это так называемое котрансляционное включение. Когда лидерная последовательность выходит из рибосомы, она выявляется некой **сигнал-распознающей частицей** (СРЧ), которая блокирует дальнейшую трансляцию на уровне примерно 70 аминокислот, 40 из которых остаются в большом рибосомном комплексе, а 30 экспонированы в среду (рис. 42.12). СРЧ содержит шесть белков, с ней ассоциирована 7S-РНК, близкородственная «А1и-семейству» последовательностей ДНК с большим числом повторов (см. гл. 38). Блокирование трансляции не снимается до тех пор, пока комплекс СРЧ-лидерная последовательность—рибосома не свяжется с так называемым «отстригающим» белком (рецептором для СРЧ) эндоплазматического ретикулула. В этот момент начинается котрансляционное встраивание белка в эндоплазматический ретикулум. В процессе элонгации оставшейся части белка он перемещается через липидный бислой, поскольку рибосома остается присоединенной к эндоплазматическому ретикулуму. Таким образом образуется шероховатый (усеянный рибосомами) эндоплазматический ретикулум. Рибосомы остаются прикрепленными к эндоплазматическому ретикулуму в течение всего времени синтеза мем-

бранного белка и освобождаются и диссоциируют на соответствующие субъединицы только после его завершения. Когда ранее синтезированная часть белка выходит в просвет эндоплазматического ретикулума, отщепляется лидерная последовательность и присоединяются углеводы.

Интегральные мембранные белки не пересекают мембрану целиком; по-видимому, этому препятствует гидрофильная якорная последовательность на С-конце. Секретируемые же белки проходят сквозь мембранный бислой полностью и высвобождаются в просвет эндоплазматического ретикулума. К моменту их поступления внутрь везикулы углеводные остатки уже оказываются связанными с ними. Впоследствии секретируемые белки обнаруживаются в просвете аппарата Гольджи, где происходит модификация их углеводных цепочек, а затем они перемещаются к специфическим внутриклеточным органеллам или клеточным мембранам либо секретируются. Некоторые белки пересекают одну мембрану, а затем заякориваются в другой, соседней мембране, например внутренней мембране митохондрий.

Мембранная триггерная гипотеза

В этой гипотезе особое значение придается роли лидерной последовательности в изменении третичной структуры самого белка. Согласно этой гипотезе, лидерная последовательность индуцирует такую упаковку обычно гидрофобного интегрального белка, что последний может оставаться солюбилизованным в водной среде цитоплазмы, где он синтезирован. Мембранный липидный бислой является как

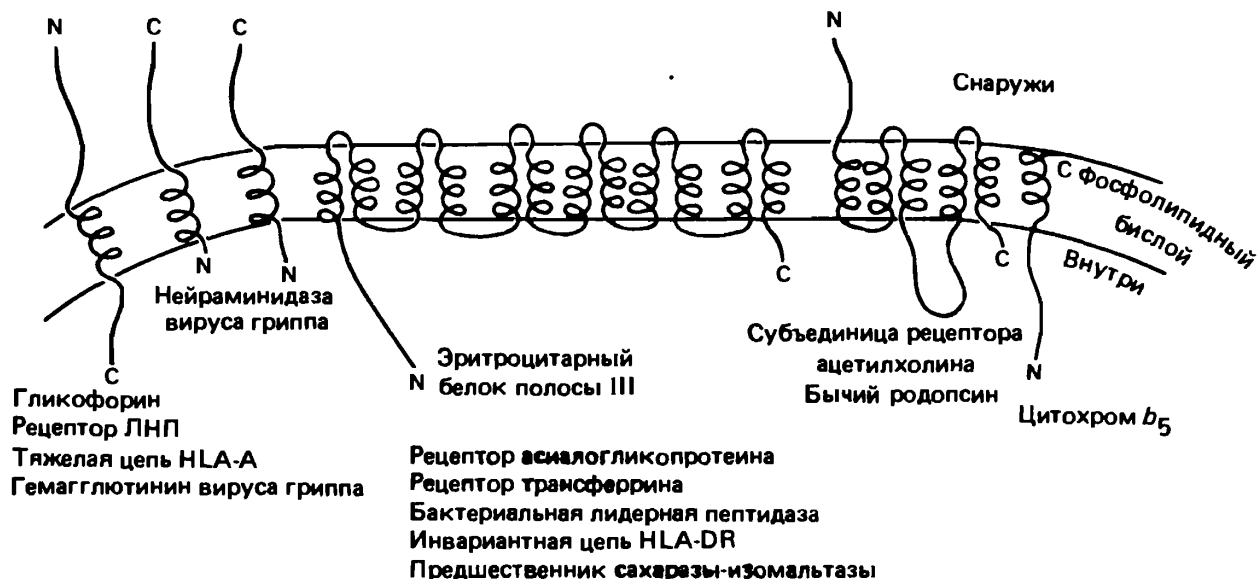


Рис. 42. 11. Различные способы включения белков в мембраны. Те участки белковой молекулы, которые находятся внутри мембраны, имеют форму α -спиралей, а остальные фрагменты линейны. N — NH_2 -конец; C — COOH -конец. (Из работы Wickner W. T., Lodish H. F.: Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. Science, 1985, 230, 400, с разрешения.)

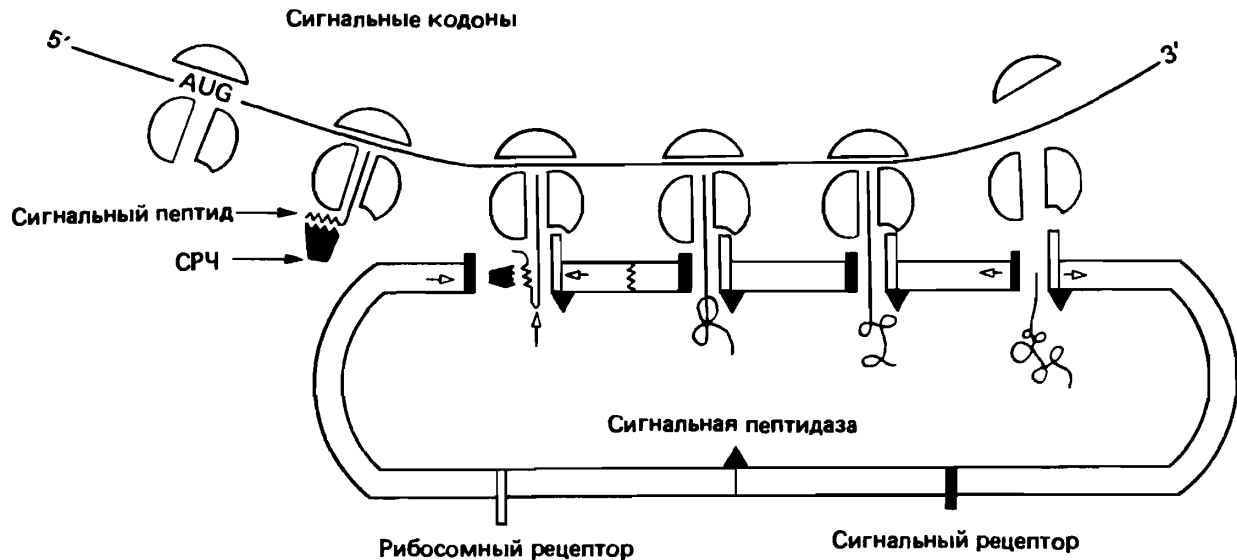


Рис. 42. 12. Транспорт секретируемых белков через мембрану эндоплазматического ретикулума согласно сигнальной гипотезе. Синтезирующие белок рибосомы движутся вдоль мРНК, детерминирующей аминокислотную последовательность белка (мРНК изображена в виде линии 5'—3'). Кодон AUG—начало синтеза белка; участок линии, который следует за AUG, соответствует кодам сигнальной последовательности. Когда конец белковой молекулы выходит из большой рибосомной субчастицы, сигнальная последовательность оказывается экспонированной в среду и связывается с сигнал-распознающей частицей (СРЧ). Дальнейшая транскрипция блокируется до тех пор, пока комплекс не свяжется с «отстригающим» белком (черный прямоугольник), расположенным на мембране эндоплазматического ретикулума. Для самой рибосомы на мембране также имеется рецептор (светлый прямоугольник). Взаимодействие рибосомы и растущей пептидной цепи с мембраной эндоплазматического ретикулума приводит к открыванию поры, через которую белок вводится во внутреннее пространство эндоплазматического ретикулума. В процессе транспорта сигнальная последовательность большинства белков отщепляется ферментом, называемым сигнальной пептидазой. Синтезированный белок высвобождается из рибосомы, которая распадается на большую и малую субчастицы, и, наконец, оказывается внутри эндоплазматического ретикулума (Из работы Newly made proteins rip through the cell, Science, 1980, 207, 154, с изменениями.)

бы триггером по отношению к третичной структуре белка— последний переходит в такую конформацию, которая обеспечивает его предпочтительное включение в бислой. Таким образом, белок претерпевает некий переход и сам встраивается в мембрану таким способом, чтобы установить необходимую поперечную асимметрию. Сразу после встраивания белка или его интеграции лидерная последовательность отщепляется. Триггерная гипотеза не предполагает специфического взаимодействия между рибосомой и мембраной, но это еще не означает, что синтез белка не может происходить на мембранах.

Основные особенности сигнальной и триггерной гипотез сопоставляются в табл. 42.3. Возможно, в одной и той же клетке действуют оба механизма. Некоторые аспекты мембранного биосинтеза остаются неясными, поскольку одни мембранные и секретируемые белки синтезируются на мембраносвязанных полисомах, тогда как другие—на свободных цитоплазматических полисомах. Сборка некоторых секретируемых или встраиваемых в мембрану белков не осуществляется до тех пор, пока эти белки не вступают во взаимодействие с мембранным бислоем на ранних этапах своего биосинтеза на рибосомах. Другие белки, например цитохром b_5 , встраиваются сами, сохраняя определенную ориентацию в мем-

бране после того, как их синтез завершен, но все же их внедрение в мембрану требует присутствия нормальной лидерной последовательности. Некоторые одноцепочечные пептиды или белки, такие, как бактериородопсин, пересекают мембрану несколько раз, и этот феномен трудно объяснить в рамках сигнальной гипотезы.

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАН

Если плазматическая мембрана относительно непроницаема, то как попадают в клетку большинство молекул? Чем обусловлена селективность их переноса? Ответы на эти вопросы очень существенны для прояснения способов адаптации клеток к постоянно меняющимся условиям внешней среды. У многоклеточных организмов должны иметься также средства коммуникации между соседними и отдаленными друг от друга клетками, что позволяло бы им координировать весь комплекс биологических процессов. Сигналы могут поступать к мембране и передаваться ею или же генерироваться в виде некой последовательности каких-то взаимодействий между

Таблица 42.3. Сравнение двух моделей сборки мембран¹⁾

	Сигнальная гипотеза	Мембранная триггерная гипотеза
Место инициации	Солюбилизированные полисомы	Солюбилизованные полисомы
Роль лидерного пептида	Распознавание белком транспортного канала	Изменение способа упаковки
Ассоциация нового белка с мембраной	По завершении синтеза лидерного пептида	Во время синтеза белка или после его завершения
	Место — белковый транспортный канал	Место — рецептор или липидная часть бислоя
Специфическая ассоциация рибосом	С белковым транспортным каналом	Не происходит
Катализ сборки	Некая специфическая пора	Изменение конформации, определяемое лидерным пептидом
Движущая сила сборки	Элонгация полипептидной цепи	Белок-белковые и белок-липидные взаимодействия: самосборка
Удаление лидерного пептида	При выходе полипептида	В процессе встраивания полипептида в бислой или после него
Окончательная ориентация	С-конец внутри, N-конец снаружи	Определяется первичной последовательностью

¹⁾Из работы Wickner W. The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. Annu. Rev. Biochem., 1979; 48, 23, с некоторыми изменениями, с любезного разрешения авторов.

мембранами. Некоторые механизмы реализации этих процессов перечислены в табл. 42.4.

ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

Молекулы могут пассивно пересекать бислой по электрохимическому градиенту путем простой или облегченной диффузии. Такому спонтанному переносу, приводящему к установлению равновесия, противостоит активный транспорт, который требует затрат энергии, поскольку он происходит против электрохимического градиента. Эти механизмы схематически представлены на рис. 42.13.

Пассивная диффузия

Как мы уже говорили, некоторые вещества, например газы, могут проникать в клетку за счет трансмембранной диффузии по электрохимическому градиенту; при этом никаких энергетических затрат не требуется. Скорость простой диффузии через мембрану растворенных веществ определяется тепловым движением перемещающихся молекул, трансмембранным концентрационным градиентом вещества и его растворимостью (коэффициентом проницаемости; рис. 42.6) в гидрофобном слое мембраны. Растворимость обратно пропорциональна числу водородных связей, которые должны быть разорваны, чтобы растворенное в водной среде вещество оказалось включенным в гидрофобный слой. Электролиты, слабо растворимые в липидах, не образуют с водой водородных связей, но они образуют водной оболочкой, образующейся в результате электростатических взаимодействий. Размер оболочки прямо пропорционален плотности заряда электролита. Электролиты с большей плотностью заряда обладают большей гидратной оболочкой и, таким образом, меньшей скоростью диффузии. Ионы Na^+ , например, характеризуются большей плотностью заряда, чем ионы K^+ . Следовательно, гидратированный Na^+ имеет больший размер, чем K^+ , и его скорость пассивной диффузии ниже.

В природных мембранах в отличие от синтетических бислойных мембран имеются **трансмембранные каналы** — сходные с порами структуры, состоящие из белков. Каналы, пропускающие катионы, имеют средний диаметр ~5—8 нм и выстланы отрицательно заряженными группами. Проводимость канала зависит от размера, степени гидратации и плотности заряда иона. Обнаружены специальные каналы для Na^+ , K^+ и Ca^{2+} .

В мембранах нервных клеток имеются хорошо изученные ионные каналы, ответственные за генера-

Таблица 42.4. Перенос вещества и информации через мембраны

Трансмембранное перемещение малых молекул

Диффузия (пассивная и облегченная)

Активный транспорт

Трансмембранное перемещение крупных молекул

Эндоцитоз

Экзоцитоз

Передача сигнала через мембраны

Рецепторы клеточной поверхности

1. Передача сигнала (например, глюкагон → cAMP)

2. Интернализация сигнала (сопряженная с эндоцитозом, например рецептор ЛНП)

Движение внеклеточных рецепторов (стероидные гормоны; некая разновидность диффузии)

Межклеточные контакты и коммуникации

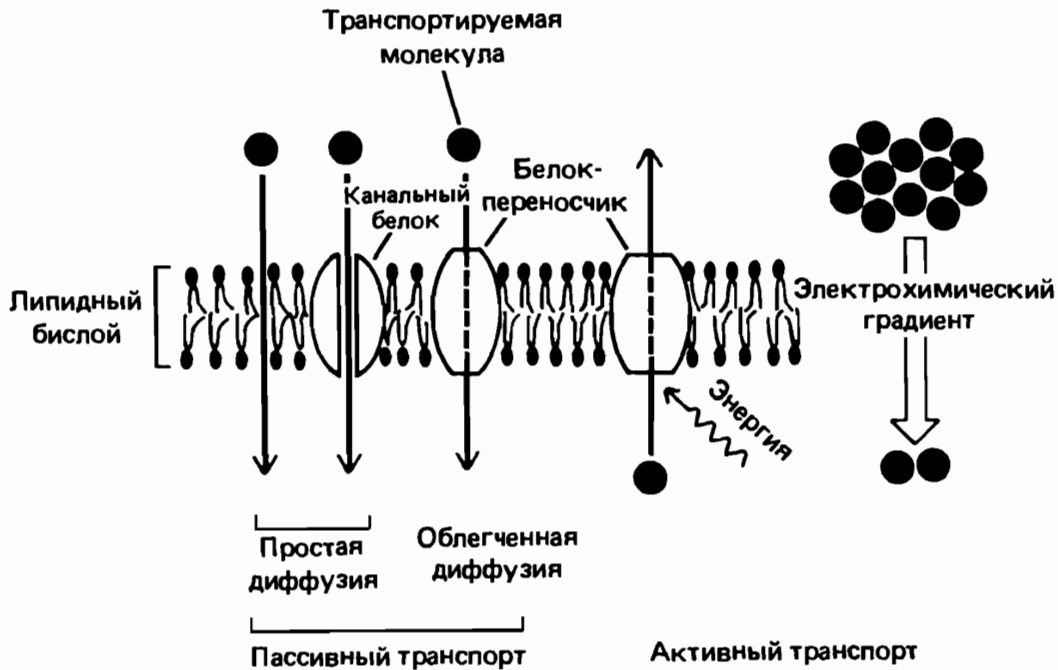


Рис. 42.13. Многие мелкие незаряженные молекулы свободно проходят через липидный бислой. Заряженные молекулы, крупные незаряженные молекулы и некоторые мелкие незаряженные молекулы проходят через мембраны по каналам или порам либо с помощью специфических белков-переносчиков. Пассивный транспорт всегда направлен по электрохимическому градиенту в сторону установления равновесия. Активный же транспорт осуществляется против электрохимического градиента и требует энергетических затрат. (Из работы Alberts B. et al.: *Molecular Biology of the cell*. Garland, 1983.)

цию и распространение потенциала действия вдоль мембраны. Активность некоторых из них контролируется нейромедиаторами, т. е. работа каналов может регулироваться. Кроме того, **один ион может регулировать активность канала, проницаемого для другого иона.** Так, при уменьшении концентрации Ca^{2+} во внеклеточной жидкости увеличивается мембранная проницаемость и диффузия Na^+ . В результате мембрана деполяризуется и генерируется нервный импульс. Именно этим объясняются оцепенелость, покалывание и судороги мышц при понижении уровня Ca^{2+} в плазме.

Каналы открываются только на определенное время, т. е. обладают воротным механизмом. В случае **воротного механизма, контролируемого лигандом**, некая специфическая молекула связывается с рецептором и открывает «ворота». Каналы с **потенциалзависимым воротным механизмом** открываются (или закрываются) в ответ на изменение мембранного потенциала.

Некоторые микроорганизмы синтезируют малые органические молекулы — **ионофоры**, которые осуществляют челночные перемещения ионов через мембраны. Эти ионофоры содержат гидрофильные центры, которые связывают определенные ионы. По периферии центры окружены гидрофобными областями, что позволяет молекуле легко растворяться в мембране и диффундировать через нее. Существуют и другие ионофоры, подобные хорошо изученному полипептиду грамицидину, которые обра-

зуют каналы. Некоторые микробные токсины (например, дифтерийный токсин) и компоненты активированного сывороточного комплемента способны образовывать крупные поры в клеточных мембранах, через которые могут проходить макромолекулы.

Суммируя сказанное, можно сказать, что диффузия веществ определяется следующими факторами: 1) трансмембранным концентрационным градиентом веществ. Растворенные вещества перемещаются в сторону понижения концентрации; 2) трансмембранной разностью электрических потенциалов. Растворенные вещества движутся в сторону раствора с противоположным зарядом; 3) коэффициентом проницаемости мембраны для данного вещества; 4) градиентом гидростатического давления на мембране. При повышении давления будет увеличиваться скорость столкновений молекул и мембраны; 5) температурой. Чем выше температура, тем больше скорость частиц и, следовательно, частота столкновений между частицами и мембраной.

Облегченная диффузия и активный транспорт

Транспортные системы можно описывать исходя из числа переносимых молекул и направления перемещения (рис. 42.14) или в соответствии с тем, как осуществляется перенос — в сторону установления

равновесия или против него. В системе **унипорта** происходит перенос молекулы одного типа в обоих направлениях. В системах **котранспорта** перенос одного растворенного вещества сопровождается переносом (одновременным или последовательным) стехиометрического количества другого. В случае **симпорта** оба вещества перемещаются в одном направлении. Примерами таких систем являются перенос H^+ /сахара и Na^+ /сахара (глюкоза, галактоза, ксилоза и арабиноза) в бактериях и Na^+ /аминокислот в клетках млекопитающих. В случае **антипорта** вещества переносятся в противоположных направлениях (например, Na^+ в клетку, а Ca^{2+} из клетки).

Молекулы, которые сами не могут пересекать липидный бислой, используют для этого белки-переносчики, с которыми они связываются. Такое перемещение может происходить двумя способами: путем облегченной диффузии или активного транспорта с помощью высокоспецифичных транспортных систем.

Облегченная диффузия и активный транспорт во многом сходны. Оба процесса, по-видимому, осуществляются при участии специальных белков-переносчиков и для обоих характерна специфичность к ионам, сахарам и аминокислотам. Об этом свидетельствуют результаты анализа тех последствий, к которым приводят мутации в бактериальных и животных клетках (включая некоторые мутации, вызывающие заболевания у человека). Облегченная диффузия и активный транспорт напоминают реакцию между ферментом и субстратом, однако они осуществляются без образования ковалентных связей. На это сходство указывают следующие моменты: 1) имеется специфический участок связывания для растворенного вещества; 2) процесс переноса характеризуется насыщением, т. е. существует некая максимальная скорость транспорта V_{max} (рис. 42.15); 3) процесс характеризуется определенной константой связывания, так что система в целом имеет свою K_M (рис. 42.15); 4) вещества, сходные по своей структуре с переносимым соединением, являются конкурентными ингибиторами и блокируют транспорт.

Основные различия между облегченной диффузией и активным транспортом состоят в следующем: 1) облегченная диффузия может осуществляться в обоих направлениях, тогда как активный транспорт — обычно лишь в одном; 2) активный транспорт всегда идет против электрического или химического градиента и требует энергетических затрат.

А. Облегченная диффузия. Некоторые вещества диффундируют через мембраны по электрохимическому градиенту быстрее, чем можно ожидать исходя из их размеров, заряда или коэффициента распределения. Эта облегченная диффузия отличается по своим свойствам от простой диффузии. Скорость облегченной диффузии, осуществляемой по унипор-

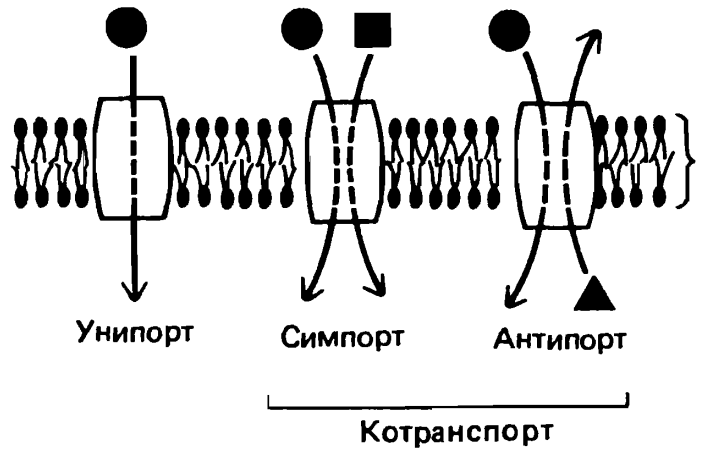


Рис. 42.14. Схематическое представление типов транспортных систем. Переносчики можно подразделить в соответствии с направлением перемещения вещества и степенью разнообразия переносимых молекул. (Из книги Alberts B. et al.: *Molecular Biology of the cell*, Garland, 1983.)

ному механизму, выходит на плато, т. е. число участков связывания данного вещества ограничено. Многие системы облегченной диффузии стереоспецифичны, но, как и в случае простой диффузии, перенос осуществляется без энергетических затрат.

Как мы уже говорили, асимметричное распределение мембранных белков между внутренней и внешней сторонами мембраны достаточно стабильно, спонтанное перемещение белков через мембрану происходит исключительно редко, а, следовательно, в основе облегченной диффузии, по-видимому, не может лежать трансмембранное перемещение белков-переносчиков; исключение составляют ионофоры, присутствующие в мембранах бактериальных клеток.

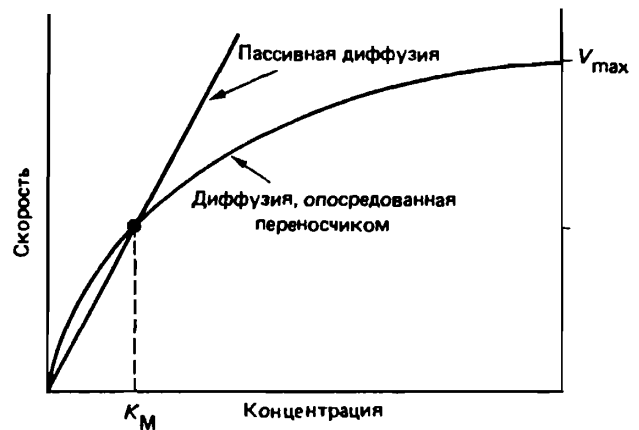


Рис. 42.15. Сравнение кинетик опосредованной переносчиком (облегченной) диффузии и простой диффузии. В последнем случае скорость перемещения вещества прямо пропорциональна его концентрации в растворе, тогда как при наличии переносчика наблюдается насыщение. V_{max} — максимальная скорость. Константа K_M равна такой концентрации вещества, при которой скорость составляет половину максимальной.

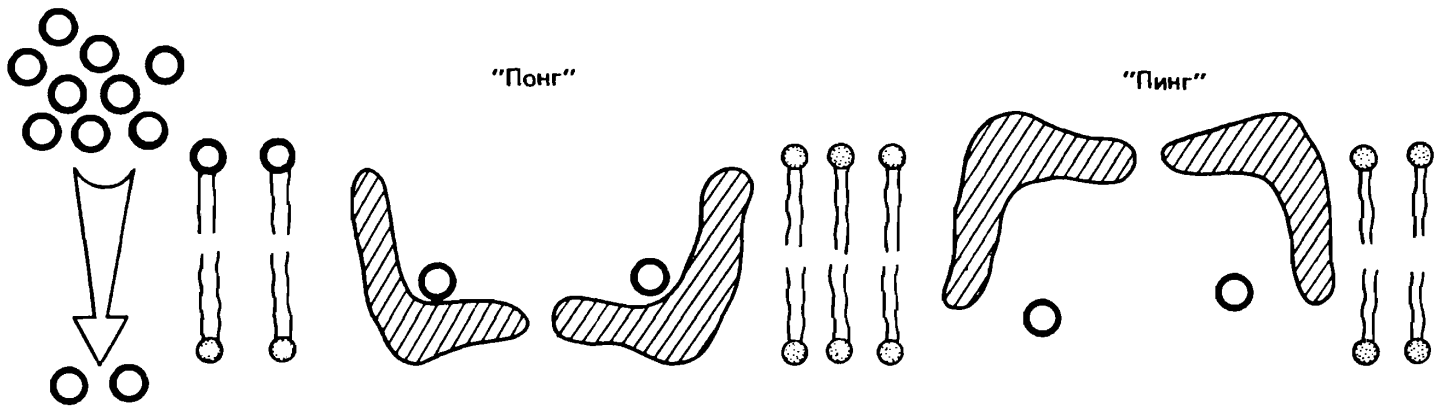


Рис. 42.16. Облегченная диффузия, механизм «пинг-понг». Белок-переносчик (заштрихован) связывает вещество, находящееся в растворе с высокой его концентрацией по одну сторону мембраны. Затем в переносчике происходят конформационные изменения («понг» → «пинг»), в результате которых это вещество высвобождается по другую сторону мембраны. Свободный переносчик возвращается в исходное состояние («пинг» → «понг»), и цикл завершается.

Процесс облегченной диффузии можно объяснить с помощью механизма «пинг-понг» (рис. 42.16). Согласно этой модели, белок-переносчик может находиться в двух основных конформациях. В состоянии «понг» он экспонирован в раствор с высокой концентрацией вещества, и молекулы последнего могут связываться со специфическими участками. В результате конформационных изменений в белке участки связывания вместе с переносимым веществом экспонируются в раствор с низкой его концентрацией (состояние «пинг»). Этот процесс полностью обратим, и суммарный поток вещества через мембрану определяется его концентрационным градиентом. Скорость, с которой растворенное вещество поступает в клетку, зависит от следующих факторов: 1) трансмембранного концентрационного градиента; 2) количества переносчика (ключ к регуляции); 3) быстроты связывания вещества с переносчиком; 4) быстроты конформационных изменений нагруженного и ненагруженного переносчика.

Гормоны регулируют облегченную диффузию, изменяя число доступных переносчиков. Инсулин повышает интенсивность транспорта глюкозы в жировых и мышечных тканях, индуцируя поступление новых переносчиков из некоего внутриклеточного пула (см. рис. 51.13). Он также повышает транспорт аминокислот в печень и другие ткани. Одним из множества скоординированных эффектов глюкокортикоидных гормонов является повышение транспорта аминокислот в печень, где они служат субстратом глюконеогенеза. Гормон роста усиливает транспорт аминокислот во все клетки, а эстрогены стимулируют этот процесс в матке. В животных клетках существуют по меньшей мере пять разных систем переносчиков аминокислот. Каждая из них специфична к определенной группе близкородственных аминокислот и может функционировать как система симпорта с Na^+ (рис. 42.13).

Б. Активный транспорт. Процесс активного транспорта отличается от диффузии тем, что он сопровождается смещением состояния системы от термодинамического равновесия и, следовательно, требует энергетических затрат. Источником энергии могут быть гидролиз АТФ, процесс переноса электронов или свет. Поддержание электрохимических градиентов играет столь большую роль в биологических системах, что на него затрачивается около 30—40% всей потребляемой клеткой энергии.

В основном в клетках поддерживается низкая внутриклеточная концентрация Na^+ и высокая K^+ (табл. 42.1) и вместе с тем — суммарный отрицательный электрический потенциал. Насосом, который поддерживает эти градиенты, является АТРаза, активируемая ионами Na^+ и K^+ (рис. 42.17). Эта АТРаза — интегральный белок, для своей активно-

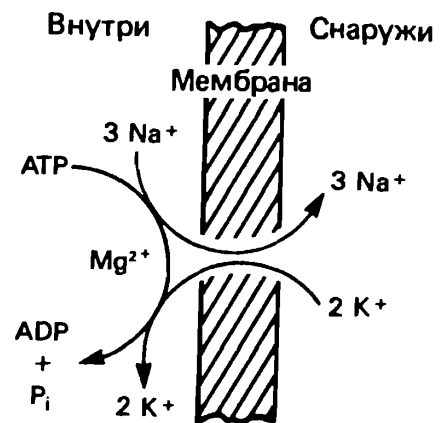


Рис. 42.17. Стехиометрия Na^+ , K^+ -насоса. Насос переносит три иона Na^+ из клетки и два иона K^+ в клетку на каждую молекулу АТФ, гидролизующую до АДФ мембраносвязанной АТРазой. Уабаин и другие сердечные гликозиды блокируют насос при введении их во внеклеточную среду. (С любезного разрешения R. Post.)

сти она требует фосфолипидов. Каталитические центры АТФазы для АТФ и Na^+ расположены на цитоплазматической стороне мембраны, а центр связывания K^+ — на наружной. Уабаин ингибирует активность АТФазы, связываясь с ее внеклеточным фрагментом. Это ингибирование может частично сниматься внеклеточным K^+ .

Распространение нервного импульса

На мембранах, ограничивающих нервные клетки, поддерживается разность электрических потенциалов (трансмембранная разность электрических потенциалов); эти мембраны электрически возбудимы. При химической стимуляции, опосредуемой специфическим синаптическим мембранным рецептором (см. разд. «Передача биохимических сигналов»), происходит срабатывание воротных механизмов, и в клетку быстро начинают поступать Na^+ и Ca^{2+} (при этом K^+ может и не выходить из клетки), напряжение на мембране резко падает, и соответствующий ее участок оказывается деполяризованным, но в результате работы ионных насосов электрохимический градиент быстро восстанавливается.

Когда таким образом деполяризуются большие участки мембраны, электрохимическое возмущение распространяется вдоль мембраны подобно волне, порождая нервный импульс. Миелиновые оболочки, образуемые шванновскими клетками, окутывают нервные волокна и служат электрическим изолятором. Этот изоляционный слой покрывает большинство нервных волокон и сильно ускоряет распространение электрической волны (сигнала); при этом ионы входят в клетку и выходят из нее только в тех местах, где изолятор отсутствует. Миелиновая мембрана состоит из фосфолипидов, в частности из сфингомиелина, холестерина, а также белков и гликофинголипидов. С ней ассоциированы лишь немногие интегральные и периферические белки, которые, по-видимому, удерживают вместе многочисленные мембранные бислои, образующие гидрофобную изолирующую структуру, непроницаемую для ионов и воды. Некоторые заболевания, например рассеянный склероз и синдром Гилл-Барре, характеризуются демиелинизацией и нарушением проведения нервного импульса.

Транспорт глюкозы

На примере транспорта глюкозы мы сможем суммировать ряд ключевых положений, приведенных в этой главе. Транспорт глюкозы в клетку — это первый этап утилизации энергии. Исключением из общего правила является печень, в которой такой специфический процесс обнаружен не был. В клетки печени глюкоза поступает путем простой диффузии по концентрационному градиенту, который всегда

чрезвычайно велик из-за быстрого превращения внутри клетки глюкозы в глюкозо-6-фосфат. В другие клетки (жировые и в еще большей степени мышечные) глюкоза поступает с помощью специфической транспортной системы, регуляция которой осуществляется инсулином (см. рис. 51.13). Изменения транспорта обусловлены в основном изменением V_{max} (преимущественно благодаря увеличению или уменьшению числа переносчиков), но могут быть связаны и с вариациями K_m . Структура переносчика глюкозы эритроцитов была определена по последовательности соответствующей кДНК (рис. 42.7). Трансформированные с помощью кДНК клетки синтезируют этот белок и встраивают его в мембрану в функционально активном состоянии; дальнейшие исследования с помощью направленного мутагенеза, возможно, помогут выяснить, как функционирует этот белок.

Рассматривая транспорт глюкозы, мы сталкиваемся с различными аспектами транспорта веществ, рассмотренными выше. Глюкоза и Na^+ связываются с разными участками переносчика глюкозы. При этом Na^+ поступает в клетку под действием электрохимического градиента и «тащит» глюкозу за собой (рис. 42.18). Таким образом, чем круче градиент Na^+ , тем больше поступает глюкозы, и, если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости уменьшается, транспорт глюкозы подавляется. Чтобы поддерживать необходимый для работы переносчика Na^+ /глюкозы градиент Na^+ , используется Na^+ , K^+ -насос, поддерживающий низкую внутри-

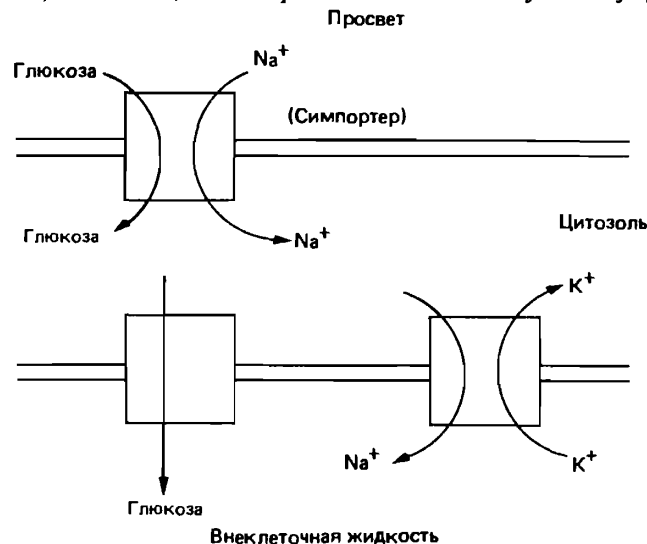


Рис. 42.18. Трансклеточное перемещение глюкозы через клетку кишечника. Через эпителиальную мембрану с люминальной стороны глюкоза проходит вслед за Na^+ . Градиент Na^+ , являющийся движущей силой этого симпорта, создается в процессе Na^+ , K^+ -обмена через базальную мембрану, обращенную к внеклеточной жидкости. Глюкоза, сконцентрированная в клетке, перемещается затем по градиенту во внеклеточную жидкость с помощью облегченной диффузии (по механизму унипорта)

клеточную концентрацию Na^+ . Аналогичные механизмы используются клетками для транспорта других сахаров, а также аминокислот.

Трансклеточное перемещение сахаров включает один дополнительный компонент — унипортер, с помощью которого глюкоза, поступившая в клетку через одну ее поверхность, может выходить через другую; такой процесс наблюдается в клетках почек и кишечника.

ТРАНСМЕМБРАННОЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ

Через плазматическую мембрану транспортируются также макромолекулы. Процесс, с помощью которого клетки захватывают крупные молекулы, называется **эндоцитозом**. Некоторые из этих молекул (например, полисахариды, белки и полинуклеотиды) служат источником питательных веществ. Эндоцитоз позволяет также регулировать содержание определенных мембранных компонентов, в частности рецепторов гормонов. Эндоцитоз можно использовать для более детального изучения клеточных функций. Клетки одного типа можно трансформировать с помощью ДНК другого типа и, таким образом, изменить характер их функционирования или фенотип. В таких экспериментах часто используют специфические гены, что предоставляет уникальную возможность изучать механизмы их регуляции. Трансформация клеток с помощью ДНК осуществляется путем эндоцитоза — именно таким способом ДНК по-

ступает в клетку. Трансформацию обычно проводят в присутствии фосфата кальция, поскольку Ca^{2+} стимулирует эндоцитоз и осаждение ДНК, что облегчает ее проникновение в клетку с помощью эндоцитоза. Из клетки макромолекулы выходят путем **экзоцитоза**. Как при эндоцитозе, так и при экзоцитозе образуются везикулы, сливающиеся с плазматической мембраной или отшнуровывающиеся от нее.

Эндоцитоз

У всех эукариотических клеток часть плазматической мембраны постоянно оказывается внутри цитоплазмы. Это происходит в результате инвагинации фрагмента плазматической мембраны, образования эндоцитозной везикулы, замыкания шейки везикулы и отшнуровывания ее в цитоплазму вместе с содержимым (рис. 42.19). Впоследствии везикулы могут сливаться с другими мембранными структурами и, таким образом, переносить свое содержимое в другие клеточные компартменты или даже обратно, во внеклеточное пространство. Большинство эндоцитозных везикул сливаются с **первичными лизосомами** и образуют вторичные лизосомы, которые содержат гидролитические ферменты и являются специализированными органеллами. Макромолекулы перевариваются в них до аминокислот, простых сахаров и нуклеотидов, которые диффундируют из везикул и утилизируются в цитоплазме. Для эндоцитоза необ-

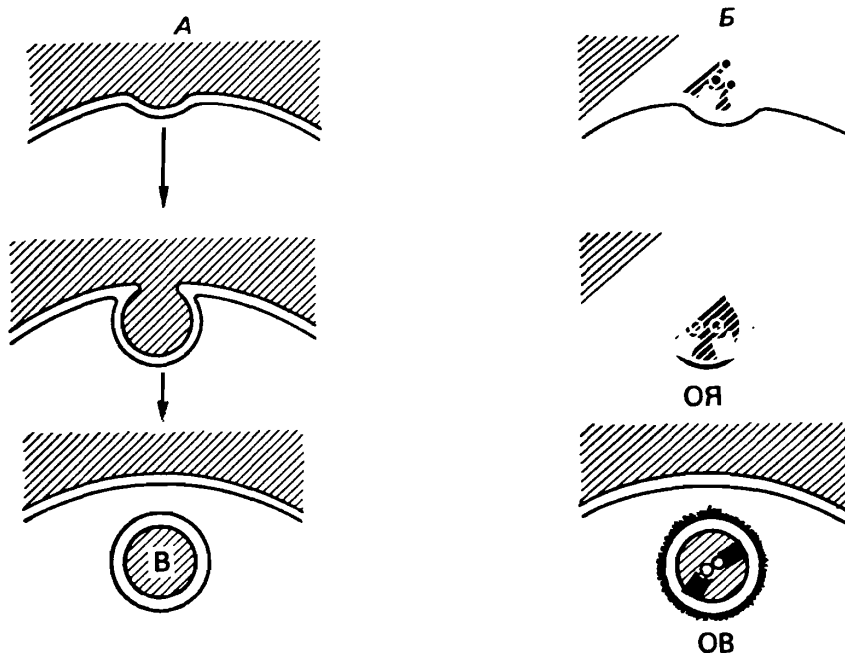


Рис. 42.19. Два типа эндоцитоза. Эндоцитозные везикулы (В) образуются в месте инвагинации плазматической мембраны. Жидкофазный пиноцитоз (А) — это случайный процесс, не имеющий определенной направленности. Опосредованный рецептором пиноцитоз (Б) селективен и осуществляется путем образования окаймленных ямок (ОЯ), выстланных белком клатрином (аморфное вещество), и окаймленных везикул (ОВ). Его специфичность обеспечивается рецепторами (черные прямоугольники), специфичными для разных молекул.

ходимы: 1) энергия, источником которой обычно служит АТФ; 2) внеклеточный Ca^{2+} ; 3) сократительные элементы в клетке (вероятно, системы микрофиламентов).

Эндоцитоз можно подразделить на два основных типа. **Фагоцитоз** осуществляется только с участием специализированных клеток, таких, как макрофаги и гранулоциты. При фагоцитозе происходит поглощение крупных частиц — вирусов, бактерий, клеток или их обломков. Макрофаги исключительно активны в этом отношении и могут включать в себя объем, составляющий 25% собственного объема, за 1 ч. При этом происходит интернализация 3% их плазматической мембраны каждую минуту, или целой мембраны каждые 30 минут.

Пиноцитоз присущ всем клеткам. С его помощью клетка поглощает жидкости и растворенные в ней компоненты. Этот процесс также можно подразделить на два типа. **Жидкофазный пиноцитоз** — это неизбирательный процесс, при котором количество растворенного вещества, поглощаемого в составе везикул, просто пропорционально его концентрации во внеклеточной жидкости. Такие везикулы образуются исключительно активно. Например, у фибробластов скорость интернализации плазматической мембраны составляет 1/3 скорости, характерной для макрофагов. В этом случае мембрана расходуется быстрее, чем синтезируется. В то же время площадь поверхности и объем клетки сильно не меняются, что указывает на восстановление мембраны за счет экзоцитоза или за счет повторного ее включения с той же скоростью, с какой она расходуется.

Другой тип пиноцитоза, **адсорбционный пиноцитоз**, представляет собой селективный процесс, опосредуемый медиатором. Он ответствен в основном за поглощение макромолекул, для которых на плазматической мембране существует ограниченное число связывающих участков. Эти рецепторы, обладающие высоким сродством, выборочно концентрируют лиганды из среды при минимуме поглощаемой жидкости и растворенных в ней несвязывающихся молекул и заметно увеличивают эффективность поступления специфических молекул в клетку. Везикулы, образующиеся при адсорбционном пиноцитозе, образуются в месте инвагинаций (ямки), покрытых с цитоплазматической стороны волокнистым материалом. Обычно таким материалом является **клатрин** (вероятно, периферический мембранный белок). **Окаймленные ямки** могут занимать до 2% поверхности некоторых клеток.

С помощью окаймленных ямок, в которых располагаются соответствующие рецепторы, интернализуются, например, липопroteины низкой плотности (ЛНП) и их рецепторы (см. гл. 26). Эндоцитозные везикулы, содержащие ЛНП и их рецепторы, сливаются в клетке с лизосомами. Рецепторы освобождаются и возвращаются на поверхность клеточ-

ной мембраны, а апопротеин ЛНП расщепляется и соответствующий эфир холестерина метаболизируется. Синтез рецепторов ЛНП регулируется вторичными или третичными продуктами пиноцитоза, т.е. веществами, образующимися при метаболизме ЛНП, например холестерином. Нарушения процессов образования рецептора ЛНП и его интернализации имеют большое биомедицинское значение (гл. 26).

С помощью адсорбционного пиноцитоза происходит поглощение и других макромолекул, в том числе некоторых гормонов. При этом образуются **рецептосомы** — везикулы, которые не сливаются с лизосомами и освобождают свое содержимое в другие внутриклеточные компартменты, например аппарат Гольджи.

Для осуществления адсорбционного пиноцитоза внеклеточных гликопротеинов необходимо, чтобы последние содержали специфический углеводный остаток, подлежащий распознаванию. Такие сигнальные остатки связываются с молекулами мембранного рецептора, который выполняет ту же функцию, что и рецептор ЛНП. На поверхности гепатоцитов находится галактозильный рецептор, с помощью которого осуществляется адсорбционный пиноцитоз сиалогликопротеинов. Кислая гидролаза, поглощаемая фибробластами посредством адсорбционного пиноцитоза, распознается благодаря маннозо-6-фосфатному остатку. Интересно, что этот остаток, по-видимому, играет важную роль в целевом перемещении гидролаз внутри клетки к лизосомам (см. гл. 54).

Опосредованный рецепторами эндоцитоз имеет свою теневую сторону, поскольку вирусы, вызывающие некоторые заболевания, например гепатит (повреждение клеток печени), полиомиелит (повреждение моторных нейронов) и СПИД (повреждение Т-клеток), атакуют клетки именно по этому механизму. Токсический эффект железа тоже начинает проявляться в результате его избыточного поглощения, обусловленного эндоцитозом.

Экзоцитоз

Большинство клеток высвобождают макромолекулы во внешнюю среду путем экзоцитоза. Этот процесс играет роль и в обновлении мембраны, когда ее компоненты, синтезированные в аппарате Гольджи, доставляются в составе везикул к плазматической мембране. Сигнал к началу эндоцитоза часто подается с помощью гормона, который, связываясь с рецептором на клеточной поверхности, индуцирует локальные и обратимые изменения концентрации Ca^{2+} , которые инициируют эндоцитоз. На рис. 4.20 схематически представлены процессы экзо- и эндоцитоза.

Вещества, высвобождаемые путем экзоцитоза,



Рис. 42.20. Сравнение механизмов эндоцитоза и экзоцитоза. При экзоцитозе происходит слияние двух внутренних находящихся со стороны цитоплазмы монослоев, тогда как при эндоцитозе сливаются внешние монослои.

можно разделить на три категории: 1) вещества, связывающиеся с клеточной поверхностью и становящиеся периферическими белками, например антигены; 2) вещества, включающиеся во внеклеточный матрикс, например коллаген и глюкозаминогликаны; 3) вещества, выходящие во внеклеточную среду и служащие сигнальными молекулами для других клеток. Инсулин, паратиреоидный гормон и катехоламины упаковываются в гранулы и созревают внутри клетки, а затем при соответствующей стимуляции высвобождаются наружу (гл. 47, 49 и 51).

ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ В КЛЕТКУ

Специфические соединения, играющие роль биохимических сигналов,—нейромедиаторы, гормоны и иммуноглобулины—связываются с особыми рецепторами (интегральными белками), экспонированными с наружной стороны клеточной мембраны, и передают информацию через нее в цитоплазму. Например, β -адренергический рецептор, который стереоспецифически связывает катехоламины, располагается на поверхности клеток-мишеней. Связывание с ним катехоламинов стимулирует активность аденилатциклазы, локализованной с внутренней стороны мембраны и катализирующей образование сАМР из АТР (гл. 44). Таким образом, информация, носителем которой во внеклеточной среде являлся специфический катехоламин, оказывается перенесенной внутрь, и ее последующую передачу осуществляет второй посредник, сАМР. Сопряженная с рецептором аденилатциклазная система, содержащая сти-

мулирующие и ингибирующие компоненты, опосредует ответ на многие гормоны; более подробно это описано в гл. 44.

В клетках млекопитающих недавно был обнаружен другой тип передачи сигнала. В этой сигнальной системе роль второго посредника играет **инозитолтрифосфат** (рис. 42.21); его внутриклеточная концентрация регулируется внеклеточными сигналами, опосредованными трансмембранным рецептором. На поверхности большинства клеток млекопитающих располагаются специфические рецепторы для целой группы белков—факторов роста, таких, как инсулин, эпидермальный фактор роста и фактор роста, происходящий из тромбоцитов. При связывании соответствующей молекулы эффектора с рецептором на цитоплазматической стороне мембраны стимулируется киназная активность, присущая интегральному компоненту трансмембранной молекулы рецептора. Под действием этой активности происходит фосфорилирование фосфатидилинозитола до фосфатидилинозитол-4-фосфата, а последнего до фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. Интересно, что некоторые онкогены, экспрессия которых может приводить к малигнизации клеток, также индуцируют киназную активность, приводящую к образованию таких полифосфатидилинозитидов (гл. 57).

Другие рецепторы клеточной поверхности, например рецепторы для ацетилхолина, антидиуретического гормона и катехоламинов типа α_1 , при связывании с соответствующими лигандами могут способствовать активации фосфолипазы C. Последняя катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата до инозитолтрифосфата и 1,2-

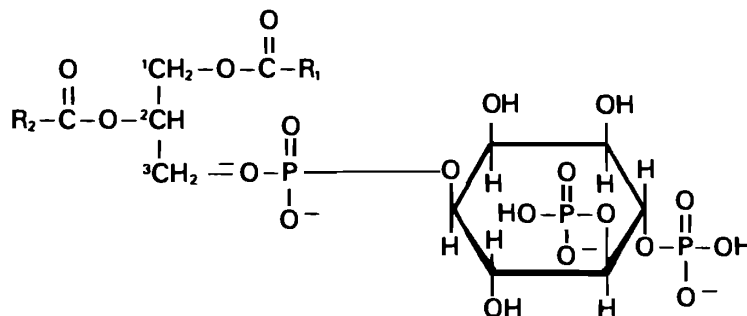


Рис. 42.21. Структура фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата.

диацилглицерола. Диацилглицерол способен активировать протеинкиназу С, активность которой зависит также от наличия в среде ионов Ca^{2+} . С другой стороны, инозитолтрифосфат приводит к эффективному высвобождению кальция из внутриклеточных депо, например саркоплазматического ретикулума и митохондрий. Таким образом, гидролиз инозитол-4, 5-бисфосфата приводит к активации протеинкиназы С и содействует увеличению концентрации ионов кальция в цитоплазме. Это активирует Na^+ , K^+ -насос, ведет к суммарной утечке протонов из клетки и соответственно к увеличению внутриклеточного рН. В результате происходит пролиферация клетки и возникают другие специфические ответы. В этой сигнальной системе третьими посредниками, по-видимому, являются кальций и 1, 2-диацилглицерол. Интересно, что на процессы, протекающие в этой сигнальной системе, влияют некоторые онкогены. Они опосредуют фосфатидилинозитолкиназную активность, что приводит к накоплению полифосфатидилинозитидов, которые в свою очередь служат предшественниками вторых и третьих посредников. По-видимому, будут обнаружены и другие сложные системы передачи информации в клетку. В гл. 44 обсуждается роль трансмембранных сигнальных систем в работе гормонов.

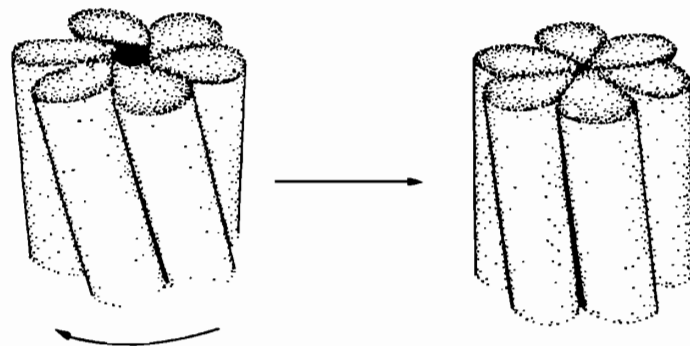


Рис. 42.22. Простая модель коннексона, иллюстрирующая переход из «открытой» конфигурации в «закрытую». Предполагается, что отверстие со стороны цитоплазмы (вверху) закрывается при скольжении субъединиц относительно друг друга; при этом уменьшаются их наклон и угол поворота относительно основания. Затемнены те области субъединицы, которые погружены в мембрану. Радиальное смещение каждой субъединицы на цитоплазматической стороне составляет 0,6 нм при изменении угла наклона на 5° при длине субъединицы 7,5 нм. (Из работы Unwin P. N.T., Zampighi G.: Structure of the junction between communicating cells, *Nature*, 1980, **283**, 545.)

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ И КОММУНИКАЦИИ

В многоклеточном организме существует множество межклеточных контактов. Образование таких контактов возможно лишь при непосредственном взаимодействии плазматических мембран отдельных клеток. Для межклеточных коммуникаций в клеточных мембранах формируются специализированные области. С помощью **щелевых контактов** регулируется перенос ионов и малых молекул через узкие гидрофильные поры, соединяющие цитоплазму соседних клеток. Эти поры формируются из субъединиц, и соответствующие структуры называются **коннексонами**; их структура была исследована с помощью рентгеновской кристаллографии. Согласно схеме, представленной на рис. 42.22, коннексоны состоят из шести белковых субъединиц, которые пронизывают мембрану и связаны с аналогичными структурами соседней клетки. Каждая субъединица, по-видимому, является достаточно жесткой структурой, но в ответ на специфические химические сигналы субъединицы меняют относительную ориентацию (ср. с поведением гемоглобина при окислении; рис. 6.12) таким образом, что образуется центральная пора диаметром около 2 нм. По-видимому, через это центральное отверстие ионы и малые молекулы переходят из одной клетки в другую, и этот процесс регулируем.

ЛИТЕРАТУРА

- Blobel G. et al.* Translocation of proteins across membranes: The signal hypothesis and beyond, Symp. Soc. Exp. Biol., 1979, **33**, 9.
- Dautry-Varsat A., Lodish H. F.* How receptors bring proteins and particles into cells, *Sci. Am.* (May), 1984, **250**, 52.
- Goldstein J. et al.* Receptor-mediated endocytosis, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1985, **1**, 1.
- Houslay M. D., Stanley K. K.* Dynamics of Biological Membranes, Wiley, 1982.
- Mueckler M. et al.* Sequence and structure of a human glucose transporter, *Science*, 1985, **229**, 941.
- Sabatini D. D. et al.* Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles, *J. Cell. Biol.*, 1982, **92**, 1.
- Singer S. J., Nicolson G. L.* The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 1972, **175**, 720.
- Stahl P., Schwartz A. L.* Receptor-mediated endocytosis, *J. Clin. Invest.*, 1986, **77**, 657.
- Stein W. D.* Transport and Diffusion Across Cell Membranes, Academic Press, 1986.
- Unwin V., Henderson R.* The structures of proteins in biological membranes, *Sci. Am.* (Feb.), 1984, **250**, 78.
- Vance D. E., Vance J. E. (eds.)* Biochemistry of Lipids and Membranes, Benjamin/Cummings, 1985.
- Walter P., Gilmore R., Blobel G.* Protein translocation across the endoplasmic reticulum, *Cell*, 1984, **38**, 5.
- Wickner W. T., Lodish H. F.* Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes, *Science*, 1985, **230**, 400.

Характеристика эндокринной системы

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Цель этой главы — показать разнообразие механизмов эндокринной системы и сформулировать некоторые основополагающие концепции, к которым мы обратимся в последующих главах.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Успехи в изучении эндокринной системы — например, ответ на вопрос, почему некоторые железы располагаются рядом друг с другом, выяснение того, как вырабатываются гормоны, разработка представлений о клетках-мишенях, рецепторах, регуляции по механизму обратной связи — имеют большое значение для медицины. В настоящее время удалось точно установить причины некоторых эндокринных заболеваний. В большинстве случаев — это дефект рецептора определенного гормона. В дальнейшем, несомненно, будут найдены и другие типы нарушений.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА

Характерная особенность многоклеточных — наличие дифференцированных тканей. Последние обладают специализированными функциями, обеспечивающими выживание организма.

Для координации тканевых ответов на изменения условий внешней и внутренней среды необходимы механизмы межклеточной коммуникации. В ходе эволюции сформировались две основные системы, выполняющие эту функцию: **нервная**, которую обычно рассматривают как систему проведения сигналов, обладающую жесткой структурой, и **эндокринная**, использующая в качестве мобильных посредников разнообразные гормоны, которые секретируются специфическими железами и затем транспортируются, воздействуя на прилежащие или удаленные ткани.

Сейчас уже ясно, что эти две регуляторные системы удивительным образом накладываются друг на

друга и перекрываются. Важную роль играет нервная регуляция эндокринной функции; например, постганглионарные клетки мозгового слоя надпочечников вырабатывают и секретируют адреналин, в гипоталамусе синтезируется вазопрессин, который транспортируется по аксонам в заднюю долю гипофиза и оттуда секретируется. Аналогично многие **нейромедиаторы** (катехоламины, дофамин, ацетилхолин и др.) сходны с гормонами по способу синтеза, высвобождения, транспорта и механизму действия. Так, катехоламины служат нейромедиаторами в одной ткани и гормонами в других. Другой пример взаимосвязи гормонов и нейромедиаторов: определенные метаболиты стероидных гормонов надпочечников, как было недавно показано, подобно барбитуратам, модулируют функцию рецепторов γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в головном мозге. Наконец, многие гормоны — инсулин, АКТГ, вазоактивный кишечный полипептид (ВКП), соматостатин, тиреотропин-рилизинг-гормон (ТРГ) и холецистокинин — обнаружены в головном мозге. Остается неясным, синтезируются ли эти соединения в самом мозге и функционируют ли они там в качестве нейромодуляторов или медиаторов. Поскольку в мозге обнаружены специфические рецепторы многих из этих гормонов, вполне вероятно, что они воздействуют на эту ткань.

Слово «гормон» образовано от греческого «побуждать к действию». Согласно классическому определению, гормон — это вещество, которое синтезируется в одной ткани, транспортируется кровью и воздействует на другой орган. Однако это исходное определение слишком узко; установлено, что гормоны способны воздействовать на прилежащие клетки данной ткани (**паракринный эффект**), а также на клетки, в которых они синтезируются (**аутокринный эффект**).

РАЗНООБРАЗИЕ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

Одно из самых замечательных свойств эндокринной системы состоит в том, что она предоставляет

организму множество вариантов решения возникающих проблем. В этом разделе мы очень коротко обсудим отдельные примеры, иллюстрирующие это разнообразие.

Тканевое происхождение и локализация эндокринных желез

Большинство эндокринных желез развивается из эпителиальных клеток. Важные исключения из этого правила — тестостерон-продуцирующие клетки Лейдига в семенниках и эстроген-продуцирующие клетки гранулы яичников, имеющие соединительно-тканное происхождение, а также секреторные клетки нейрогипофиза (дифференцирующиеся из клеток нервной ткани). Предполагается, что в эмбриогенезе некоторые типы эндокринных клеток возникли из **нервного гребня** (ганглионарной пластинки). Если это так, то становится понятной связь между нервной и эндокринной системами. Ткань нервного гребня может оказаться в любом органе, вот почему некоторые гормоны синтезируются в головном мозге и тканях, образовавшихся из передней и средней кишки. Кроме того, это объясняет **синдромы эктопической продукции гормонов**, т. е. продукцию гормонов «не той» тканью, например выработку паратиреоидного гормона (ПТГ) и АКТГ злокачественными клетками в случаях рака легкого. Эти синдромы охватывают обычно довольно ограниченное число пептидных гормонов, но большое разнообразие тканей. Считается, что они обусловлены активацией «молчащих» генов в той или иной клетке, однако, возможно, что дело в активации «молчащих» клеток, имеющих в ткани и эмбриологически родственных клеткам эндокринной железы. Другой любопытный пример — это **синдромы множественной эндокринной неоплазии (МЭН)**, для которых характерно семейное накопление. Для этих синдромов характерна избыточная продукция пептидных гормонов либо катехоламинов, причем нередко в одной ткани вырабатывается несколько гормонов одного класса.

Распределение гормон-продуцирующих клеток не случайно: они присутствуют в разных тканях в силу тех или иных специфических причин. Локальное повышение концентрации отдельных гормонов (по сравнению с концентрацией в плазме крови) часто служит необходимым условием протекания специфических процессов. Например, для протекания сперматогенеза необходим более высокий, чем в плазме, уровень тестостерона; соответственно клетки Лейдига, секретирующие тестостерон, и семявыносящие каналы расположены рядом. Формирование желтого тела требует очень высокой концентрации эстрогенов, и соответственно оно окружено клетками гранулы. Основное действие инсулина

и глюкагона — регуляция продукции глюкозы печенью; соответственно существует тесная связь между островками поджелудочной железы и воротной циркуляцией печени. В мозговом слое надпочечников высокие концентрации кортизола обеспечивают индукцию фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы (фермента, определяющего скорость биосинтеза катехоламинов); в эту ткань кортизол попадает по сосудам воротной системы, идущим от коры надпочечников. Существует тесная анатомическая связь между гипоталамусом и передней долей гипофиза, благодаря чему крайне лабильные рилизинг-гормоны гипоталамуса быстро достигают своей мишени — гипофиза: они транспортируются кровью по еще одной специальной воротной системе. Наконец, совершенно уникальные анатомические отношения сложились между различными клетками панкреатических островков, благодаря которым клетки регулируют секреторную активность друг друга посредством изменения локальных градиентов концентраций соматостатина, панкреатического полипептида, глюкагона и инсулина.

Биосинтез и превращения гормонов

Как химическая природа активных гормонов, так и механизмы их биосинтеза и постсинтетических превращений очень разнообразны. Гормоны образуются из липидных предшественников в результате модификации аминокислоты тирозина либо путем белкового синтеза (простые и сложные пептиды и углевод-содержащие гликопротеины).

Некоторые гормоны синтезируются и секретируются сразу в своей конечной форме; примеры тому альдостерон, гидрокортизон, трийодтиронин (T_3), эстрадиол, катехоламины. Другие гормоны — перед секретацией или для приобретения полной биологической активности — должны подвергнуться внутри клетки модификации. Например, инсулин синтезируется в виде проинсулина — типичного **белка-предшественника**, а у паратиреоидного гормона (ПТГ; паратгормон) есть по крайней мере два пептида-предшественника, содержащие препоследовательности, отщепление которых необходимо для проявления полной биологической активности. Описание белков-предшественников, их синтеза и превращения в конечный продукт (внутриклеточный процессинг) содержится в гл. 42. Упомянем более сложный случай: про-опиомеланокортин (ПОМК) — пептид, состоящий из 285 аминокислотных остатков, продукт одного гена; при его расщеплении образуются АКТГ, β -липотропин, β -эндорфин, α -МСГ и β -МСГ, и не исключено, что предшественник ПОМК содержит последовательности, представляющие собой еще не идентифицированные пептидные гормоны. Процессинг моле-

кулы-предшественника имеет тканевую специфичность (см. гл. 45).

Вероятно, наиболее яркий пример несоразмерно большого предшественника — тиреоглобулин. Этот крупный белок (мол. масса 660 000) присутствует в просвете фолликулов щитовидной железы. Он содержит 5000 аминокислотных остатков, в том числе 120 остатков тирозина, из них только часть подвергается йодированию в ходе синтеза тиреоидных гормонов (см. гл. 46). В конечном итоге вся молекула тиреоглобулина подвергается расщеплению, чтобы высвободить лишь несколько молекул T_3 и тетрайодтиронина (T_4).

В периферических тканях некоторые гормоны превращаются в более активные соединения. Это может происходить в тканях-мишенях, например T_4 превращается в T_3 в печени и гипофизе, а тестостерон в дигидротестостерон — в андроген-чувствительных тканях. Периферическое превращение может иметь место и в тканях, не являющихся мишенями. Так, дигидроэпиандростерон синтезируется в надпочечниках, а превращается в андростендион в печени; этот последний превращается в тестостерон либо в эстрон или эстрадиол в клетках жировой ткани, печени и кожи. Возможно комбинированное превращение неактивного соединения в активный гормон в периферических тканях-мишенях и не-мишенях. Пример тому — превращение витамина D_3 (из кожи) в 25-гидроксикальциферол в печени с последующим образованием из него 1,25-дигидроксиголекальциферола в почках (гл. 47). Гормоны, секретлируемые различными тканями и проявляющие разную клеточную специфичность, могут обладать структурным сходством. Так, гликопротеиновые гормоны гипофиза и плаценты (ТСГ, ЛГ, ФСГ и ХГЧ) являются гетеродимерами, состоящими из α - и β -субъединиц, и их α -субъединицы идентичны.

КОНЦЕПЦИЯ ЖЕЛЕЗЫ-МИШЕНИ

В организме человека имеется около 200 типов дифференцированных клеток. Лишь немногие из них продуцируют гормоны, но все 75 триллионов клеток, содержащихся в организме человека, служат мишенями одного или нескольких из 50 известных гормонов. Мишенью гормона может быть одна ткань или же несколько тканей. В соответствии с классическим определением ткань-мишень — это такая ткань, в которой гормон вызывает специфическую биохимическую или физиологическую реакцию. Например, щитовидная железа — специфическая железа-мишень для ТСГ; под действием ТСГ увеличивается количество и размеры ацинарных клеток щитовидной железы, повышается скорость протекания всех этапов биосинтеза тиреоидных гормонов. В противоположность этому инсулин воздействует

на многие ткани: в мышцах он повышает потребление глюкозы и ее окисление, в жировой ткани — липогенез, в печени и лимфоцитах — транспорт аминокислот, в печени и мышцах — синтез белка и так далее. В последующем с описанием специфики клеточной поверхности и внутриклеточных рецепторов понятие «ткань-мишень» было распространено на все ткани, в которых данный гормон связывается со своим рецептором, независимо от того, выявлен или не выявлен классический биохимический или физиологический тканевой ответ на действие гормона (например, связывание инсулина с эндотелиальными клетками). Это определение тоже недостаточно, но оно полезно, поскольку подразумевает, что какие-то эффекты гормонов остаются неизвестными.

Общую реакцию ткани-мишени на действие гормона определяет целый ряд факторов. Прежде всего это локальная концентрация гормона вблизи ткани-мишени, зависящая от 1) скорости синтеза и секреции гормона; 2) анатомической близости ткани-мишени к источнику гормона; 3) констант ассоциации и диссоциации гормона со специфическим белком-переносчиком в плазме крови, если таковой существует; 4) скорости превращения неактивной или малоактивной формы гормона в активную; 5) скорости исчезновения (клиренса) гормона из крови в результате распада или выведения, осуществляемых в первую очередь печенью и почками. Собственно тканевой ответ определяется 1) относительной активностью и (или) степенью занятости специфических рецепторов гормона на плазматической мембране или внутри клетки в цитоплазме или ядре; 2) состоянием сенситизации — десенситизации клетки, зависящим от пострецепторных механизмов. Изменение любого из этих параметров может отразиться на действии гормона на данную ткань-мишень, и это необходимо учитывать при рассмотрении классических представлений о гормональной регуляции по механизму обратной связи.

КОНЦЕПЦИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО МЕХАНИЗМА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

В поддержании физиологического уровня гормонов в крови участвует целый ряд механизмов гомеостаза, обеспечивающих точный обмен сигналами между гормон-секретирующей железой и тканью-мишенью, причем нередко это осуществляется при посредничестве одной или нескольких других эндокринных желез. Наиболее часто встречается механизм регуляции, основанный на **отрицательной обратной связи**. В особенности это свойственно системе гипоталамус — гипофиз — железа-мишень, и один из примеров приведен на рис. 43.1. Как видно из рисунка, релизинг-гормон гипоталамуса (либерин) стимулирует синтез и высвобождение гормона

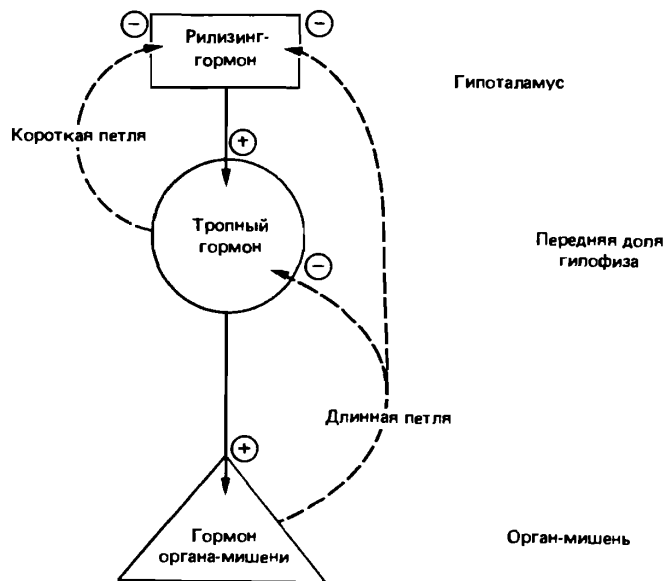


Рис. 43.1. Пример системы регуляции по типу отрицательной обратной связи. Такая система регулирует функцию щитовидной железы, надпочечников, яичников и семенников.

передней доли гипофиза; гипофизарный гормон в свою очередь стимулирует продукцию гормона органом-мишенью. При повышении концентрации этого последнего гормона происходит ингибирование всей системы путем торможения синтеза и соответственно действия гормона гипоталамуса; при снижении концентрации вся система активируется также на уровне гипоталамуса. Особенность именно этой системы состоит в том, что и гормон гипофиза может ее блокировать по **короткой петле обратной связи**, ингибируя свой собственный синтез. Такая тоническая система обеспечивает тончайшую регуляцию уровня гормона в плазме крови; из этого примера видно также, что уровень одного гормона определяется системой из нескольких гормонов и нескольких тканей-мишеней. Такие же петли обратной связи описаны в системах регуляции надпочечников, щитовидной железы, семенников и яичников.

В других случаях отрицательная обратная связь осуществляется с помощью отдельных метаболитов или субстратов, концентрация которых в плазме крови меняется при воздействии гормона на ткань-мишень. Например, увеличение концентрации глюкозы в крови (гипергликемия) вызывает измеряемое высвобождение инсулина, который усиливает потребление и утилизацию глюкозы в ряде тканей; в результате уровень глюкозы в крови возвращается к норме, что в свою очередь снижает секрецию инсулина. При некоторых патологических состояниях ответная секреция инсулина может быть избыточной и это приводит к гипогликемии. Физиологическим ответом на это угрожающее жизни состояние служит выброс катехоламинов, гормона роста, глюкагона, АКТГ, вазопрессина и ангиотензина II: все эти

гормоны повышают концентрацию глюкозы в плазме крови. Таким образом, природа создала целый комплекс факторов, регулирующих концентрацию метаболита (в данном случае глюкозы), критически необходимого для работы мозга. Регуляция уровня гормонов может осуществляться и по механизму **положительной обратной связи**. Так, эстрогены и прогестерон способствуют выбросу ЛГ, в результате чего происходит овуляция, формирование желтого тела и увеличение продукции этих стероидных гормонов. Во многих случаях петли таких обратных связей не описаны, как правило, потому, что не известны конечные продукты действия гормонов.

Различные **патофизиологические события** — шок, травма, гипогликемия, боль и стресс — оказывают влияние на систему гипоталамус — гипофиз, воздействуя через высшие нервные центры. В этих условиях происходят глубокие изменения метаболизма катехоламинов и гормона роста, функции коры надпочечников, щитовидной железы и гонад, но до сих пор остается неясным, какие именно компоненты вовлечены в цепи этих реакций.

При нарушении механизмов регуляции, обусловленных прерыванием «нормальных» обратных связей, возникают эндокринные и метаболические заболевания. Для диагностики используют тесты (например, тест с метирапоном), основанные на обратном прерывании этих связей и позволяющие дифференцировать норму и патологию.

РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ

Общая характеристика рецепторов

Одна из трудноразрешимых проблем, с которой встречались исследователи при описании системы коммуникации, основанной на использовании гормонов, представлена на рис. 43.2. Во внеклеточной жидкости гормоны присутствуют в очень низкой концентрации — обычно в пределах 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. Столь высокую степень избирательности обеспечивают особые принадлежащие клетке молекулы узнавания, называемые **рецепторами**. Биологический эффект гормонов начинается с их связывания со специфическими рецепторами, а завершается, как правило, диссоциацией гормона и рецептора (в соответствии с тем принципом, что надежная система контроля должна обладать средством прерывания действия агента).

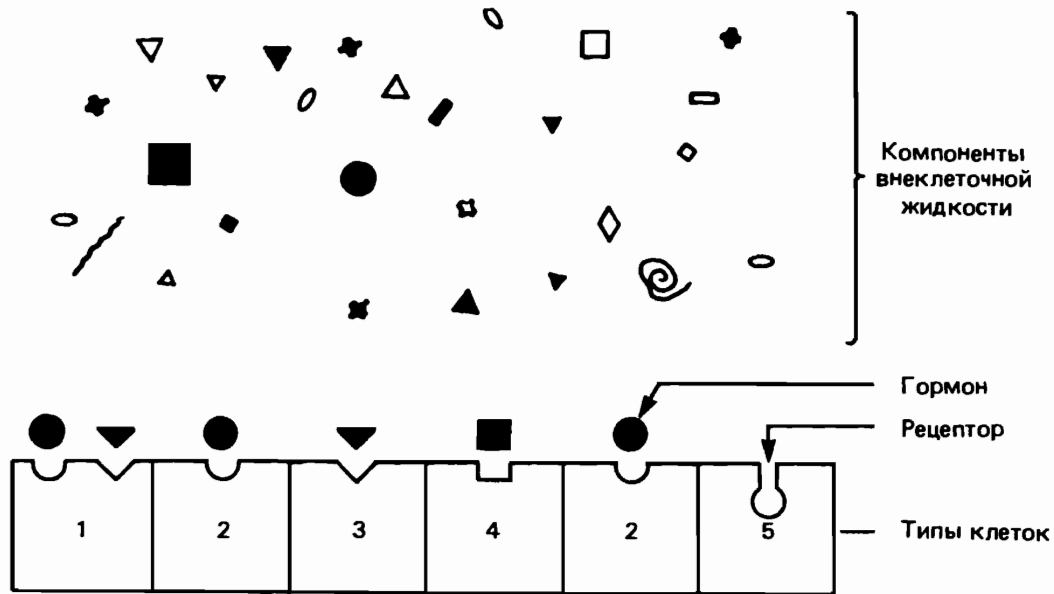


Рис. 43.2. Специфичность и избирательность рецепторов гормонов. Во внеклеточной жидкости содержится множество разнообразных соединений, но рецепторы узнают лишь очень немногие из них. Кроме того, рецепторы должны выбрать определенные молекулы из множества других, присутствующих в более высокой концентрации. На рисунке показано, что каждая клетка может нести либо один тип рецепторов, либо несколько.

Клетку-мишень определяют по способности избирательно связывать данный гормон с помощью такого рецептора, причем для количественной оценки взаимодействия используют радиоактивные лиганды, имитирующие связывание гормонов. Исследование проводится с соблюдением следующих правил: 1) введение радиоактивной метки не должно менять биологической активности лиганда; 2) связывание лиганда должно быть специфическим, т.е. добавление немеченого агониста или антагониста должно вытеснять метку; 3) связывание должно быть насыщаемо; 4) связывание должно происходить в тех же пределах концентраций, что и предполагаемый биологический ответ.

Домены узнавания и сопряжения на рецепторе

Все рецепторы, будь то рецепторы стероидов или полипептидов, имеют по крайней мере два функционально разных домена (участка): первый домен (домен узнавания) связывает гормон, а второй генерирует сигнал, который сопрягает узнавание гормона с определенным внутриклеточным процессом. Связывание гормона рецептором основано на том, что конформация какого-то участка молекулы гормона комплементарна участку молекулы рецептора. Степень сходства, или соответствия, определяет прочность связывания, измеряемую величиной константы сродства (K). Если у природного гормона относительная K равна 1, то у других природных соедине-

ний она колеблется от 0 до 1. Абсолютные же величины степени сродства (аффинности) могут различаться более чем в триллион раз. Для некоторых рецепторов были синтезированы лиганды с относительной $K > 1$; их используют в исследованиях биологии рецепторов.

Сопряжение (трансдукция сигнала) обеспечивается двумя основными механизмами. Полипептидные и белковые гормоны и катехоламины связываются с рецепторами, расположенными в плазматической мембране, и тем самым генерируют сигнал, который регулирует различные клеточные функции — обычно путем изменения активности ферментов. Стероидные и тиреоидные гормоны взаимодействуют с внутриклеточными рецепторами, и образовавшийся комплекс генерирует соответствующий сигнал (см. ниже).

У многих рецепторов полипептидных гормонов были идентифицированы аминокислотные последовательности этих двух доменов. Используя аналоги гормона, несущие замену той или иной специфической аминокислоты, можно изменить его связывание и биологическую активность. Рецепторы стероидных гормонов тоже обладают по крайней мере двумя функциональными доменами: один связывает гормон, другой связывается со специфической областью ДНК. В настоящее время для изучения этих рецепторов применяют метод рекомбинантных ДНК; как показывает структурный анализ, домены, связывающиеся с ДНК, в высокой степени гомологичны. В конечном итоге сущность рецептора определяется этой двойной функцией связывания и сопряжения, причем

именно сопряжение между связыванием гормона и передачей (трансдукцией) сигнала — так называемое **рецепторно-эффекторное сопряжение** — служит первым этапом усиления ответа на гормон. Указанная двойная функция рецептора клетки-мишени составляет основное отличие его от белков-переносчиков плазмы, которые связывают гормон, но не генерируют сигнал.

Сравнение рецепторных и транспортных белков

Существует принципиальная разница между связыванием гормонов с рецепторами и их ассоциацией с различными транспортными белками (переносчиками). Соответствующее сопоставление сделано в табл. 43.1. Количество молекул рецептора, участвующих в связывании лиганда, составляет несколько тысяч на клетку, а само связывание характеризуется высокой аффинностью и специфичностью. Рецепторы способны к узнаванию и селекции специфических соединений в условиях градиента концентраций 10^6 — 10^7 ; при физиологических концентрациях гормона это связывание с рецепторами насыщаемо. Гормон-рецепторное взаимодействие зависит от температуры, pH и концентраций солей характерным для каждого гормона образом. Связывание определяется **гидрофобным и электростатическим механизмами** и потому легко обратимо, за исключением некоторых особых случаев.

В кровотоке стероидные и тиреоидные гормоны находятся в виде комплекса со специфическими транспортными белками. Такие белки значительно преобладают по количеству над внутриклеточными рецепторными белками, но обладают меньшей аф-

финностью и меньшей специфичностью связывания гормонов. Транспортные белки создают резервуар гормонов в крови, поскольку в связанном виде последние не подвергаются метаболизму и экскреции. Биологическая активность присуща только несвязанному (свободному) гормону. Пептидные и белковые гормоны не имеют специальных транспортных белков в плазме крови, и поэтому полупериод их жизни в крови намного меньше (секунды или минуты), чем у стероидных гормонов (часы).

Взаимосвязь между степенью занятости рецепторов и биологическим эффектом

Во многих случаях концентрация гормона, при которой он занимает (оккупирует) рецепторы, практически совпадает с той, при которой он вызывает биологический ответ (рис. 43.3, А). Это справедливо в отношении всех стероидных гормонов и ряда пептидных. Сам по себе данный факт удивителен, особенно если учесть количество этапов, разделяющих процесс связывания гормона и комплексный ответ на него, например индукцию фермента, лизис клетки или транспорт аминокислот. Но в некоторых случаях имеет место выраженная диссоциация этих двух процессов; максимальный биологический ответ наступает в условиях, когда занято лишь несколько процентов от общего количества рецепторов (рис. 43.3, Б, эффект 2). Рецепторы, не участвующие в индукции биологического ответа, называют **резервными**.

Резервные рецепторы были выявлены при изучении ответа на некоторые полипептидные гормоны; полагают, что они служат как средством увеличения чувствительности клетки-мишени к низким концентрациям гормона, так и резервуаром рецепторов. Представление о резервных рецепторах относится к категории рабочих гипотез; оно может корректироваться в зависимости от того, какой аспект действия гормона и на какой ткани подвергается изучению. Например, на клетках гранулы получено прекрасное совпадение между связыванием гормона и синтезом сАМР (когда какие-либо гормоны активируют аденилатциклазу, резервных рецепторов, как правило, не обнаруживается); в то же время стероидогенез в этих клетках (сАМР-зависимый процесс) имеет место уже в условиях, когда занято менее 1% рецепторов (см. эффекты 1 и 2, рис. 43.3, Б). Для того чтобы в клетках печени произошла дерепрессия транскрипции гена фосфоенолпируваткиназы, достаточно, чтобы было занято существенно менее 1% рецепторов инсулина; с другой стороны, на тимоцитах обнаружена высокая степень корреляции между связыванием инсулина и транспортом аминокислот. Примерами диссоциации между уровнем связывания рецепторов и выраженностью биологического эффекта может служить влияние катехоламинов на

Таблица 43.1. Сопоставление гормональных рецепторов и белков, транспортирующих гормоны в плазме крови

Свойство	Рецепторы	Транспортные белки плазмы крови
Концентрация	Очень низкая (тысячи молекул/клетка)	Очень высокая (миллиарды молекул/мкл)
Аффинность связывания (сродство)	Очень высокая (10^{11} — 10^9 моль/л)	Низкая (10^{-7} — 10^{-5} моль/л)
Специфичность связывания	Высокая	Низкая
Насыщаемость при физиологических концентрациях гормона	Да	Нет
Обратимость связывания	Да	Да
Трансдукция сигнала	Да	Нет

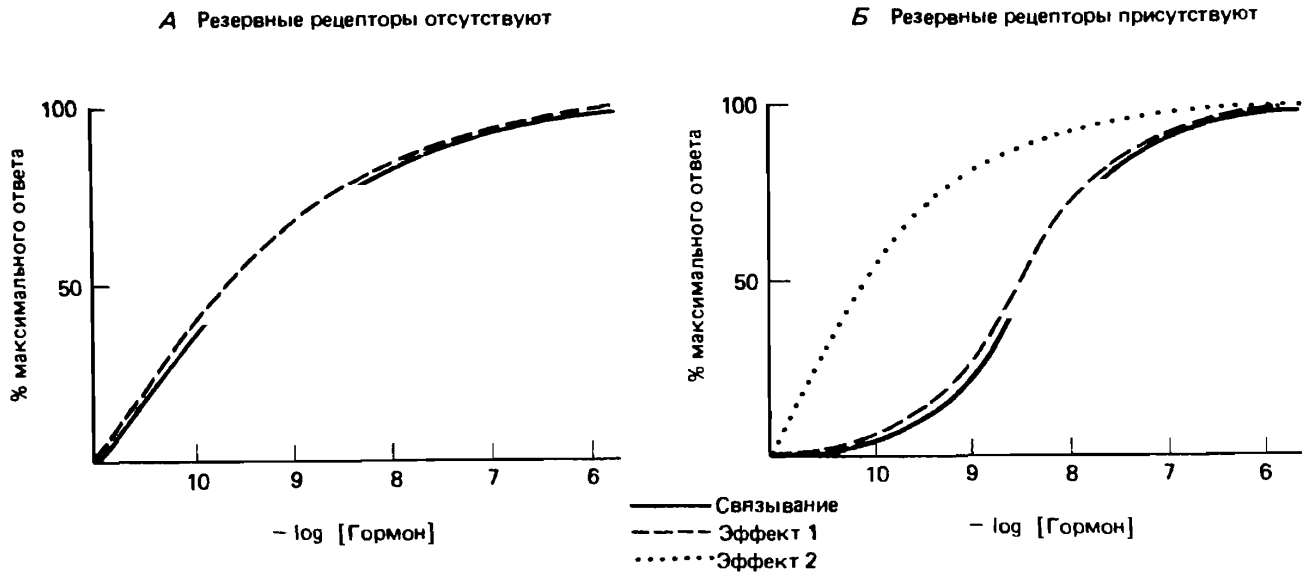


Рис. 43.3. Зависимость биологического эффекта от связывания гормона в условиях отсутствия (А) или наличия (Б, эффект 2) резервных рецепторов. В некоторых случаях биологический эффект может быть прочно сопряжен со связыванием гормона тканью, тогда как в отношении другого эффекта проявляется феномен резервных рецепторов (ср. эффекты 1 и 2 на рис. Б).

мышечное сокращение, липолиз и транспорт ионов. Предполагается, что эти конечные биологические реакции являются результатом каскадного усиления действия гормона. Обнаружено, что одна и та же клетка проявляет разную чувствительность к гормону в зависимости от того, о каком эффекте гормона идет речь. Так, в адипоцитах по мере нарастания занятости рецепторов инсулина происходит (последовательно) активация липолиза, окисления глюкозы, транспорта аминокислот и синтеза белка.

Регуляция рецепторов

Количество рецепторов в клетке или на ее поверхности находится в динамическом состоянии: оно регулируется физиологически и изменяется при заболеваниях или под влиянием терапевтических средств. Лучше изучены в этом отношении рецепторы, локализованные в плазматической мембране. Показано, что их концентрация и сродство к гормону (аффинность) являются регулируемыми параметрами. Изменение этих параметров происходит очень быстро и существенным образом сказывается на чувствительности клетки к гормону. Например, в клетках, подвергнутых воздействию β -адренергических агонистов, в течение некоторого времени (от нескольких минут до часов) в ответ на новое добавление агониста прекращается активация аденилатциклазы и исчезает биологический ответ. Такая **десенситизация** опосредуется двумя механизмами. Первый включает утрату рецепторов плазматической мембраной. Эта **понижающая регуляция** осуществляется путем секвестирования (связывания) рецепторов в клетке, т. е. отделения их от других компонентов системы клеточного ответа, в частности от

регуляторной и каталитической субъединиц аденилатциклазы (см. гл. 44). После удаления агониста рецепторы возвращаются на поверхность клетки и чувствительность к гормону восстанавливается. Вторым механизмом десенситизации β -адренергической системы — ковалентная модификация рецепторов путем фосфорилирования. Это сАМР-зависимый процесс, который не сопряжен с изменением числа рецепторов и их перемещением. Как показали опыты по реконструкции мембран (включение рецепторов в мембраны, предварительно лишенные рецепторов), фосфорилированные рецепторы не способны активировать циклазу, что ведет к разобщению связывания гормона и активации клетки. Аналогичные примеры физиологической адаптации, осуществляемой путем понижающей регуляции количества рецепторов гомологичным гормоном, можно наблюдать в случае инсулина, глюкагона, ТРГ, гормона роста, ЛГ, ФСГ, катехоламинов. Некоторые гормоны (ангиотензин II и пролактин) осуществляют **повышающую регуляцию** своих рецепторов. Эти изменения количества рецепторов могут происходить очень быстро (за время, измеряемое минутами или часами), и, по-видимому, они служат важным средством регуляции биологического ответа. Эффект частичной утраты рецепторов на биологический ответ, вызываемый данной концентрацией гормона, определяется наличием или отсутствием резервных рецепторов. На рис. 43.4 показано, как влияет 5-кратное снижение количества рецепторов на кривую «концентрация — ответ» в зависимости от этого условия. В случае А (резервные рецепторы отсутствуют) величина ответа достигает лишь 20% от контроля; следовательно, происходит изменение $V_{\max}$. В случае Б (резерв-

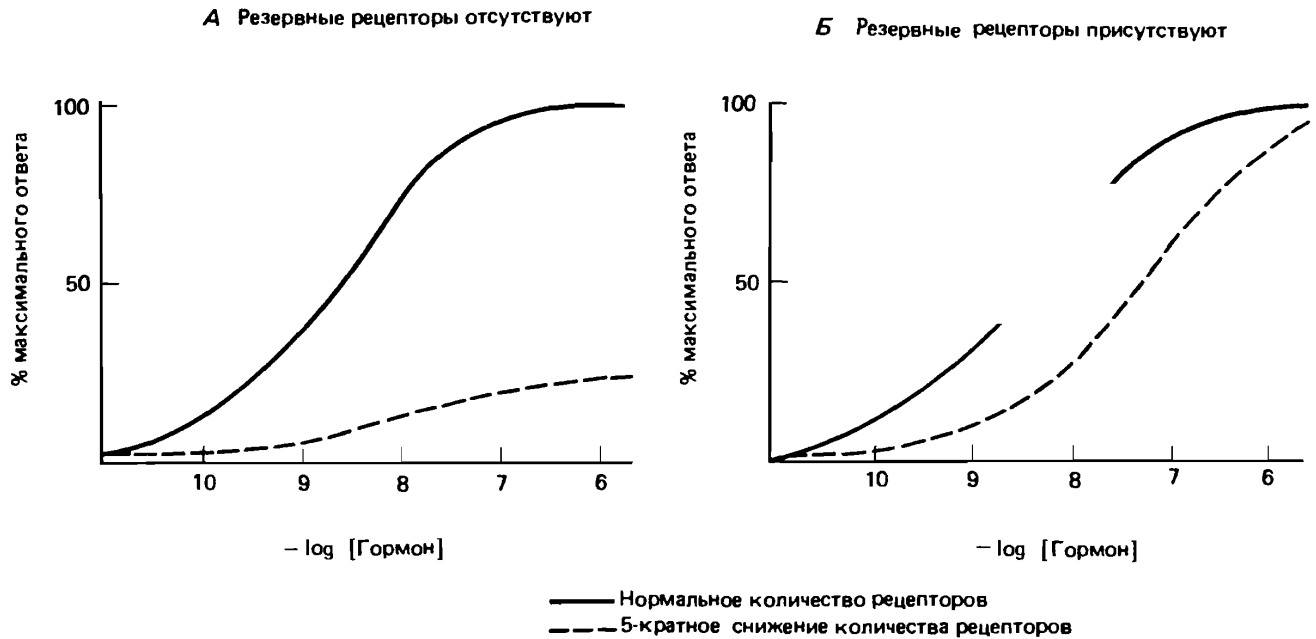


Рис. 43.4. Эффект 5-кратного снижения числа рецепторов на биологический ответ в системе, не содержащей (А) и содержащей (Б) резервные рецепторы.

ные рецепторы присутствуют) достигается максимальный ответ, но при гораздо более высокой концентрации гормона, чем в контроле; этот случай аналогичен изменению K_M .

Структура рецепторов

Лучше других изучен ацетилхолиновый рецептор, который легко получить в очищенном виде, так как он содержится в относительно большом количестве в электрическом органе угря *Torpedo californica*. Этот рецептор состоит из четырех субъединиц α_2 , β , γ и δ . Две α -субъединицы связывают ацетилхолин. Методом направленного мутагенеза были выявлены те области α -субъединицы, которые участвуют в образовании трансмембранного ионного канала, осуществляющего главную функцию рецептора ацетилхолина.

Содержание других рецепторов очень мало, и это препятствовало проведению их очистки и анализа. В настоящее время методы генной инженерии позволяют получать необходимое количество материала, и такие исследования стали активно развиваться. Удалось показать, что рецептор инсулина представляет собой гетеротетрамер ($\alpha_2 \beta_2$), в котором субъединицы соединены множественными дисульфидными связями; выступающая из мембраны α -субъединица связывает инсулин, а пронизывающая мембрану β -субъединица обеспечивает передачу сигнала, вероятно, при участии тирозинкиназы, составляющей цитоплазматическую часть этого полипептида. Рецепторы инсулиноподобного фактора роста

1 (ИФР 1), эпидермального фактора роста (ЭФР) и липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в целом сходны с рецептором инсулина (см. рис. 51.16). Рецепторы других полипептидных гормонов охарактеризованы хуже, но, основываясь на их чувствительности к ряду пептидаз и протеолитических ферментов, полагают, что они имеют общий белковый компонент. Во многих случаях для связывания гормона необходимы, по-видимому, интактные дисульфидные связи, фосфолипид и углеводные компоненты.

Рецепторы стероидных гормонов тоже являются белками. На протяжении последних лет была изучена их функция, а теперь начинает выясняться и структура. Рассмотрим в качестве примера рецептор глюкокортикоидов (рис. 43.2). Он содержит три функционально разные области: 1) участок связывания гормонов, расположенный в С-концевой части полипептидной цепи; 2) прилегающий к нему участок связывания ДНК; 3) специфическая область N-концевой половины белковой молекулы, необходимая для высокоаффинного связывания с соответствующим участком ДНК (и содержащая большую часть антигенных участков молекулы). Существование этих трех функциональных доменов было подтверждено путем анализа рецепторов, синтезированных с использованием ДНК. Видимо, такая структура в принципе свойственна разным типам рецепторов стероидных гормонов; при этом наблюдается высокая степень гомологии в последовательности аминокислот соответствующих участков. Очень любопытна также гомология между этим типом рецепторов и *v-erbA*-онкогеном.

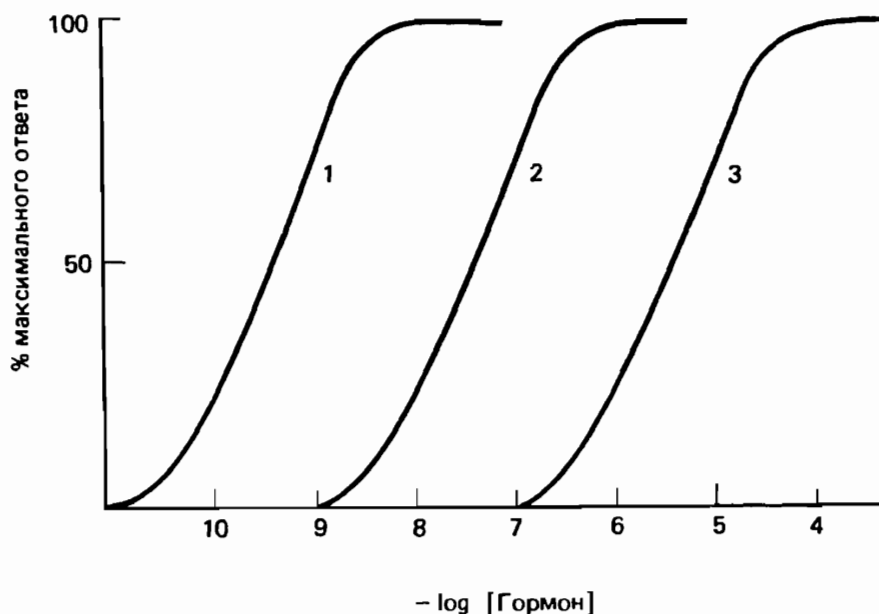


Рис. 43.5. Разные гормоны одного и того же класса могут различаться по активности. Одинаковый по силе ответ достигается при разных концентрациях гормонов.

Концепция агониста — антагониста

Химические соединения гормональной природы можно разделить на четыре группы в зависимости от способности вызывать биологический ответ, опосредованный рецептором данного гормона: агонисты, частичные агонисты, антагонисты и неактивные соединения. Эта классификация была очень подробно разработана применительно к глюкокортикоидам (см. гл. 48).

К агонистам относят соединения, способные вызывать максимальный ответ, однако необходимые для этого концентрации могут быть различны (рис. 43.5 и пример *А* на рис. 43.6). На рис. 43.5 цифры 1, 2 и 3 можно отнести к инсулину свиньи, проинсулину свиньи и инсулину морской свинки соответственно. Во всех проверенных системах эти препараты инсулина вызвали примерно одинаковый по силе ответ, но при собственной для каждого из инсулинов концентрации. Аналогичным образом цифры 1, 2, 3 на

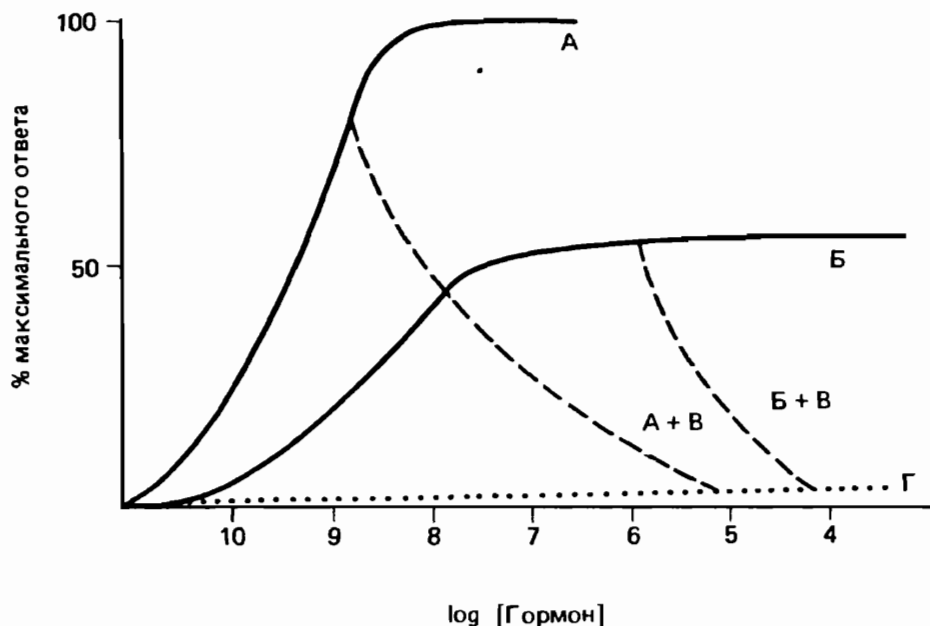


Рис. 43.6. Гормоны можно разделить на следующие группы: агонисты (*А*), частичные агонисты (*Б*), антагонисты (*А + В* и *Б + В*) и неактивные агенты (*Г*).

этом рисунке могут обозначать дексаметазон, кортизол и кортикостерон (см. табл. 48.4).

Частичные агонисты вызывают ослабленный ответ, даже если используются в очень высокой концентрации (см. рис. 43.6, Б). Антагонисты обычно не оказывают эффекта сами по себе, но полностью ингибируют действие агонистов и частичных агонистов (см. примеры А + В и Б + В на рис. 43.6). Большая группа соединений, структурно сходных с гормонами, не обладает собственным эффектом и не влияет на действие агонистов и антагонистов. Их относят к категории неактивных веществ (рис. 43.6, Г).

Частичные агонисты нередко конкурируют с агонистами за связывание с рецептором (и активацию его), и в этих случаях они становятся частичными антагонистами. Степень торможения активности агониста, вызываемая частичными или полными антагонистами, зависит от соотношения концентраций соответствующих стероидов. Как правило, антагонист вызывает торможение в концентрации намного большей, чем та, в которой агонист оказывает максимальный эффект. Столь высокие концентрации крайне редко возникают *in vitro*, однако этот феномен широко используется для исследования глюкокортикоидных гормонов в условиях *in vitro*.

В табл. 48.4 перечислены стероиды, использованные в исследованиях, на основании которых впервые было высказано предположение о двойной функции глюкокортикоидного рецептора, а именно связывание лиганда и — через обусловленное этим изменение структуры — связывание с ДНК. Из этой гипотезы следовало, что 1) агонисты связываются с рецептором, полностью его активируют и вызывают максимальный биологический ответ; 2) частичные агонисты полностью занимают рецептор, но не полностью его активируют и потому вызывают частичный биологический ответ; 3) антагонисты полностью занимают рецептор, но образовавшийся комплекс не способен связываться с ДНК и потому непосредственно не вызывает биологического ответа, однако эффект агонистов при этом блокируется.

После того как была выяснена роль рецепторов в действии гормонов, стало очевидно, что нарушение функции рецепторов может лежать в основе ряда заболеваний. В табл. 43.2 приведены три основные категории таких заболеваний. Первая группа охватывает случаи патологии, обусловленные появлением антител против рецепторов определенных гормонов. Эти антитела (класса IgG) могут блокировать связывание гормона (папиллярно-пигментная дистрофия кожи с инсулинорезистентностью; астма), имитировать связывание гормона (болезнь Грейвса) или повышать скорость оборота рецептора (тяжелая миастения).

Ко второй группе отнесены болезни, при которых не выявляется связывание гормона с рецептором. Действительно ли рецепторы в этих случаях отсут-

Таблица 43.2. Гормональные рецепторы и связанные с ними заболевания

Заболевание	Рецептор	Характер нарушения
Болезнь Грейвса (гипертиреозидизм)	ТСГ	Антитела стимулируют рецептор ТСГ
	Инсулиновый	Антитела блокируют связывание инсулина с рецептором
Папиллярно-пигментная дистрофия кожи с инсулинорезистентностью		
Миастения гравис	Ацетилхолиновый	Антитела способствуют повышению скорости оборота рецептора ацетилхолина
Астма	β-Адренергический	Антитела блокируют связывание β-адренергических агентов с рецептором
Наследственный нефрогенный сахарный диабет	АДГ	Дефицит рецепторов
Синдром тестикулярной феминизации	Андрогенный	Дефицит рецепторов
Псевдогипопаратиреозидизм	ПТГ	« »
Рахит типа II, резистентный к витамину D	Рецептор кальцитриола	« »
Ожирение	Инсулиновый	Снижение связывания гормона
Сахарный диабет типа II [инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНСД)]	«	То же

ствуют или же они не выявляются из-за дефектов структуры, остается неизвестным, поскольку сам анализ рецепторов основан, как правило, на определении их связывания с гормонами.

Третья категория — это заболевания, обусловленные нарушением регуляции рецепторов. У больных, страдающих ожирением или же сахарным диабетом типа II и ожирением, нередко наблюдается непереносимость глюкозы и инсулинорезистентность, несмотря на повышенный уровень инсулина в крови. У таких больных снижено количество рецепторов инсулина (эффект понижающей регуляции) на клетках-мишенях — жировых, печеночных, мышечных. При похудании у этих больных постепенно снижается уровень инсулина в крови, возрастает число ре-

цепторов, повышается чувствительность к гормону и уменьшается непереносимость глюкозы. Последние работы по изучению молекулярных основ рака убедительно показывают, что нарушенное сопряжение рецептора фактора роста с эффекторным механизмом может быть причиной неконтролируемого роста злокачественных клеток. Приведенные примеры служат иллюстрацией целого ряда заболеваний, обусловленных патологией гормональных рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

Ginsberg B. H. Synthesis and regulation of receptors for polypeptide hormones, Pages 59– 97. In: *Biological Regulation and Development*, Vol. 3B, Yamamoto K. (ed.), Plenum

Press, 1985.

Granner D. K., Lee F. The multiple endocrine neoplasia syndromes, Chapter 76. In: *Comprehensive Textbook of Oncology*, Moosa A. R., Robson M. C., Schimpff S. C. (ed.), Williams and Wilkins, 1984.

Mishina M. et al. Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature*, 1984, **307**, 604.

Roth J., Taylor S. I. Receptors for peptide hormones: Alternations in disease of humans, *Annu. Rev. Physiol.*, 1982, **44**, 639.

Roth J. et al. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular messengers. *N. Engl. J. Med.*, 1982, **306**, 523.

Sibley D. R., Lefkowitz R. J. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, 1985, **317**, 124.

Действие гормонов

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Действие гормонов на уровне клетки начинается с того, что гормон связывается со своим специфическим рецептором. Гормоны можно классифицировать по локализации рецепторов, а также по природе сигнала или второго посредника, опосредующего действие гормона внутри клетки. Некоторые из вторых посредников идентифицированы, однако для ряда гормонов природа внутриклеточного сигнала не установлена. В настоящее время достигнуты значительные успехи в изучении действия гормонов внутри клетки, прежде всего — регуляции экспрессии специфических генов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Основой правильного диагноза и соответственно правильного лечения болезни служит понимание происходящих в организме больного патофизиологических процессов и их количественная оценка. Заболевания эндокринной системы, которые, как правило, обусловлены избыточной либо недостаточной продукцией гормонов, — прекрасный пример того, как теоретические представления находят применение в клинической медицине. Зная общие аспекты действия гормонов, а также физиологическое и биохимическое действие отдельных гормонов, можно выявить синдромы эндокринного заболевания, обусловленного дисбалансом гормонов, и назначить эффективное лечение.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГОРМОНОВ

Гормоны можно классифицировать по химическому составу, растворимости, локализации их рецепторов и природе сигнала, опосредующего гормональный внутриклеточный эффект. Классификацию, основанную на последних двух свойствах, иллюстрирует табл. 44.1, а общие характеристики каждой из групп приведены в табл. 44.2.

Гормоны первой группы липофильны и, за ис-

ключением T_3 и T_4 , являются производными холестерина. После секреции они связываются с транспортными белками; это разрешает проблему растворимости и одновременно удлинит период полужизни в плазме крови. Свободный гормон легко проходит сквозь плазматическую мембрану любой клетки и, попадая в клетку-мишень, связывается с рецепторами, находящимися в цитоплазме или ядре. Комплекс лиганд — рецептор рассматривается как внутриклеточный посредник действия гормонов этой группы.

Вторая основная группа состоит из водорастворимых гормонов, которые присоединяются к плазматической мембране клеток-мишеней. Воздействие присоединившихся к поверхности клетки гормонов на внутриклеточные процессы обмена опосредуется промежуточными соединениями, называемыми **вторыми посредниками** (первый посредник — сам гормон); последние образуются в результате взаимодействия лиганд — рецептор. Концепция второго посредника возникла в результате работ Сазерленда, показавшего, что адреналин связывается с плазматической мембраной эритроцитов голубя и увеличивает внутриклеточную концентрацию cAMP. В последующих сериях исследований было выявлено, что cAMP опосредует метаболические эффекты многих гормонов. Гормоны, в отношении которых доказан такой механизм действия, составляют группу II.A. Некоторые гормоны используют в качестве внутриклеточного сигнала кальций или метаболиты сложных фосфоинозитидов (или то и другое вместе), хотя первоначально предполагалось, что они действуют через cAMP. Эти гормоны включены в группу II.B. Для большой и очень интересной группы II.B внутриклеточный посредник окончательно не установлен. В качестве возможных кандидатов на эту роль для инсулина рассматривали целый ряд соединений: cAMP, cGMP, H_2O_2 , кальций, несколько коротких пептидов, фосфолипид, сам инсулин и инсулиновый рецептор, но пока не найдено ни одного, отвечающего необходимым критериям. Может оказать-

Таблица 44.1. Классификация гормонов по механизму действия

Группа I. Гормоны, связывающиеся с внутриклеточными рецепторами	
Эстрогены	Кальцитриол ($1,25 \text{ [OH]}_2\text{-D}_3$)
Глюкокортикоиды	Андрогены
Минералокортикоиды	Тиреоидные гормоны (T_3 и T_4)
Прогестины	
Группа II. Гормоны, связывающиеся с рецепторами на поверхности клетки	
<i>А. Второй посредник — cAMP</i>	
Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Паратиреоидный гормон (ПТГ)
Ангиотензин II	Опиоиды
Антидиуретический гормон (АДГ)	Ацетилхолин
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Глюкагон
Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)	α_2 -Адренергические катехоламины
Липотропин (ЛПГ)	Кортикотропин-рилизинг-гормон (КРГ; кортиколиберин)
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	Кальцитонин
Меланоцит-стимулирующий гормон (МСГ)	Соматостатин
Тиреоид-стимулирующий гормон (ТСГ)	β -Адренергические катехоламины
<i>Б. Второй посредник — кальций или фосфатидилинозиты (или то и другое)</i>	
α_1 -Адренергические катехоламины	Ацетилхолин (мускариновые рецепторы)
Холецистокинин	
Гастрин	
Вещество Р	
Тиреотропин-рилизинг-гормон (ТРГ; тиролиберин)	Гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ; гонадолиберин)
Вазопрессин	Ангиотензин II
<i>В. Внутриклеточный посредник неизвестен</i>	
Хорионический соматомаммотропин (ХС)	
Гормон роста	Окситоцин
Инсулин	Фактор роста нервов (ФРН)
Инсулиноподобные факторы роста (ИФР I, ИФР 2)	Фактор роста эпидермиса (ФРЭ)
	Фактор роста фибробластов (ФРФ)
Пролактин (ПРЛ)	Фактор роста из тромбоцитов

ся, что действие гормонов этой группы опосредовано различными механизмами и несколькими медиаторами. Отдельные гормоны трудно отнести к какой-то одной категории, и по мере накопления информации их место в классификации может измениться.

Таблица 44.2. Общая характеристика классов гормонов

	Группа I	Группа II
Химическая природа	Стероиды Иодтиронины Кальцитриол	Полипептиды Белки Гликопротеины Катехоламины
Растворимость	Липофильные	Гидрофильные
Транспортные белки	Имеются	Не имеются
Период полужизни в плазме крови	Продолжительный (часы и дни)	Короткий (минуты)
Рецептор	Внутриклеточный	На плазматической мембране
Медиатор	Гормон-рецепторный комплекс	cAMP, Ca^{2+} , метаболиты сложных фосфоинозитидов и др.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ I ГРУППЫ

Общая схема действия гормонов этой группы показана на рис. 44.1. Их липофильные молекулы диффундируют сквозь плазматическую мембрану любых клеток, но только в клетках-мишенях они находят свой специфический рецептор, имеющий высокую степень сродства к гормону. Образуется комплекс гормон—рецептор, который далее подвергается «активации». В результате этой реакции, зависящей от температуры и присутствия солей, меняется величина, конформация и поверхностный заряд комплекса, и он приобретает способность связываться с хроматином. Вопрос о том, где происходит образование и «активация» комплекса—в цитоплазме или ядре,—остается спорным, но он не очень существен для понимания процесса в целом. Гормон-рецепторный комплекс связывается со специфической областью ДНК и активирует либо инактивирует специфические гены. В результате избирательного воздействия на транскрипцию генов и синтез соответствующих мРНК происходит изменение содержания определенных белков, что сказывается на активности тех или иных процессов метаболизма. Эффект каждого из гормонов описываемой группы совершенно специфичен; как правило, их влияние сказывается менее чем на 1% белков или мРНК клетки-мишени. Здесь мы обсуждаем ядерный механизм действия стероидных и тиреоидных гормонов, поскольку этот механизм хорошо изучен. Однако имеются данные о прямом эффекте указанных гормонов на компоненты цитоплазмы и различные оргanelлы.

Было показано воздействие эстрогенов и глюкокортикоидов на деградацию мРНК; известно также,

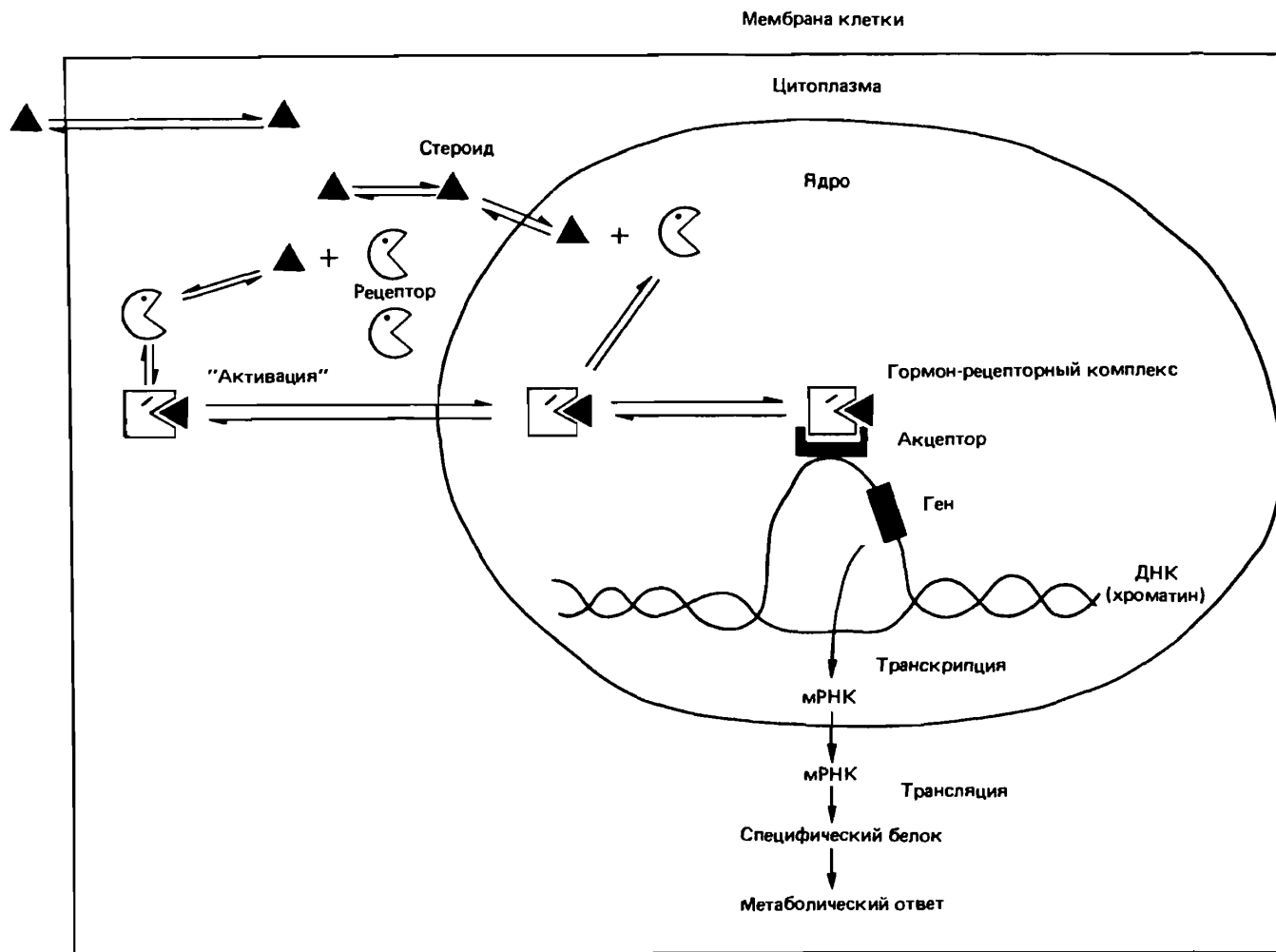


Рис 44.1. Стероидный гормон связывается с внутриклеточным рецептором и вызывает изменение его конформации. Далее этот комплекс связывается со специфической областью на хроматине, что приводит к активации ограниченного числа генов. Тиреоидные гормоны связываются с рецептором, составляющим часть хроматинового комплекса. В остальном механизм действия этих гормонов, по-видимому, одинаков.

что глюкокортикоиды оказывают влияние на пост-трансляционный процессинг некоторых белков. Но все же большая часть данных указывает на то, что основной эффект этих гормонов проявляется на уровне транскрипции генов. Хотя биохимический механизм транскрипции генов в клетках млекопитающих не вполне ясен, тем не менее можно представить себе в общей модели те структурные компоненты, которые необходимы для проявления регулирующего эффекта стероидных и тиреоидных гормонов на этот процесс (рис. 44.2). Транскрибируемые гены должны находиться в участках «открытого», т.е. транскрипционно-активного, хроматина (изображено в виде вздутия на рис. 44.1), о чем свидетельствует их чувствительность к гидролизу ДНКазой I. Такие гены, судя по полученным к настоящему времени данным, содержат по крайней мере два разных регуляторных элемента (сайты регуляции), расположенных в последовательности ДНК, примыкающей к 5'-концу сайта инициации транскрипции (рис. 44.2). Первый из них — **промоторный элемент**

(ПЭ) — универсален, поскольку в той или иной форме имеется во всех генах. Он определяет место прикрепления РНК-полимеразы II к ДНК, а следовательно, и точность начала транскрипции (начала считывания ДНК) (см. гл. 41).

Второй элемент — **гормон-чувствительный (ГЧЭ)** — выявлен во многих генах, регулируемых стероидными гормонами. Он локализован несколько дальше от 5'-конца, чем ПЭ, и может состоять из нескольких отдельных компонентов. Считается, что ГЧЭ модулирует частоту инициации транскрипции и в меньшей степени зависит от положения и ориентации (по сравнению с ПЭ). В этом отношении он похож на **энхансерные элементы**, обнаруженные в других генах (см. гл. 41). Как правило, ГЧЭ выявляется на несколько сотен нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции, но точная локализация варьирует от гена к гену. В некоторых случаях этот элемент расположен в самом транскрибируемом гене.

Для идентификации ГЧЭ необходимо, чтобы он

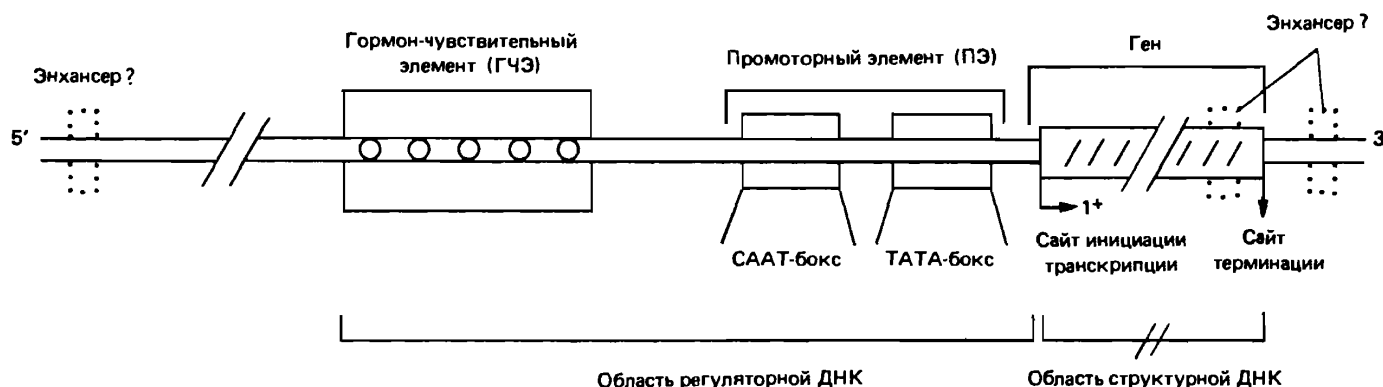


Рис. 44.2. Структурные компоненты, участвующие в стероидной регуляции транскрипции генов.

связывал гормон-рецепторный комплекс с бóльшим сродством, чем остальная ДНК в ядре или ДНК из другого источника. Такое специфическое связывание было действительно продемонстрировано. Кроме того, ГЧЭ должен передавать дальше свой ответ на гормон. Чтобы это проверить, предполагаемую регуляторную последовательность ДНК «сшивают» с маркерным геном. Обычно в такие составные гены включают те маркеры, которые в нормальных условиях не подвержены влиянию гормона. В качестве маркерных генов используют чаще всего гены глобина, тимидинкиназы или бактериальной хлорамфеникол-ацетилтрансферазы. Образовавшиеся при слиянии составные гены переносят в клетку-мишень, и если после этого обнаруживается, что гормон начинает регулировать транскрипцию маркера, то наличие функционально активного ГЧЭ можно считать доказанным. Использование этой техники позволяет точно определить положение ГЧЭ, его ориентацию и эффект замещения оснований. Конкретный механизм того, как влияет на транскрипцию взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с ГЧЭ, исследуется очень интенсивно. Предположительно регуляция осуществляется на уровне инициации транскрипции, но возможен эффект и на процессы элонгации и терминации. Высказывались предположения, что регуляторные сайты локализованы в самом гене или вне его в положении выше 5' от сайта инициации или ниже 3'. Наконец, возможно также участие и *транс*-активных регуляторных механизмов (т. е. воздействие со стороны другой хромосомы).

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ II ГРУППЫ (ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ)

Большая часть гормонов нерастворимы, не имеют специальных транспортирующих их белков (и потому характеризуются коротким периодом полужизни в плазме крови) и запускают ответную реакцию посредством присоединения к рецепторам,

локализованным на плазматической мембране (табл. 44.1 и 44.2). Механизм действия гормонов этой группы целесообразно обсуждать путем рассмотрения их внутриклеточных посредников.

1. сАМР КАК ВТОРОЙ ПОСРЕДНИК

сАМР (циклический АМР, 3', 5'-адениловая кислота) — повсеместно распространенный нуклеотид, образующийся из АТФ при участии фермента аденилатциклазы, играет ключевую роль в механизме действия ряда гормонов. Различные гормоны увеличивают либо снижают внутриклеточный уровень сАМР (табл. 44.3), причем их эффект варьирует от ткани к ткани. Адреналин резко увеличивает концентрацию сАМР в мышцах, относительно мало влияет на этот параметр в печени. Прямо противоположное можно констатировать в отношении глюкагона. От-

Таблица 44.3. Субклассификация гормонов группы II. А

Гормоны, стимулирующие аденилатциклазу	Гормоны, ингибирующие аденилатциклазу
АКТГ (адренокортикотропный гормон)	Ацетилхолин
АДГ (антидиуретический гормон)	α_2 -Адренергические гормоны
β -Адренергические гормоны	Ангиотензин II
Кальцитонин	Опиоиды
КРГ (кортиколиберин)	Соматостатин
ФСГ (фолликулостимулирующий гормон)	
Глюкагон	
ХГЧ (хоригонадотропин человека)	
ЛГ (лютеинизирующий гормон)	
Липотропин	
МСГ (меланоцит-стимулирующий гормон)	
ПТГ (паратиреоидный гормон)	
ТСГ (тиреонид-стимулирующий гормон)	

вет тканей на действие нескольких гормонов этой группы осуществляется через посредство уникальных для каждого гормона рецепторов, сопряженных с одним и тем же соединением — аденилатциклазой. Лучший пример тому — клетки жировой ткани, в которых адреналин, АКТГ, ТСГ, глюкагон, МСГ и вазопрессин стимулируют аденилатциклазу и повышают уровень сАМР. Комбинация максимально эффективных концентраций этих гормонов не дает аддитивность эффекта, а обработка клеток, вызывающая блокаду одного из рецепторов, не меняет клеточного ответа на другие гормоны.

Аденилатциклазная система

Компоненты этой системы в клетках млекопитающих показаны на рис. 44.3. Взаимодействие гормона со своим рецептором приводит к активации либо инактивации аденилатциклазы. Этот процесс опосредуется по крайней мере двумя GTP-зависимыми регуляторными белками, обозначаемыми G_s - (стимулирующий) и G_i - (ингибирующий) белок (используют также обозначения N_s - и N_i -белок); каждый из этих белков состоит из трех субъединиц: α , β и γ . Аденилатциклаза, локализованная на внутренней поверхности плазматической мембраны, катали-

зирует образование сАМР из АТР в присутствии ионов магния (см. рис. 34.14).

То, что первоначально рассматривали как один белок с двумя функционально разными доменами, оказалось системой выдающейся сложности. Исследования, проведенные в течение последних 15 лет, выявили биохимическую универсальность рецепторов гормонов и обоих доменов аденилатциклазного комплекса (GTP-регуляторного и каталитического) и позволили создать модель их функционирования (рис. 44.3). Модель позволяет понять, каким образом пептидные гормоны стимулируют или ингибируют образование сАМР.

Две параллельные системы, стимулирующая (s) и ингибирующая (i), сопряжены с одной и той же каталитической молекулой (c). Каждая система состоит из рецептора — R_s или R_i — и регуляторного комплекса — G_s и G_i . G_s и G_i являются тримерами, состоящими из α -, β - и γ -субъединиц. По-видимому, субъединицы β и γ в обоих тримерах идентичны. Различающиеся α -субъединицы обозначают соответственно α_s (мол. масса 45 000) и α_i (мол. масса 41 000). Связывание гормона с R_s или R_i приводит к опосредованной рецептором активации G-белка, что влечет за собой Mg^{2+} -зависимое связывание GTP α -

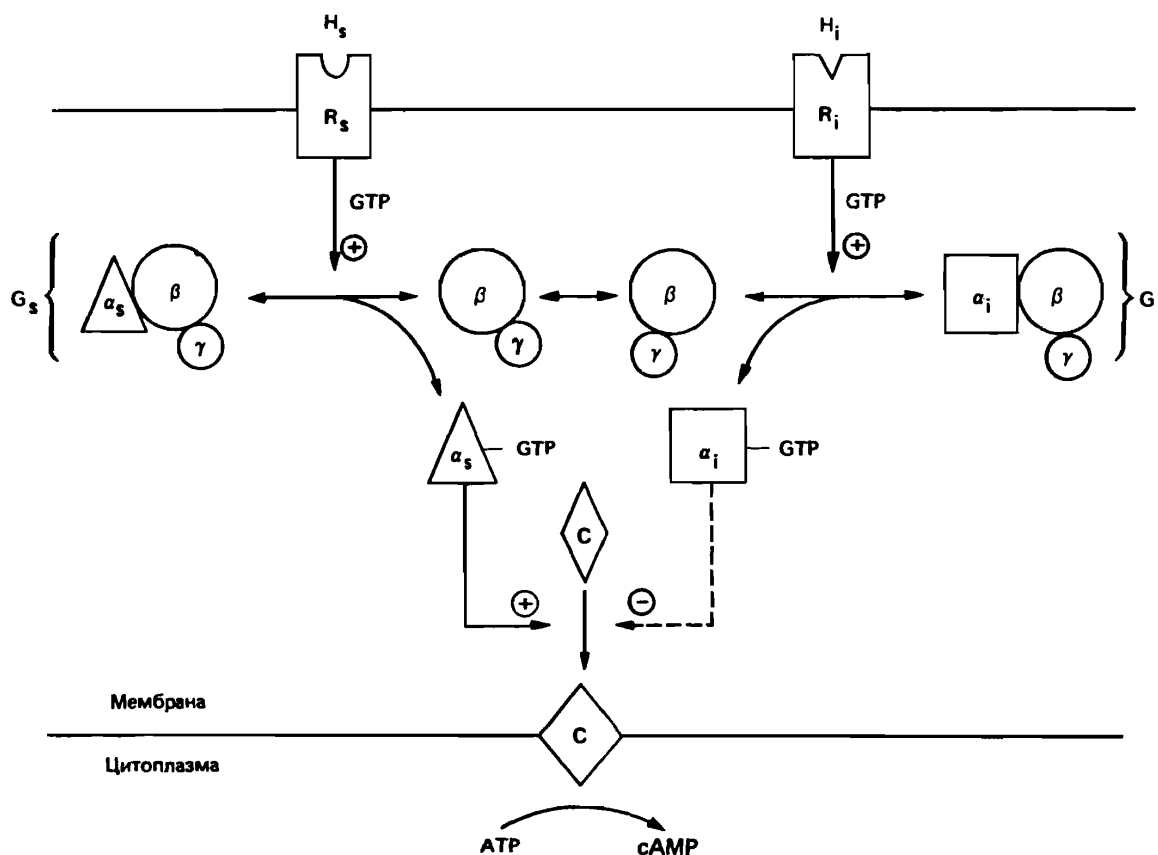
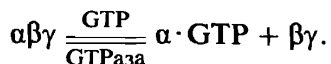


Рис. 44.3. Гормон-рецепторный сигнал (H) передается через стимулирующий (s) и ингибирующий (i) регуляторный комплекс (G_s или G_i) и либо стимулирует, либо ингибирует активность аденилатциклазы (C). Аденилатциклаза катализирует образование сАМР из АТР. (Modified with permission from Gilman A. G. G-proteins and dual control of adenylyl cyclase, Cell, 1984, 36, 577. Copyright the Massachusetts Institute of Technology.)

субъединицей с отделением от нее β - и γ -субъединиц.



Субъединица α_s обладает GTPазной активностью; гидролиз GTP ведет к переходу ее активной формы $\alpha_s \cdot \text{GTP}$ в неактивную и восстановлению тримерной структуры комплекса G_s . Действие холерного токсина — необратимого активатора аденилатциклазы — основано на том, что он вызывает ADP-рибозилирование α_s -субъединицы и тем самым инактивацию GTPазы; иными словами, он фиксирует α_s -субъединицу в активной форме. Субъединица α_i тоже является GTPазой; однако ее комплекс с GDP ($\alpha_i \cdot \text{GDP}$) плохо диссоциирует. Реактивация α_i происходит путем обмена GTP на GDP. Коклюшный токсин необратимо активирует аденилатциклазу посредством ADP-рибозилирования α_i -субъединицы; при этом α_i теряет способность активироваться. Другой необратимый активатор аденилатциклазы — NaF; судя по тому, что его эффект на белки G_s и G_i примерно одинаков, можно предположить, что он воздействует и на α_s -, и на α_i -субъединицы.

Какова роль каждой из субъединиц — α , β и γ , — в точности пока не установлено. Можно высказать две гипотезы. Первая: α_s - и α_i -субъединицы неконкурентно взаимодействуют с каталитическим доменом (C) аденилатциклазы, оказывая соответственно противоположные эффекты; конечный результат в этом случае зависит от соотношения активных α_s и α_i . Однако оказалось, что в изолированной системе активная α_i -субъединица очень слабо ингибирует C. Повидимому, верна вторая гипотеза, согласно которой β -субъединица G_i -белка ингибирует α_s ; при этом субъединица α_s , связывающая β , выступает как антиингибитор аденилатциклазы, но сама по себе не обладает прямым эффектом.

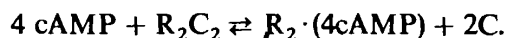
Многие компоненты циклазной системы, в том числе каталитическую субъединицу, удалось получить в очищенном виде, и сейчас уже ясно, что существует целое семейство G-белков. Так, очень близки к G-белку аденилатциклазы трансдуцин (белок, участвующий в сопряжении света с фотоактивацией сетчатки глаза) и продукты *ras*-онкогенов; из ткани головного мозга выделен уникальный белок G_o ; другие, пока еще мало изученные белки этого ряда, по-видимому, участвуют в транспорте ионов кальция и калия или же метаболизме фосфоинозитидов.

Значение этих компонентов выявляется в таком «природном эксперименте» как псевдогипопаратиреоидизм. Этот синдром характеризуется гипокальциемией и гиперфосфатемией (биохимические признаки гипопаратиреоидизма) и рядом врожденных дефектов; при этом функция паратиреоидной железы не нарушена: биологически активный ПТГ секретируется в большом количестве. Однако органы-мишени этих больных резистентны к гормону из-за

какого-то дефекта на пострецепторном уровне. Это может быть частичная недостаточность G-белка (вероятно, только α_s -субъединицы), вследствие которой нарушено сопряжение между связыванием гормона и активацией аденилатциклазы; встречаются случаи, когда образование cAMP в ответ на действие ПТГ протекает нормальным образом, но отсутствует эффект cAMP на метаболические реакции. Не удивительно, что у больных с псевдогипопаратиреоидизмом часто наблюдается нарушение клеточного ответа и на другие гормоны, в том числе на ТСГ, глюкагон и β -адренергические агенты.

Протеинкиназа

В прокариотических клетках cAMP связывается со специфическим белком, называемым каталитическим регуляторным белком (КРБ); этот белок связывается непосредственно с ДНК и воздействует на экспрессию генов. Аналогия между этим эффектом и описанным выше действием стероидных гормонов очевидна. В эукариотических клетках cAMP связывается с протеинкиназой — гетеротетрамерным белком, состоящим из двух регуляторных (R) и двух каталитических (C) субъединиц. Связывание cAMP протекает следующим образом:



Комплекс R_2C_2 лишен ферментативной активности, но при связывании cAMP с R-субъединицами происходит диссоциация R и C, и тем самым активируется C-субъединица (рис. 44.4). Последняя катализирует перенос концевой (γ) фосфатной группы от АТФ (Mg^{2+}) на остаток серина или треонина в различных белках. Участками фосфорилирования обычно служат последовательности -Arg-Arg-X-Ser- и -Lys-Arg-X-X-Ser-, где X — любая аминокислота.

Первоначально были описаны две протеинкиназные активности: **cAMP-зависимая** и **cAMP-независимая**. Однако, как видно из табл. 44.4, все оказалось значительно сложнее, поскольку фосфорилирование белков по современным представлениям — один из важнейших регуляторных механизмов. Все перечисленные в табл. 44.4 киназы представляют собой уникальные соединения, очень разнообразные по субъединичной структуре, молекулярной массе, способности к аутофосфорилированию, K_m для АТФ и субстратной специфичности.

Наиболее подробно изучены cAMP-зависимые протеинкиназы I и II. У этих ферментов общие C-субъединицы и разные R-субъединицы. Первоначально протеинкиназы разделили на два типа, основываясь на различии поверхностного заряда и соответственно условий элюции с ионообменной хроматографической колонки (протеинкиназа I — менее кислый белок и элюируется более слабым солевым раствором по сравнению с протеинкиназой II). В боль-

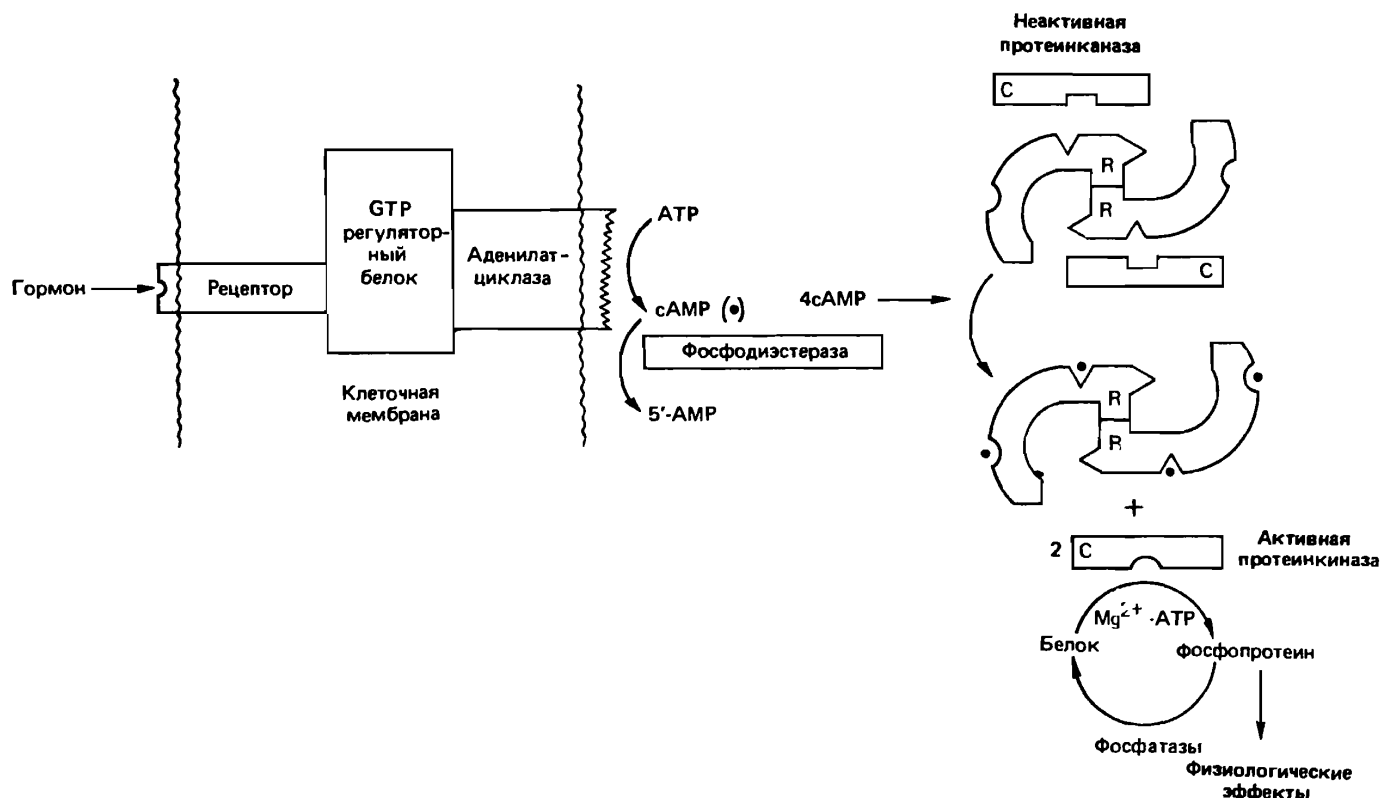


Рис. 44.4. Гормональная регуляция внутриклеточных процессов через cAMP-зависимые протеинкиназы. (Courtesy of J. Corbin.)

шинстве тканей присутствуют обе формы фермента, но существуют большие видовые и тканевые различия в распределении изоформы II. Как показали ра-

Таблица 44.4. Протеинкиназы, полученные в очищенном виде

Гормон-чувствительные

Кальций/кальмодулин-зависимые киназы
Кальций/фосфолипид-зависимые киназы
cAMP-зависимая киназа I и II
сGMP-зависимая киназа
Тирозинкиназа, зависящая от фактора роста эпидермиса
Киназа насекомых, зависящая от циклических нуклеотидов
Инсулин-зависимая тирозинкиназа
Киназа легких цепей миозина
Киназа фосфорилазы
Киназа пируватдегидрогеназы

Гормон-чувствительность не обнаружена

Киназа II казеина
дц-РНК-зависимая киназа фактора элонгации 2α
Гемин-зависимая киназа фактора элонгации 2α
Киназа I, активируемая протеазой
Киназа родопсина
Вирусные тирозинкиназы I, II и III

Предположительно гормон-чувствительные

Киназа I казеина
Киназа II, активируемая протеазой

боты последних лет, протеинкиназы I и II по-разному отвечают на добавление определенных комбинаций аналогов cAMP; использование такого подхода позволяет определить, какая из изоформ опосредует специфический биологический ответ. Некоторые данные указывают также на то, что под действием гормонов происходит избирательная активация протеинкиназы типа I либо II.

В действии гормонов участвуют еще несколько протеинкиназ. Роль некоторых из них показана на рис. 44.5 и в последующих разделах этой главы. Киназы, зависящие от эпидермального фактора роста и инсулина, уникальны тем, что эта ферментативная активность локализована в рецепторе гормона и проявляется при связывании лиганда с рецептором (см. гл. 51). Другая их особенность состоит в том, что они фосфорилируют преимущественно остатки тирозина, что редко встречается в клетках млекопитающих. Какую роль эти ассоциированные с рецептором киназы играют в механизме действия гормона, пока не ясно, но можно предположить, что гормон запускает каскад реакций фосфорилирования, причем один либо несколько продуктов этого каскада служат внутриклеточными посредниками.

Фосфопротеины

Все данные свидетельствуют о том, что эффект cAMP на эукариотические белки опосредован фосфо-

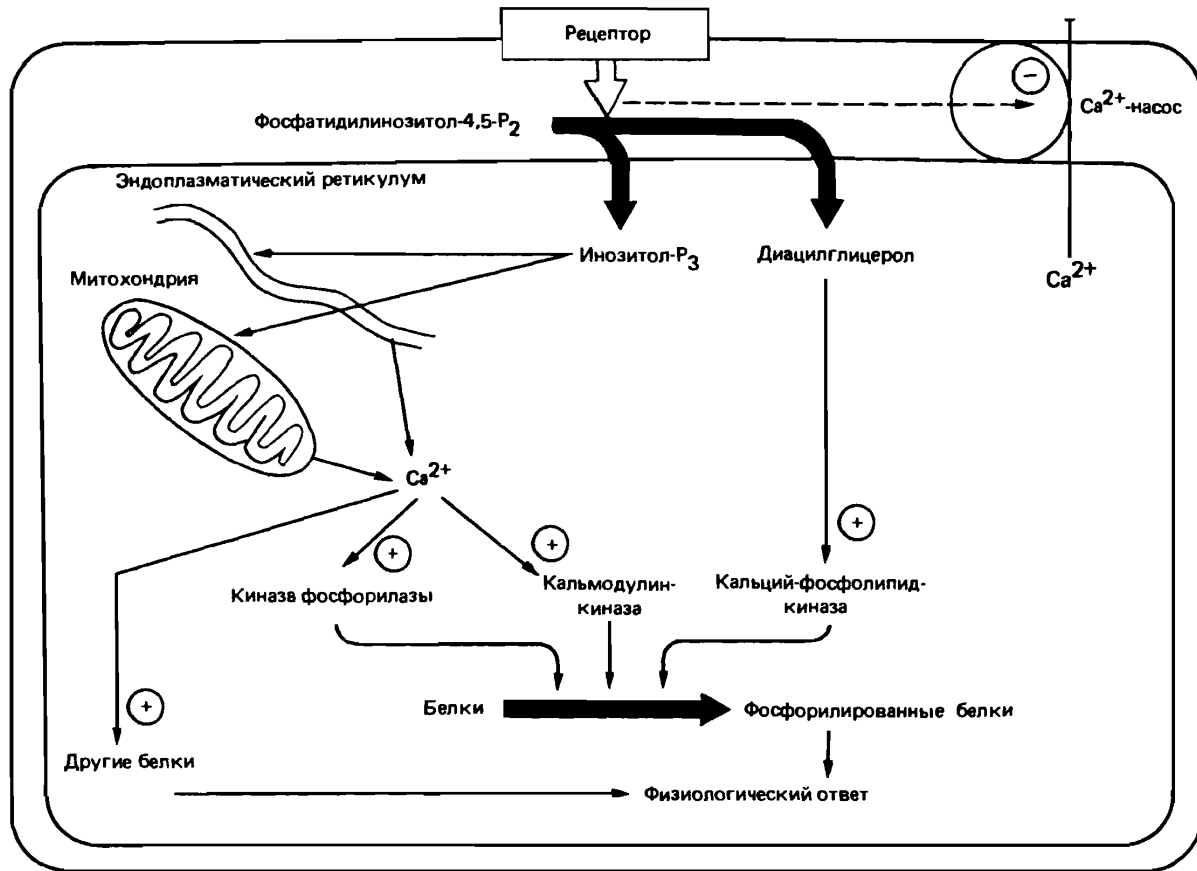


Рис. 44.5. Регуляция действия гормонов через Ca^{2+} . (Courtesy of J. H. Exton.)

рилированием — дефосфорилированием белков. Любое воздействие сАМР, с том числе на такие разные процессы, как стероидогенез, секреция, транспорт ионов, метаболизм углеводов и жиров, индукция ферментов, регуляция генной транскрипции, рост и деление клеток, может регулироваться активностью специфической протеинкиназы или специфической фосфатазы, либо доступностью субстратов фосфорилирования. В некоторых случаях удалось идентифицировать фосфопротеины, участвующие в соответствующих метаболических последовательностях; однако для большинства перечисленных выше процессов такие фосфопротеины не обнаружены. Их определение могло бы быть полезным для выявления тканей-мишеней и было бы безусловно необходимым для количественной оценки метаболического ответа клеток. Многие белки, в том числе казеин, гистоны и протамин, могут подвергаться фосфорилированию; иногда это фосфорилирование может быть искусственным (т.е. протекающим лишь в условиях *in vitro*) феноменом, полезным, однако, для определения протеинкиназной активности. До последнего времени удавалось определить механизм только тех эффектов сАМР, которые имеют место вне клеточного ядра. Однако описано воздей-

ствие сАМР на транскрипцию ряда генов. Остается не ясным, связаны ли эти ядерные эффекты сАМР с фосфорилированием белков или же с участием белка типа КРБ.

Фосфодиэстеразы

Действие гормонов, опосредованное увеличением концентрации сАМР, может быть прекращено различными способами, в том числе путем гидролиза сАМР-фосфодиэстеразами. Наличие этих гидролитических ферментов обеспечивает быстрый оборот сигнального соединения (сАМР), а следовательно, и быстрое прекращение биологического процесса тотчас после удаления стимулирующего гормона. Фосфодиэстеразы сАМР существуют в двух формах: с высокой и низкой K_m , и сами служат объектом регуляции со стороны гормонов, а также внутриклеточных посредников, таких как кальций, действующий, видимо, при участии кальмодулина. Ингибиторы фосфодиэстеразы, в первую очередь метилированные производные ксантина, например кофеин, увеличивают внутриклеточный уровень сАМР, тем самым воспроизводя и усиливая действие гормонов.

Фосфопротеинфосфатазы

Еще один способ контролирования эффекта — регуляция процесса дефосфорилирования белков. Фосфопротеинфосфатазы сами по себе служат объектом регуляции посредством как фосфорилирования-дефосфорилирования, так и воздействия различных веществ. Больше всего накоплено сведений о роли фосфатазы в регуляции обмена гликогена в мышцах. В этой ткани обнаружено два типа фосфопротеинфосфатаз. Тип I дефосфорилирует преимущественно β -субъединицу киназы фосфорилазы, тогда как тип II — α -субъединицу. Активность фосфатазы I находится под контролем двух термостабильных белков-ингибиторов. Ингибитор 1 фосфорилируется сАМР-зависимой протеинкиназой; ингибитор 2, являющийся, по-видимому, субъединицей неактивной фосфатазы, также подвергается фосфорилированию — предположительно киназой-3 гликогенсинтазы. Фосфорилирование обоих ингибиторов ведет к активации фосфатазы. Действие ряда фосфатаз направлено на некоторые специфические остатки; так, существуют фосфатазы, отщепляющие фосфат от фосфорилированных остатков тирозина.

Внеклеточный сАМР

Некоторое количество сАМР выходит из клеток и может быть выявлено во внеклеточной жидкости. Так, при воздействии глюкагона на печень либо вазопрессина или ПТГ на почки повышается уровень сАМР соответственно в плазме крови и моче; на этом основано диагностическое определение чувствительности к гормону органа-мишени. У млекопитающих внеклеточный сАМР обладает слабой биологической активностью, а может быть, и вовсе лишен ее, но у прокариот и низших эукариот это чрезвычайно важный внеклеточный посредник.

Гуанилатциклаза, сGMP, сGMP-зависимая протеинкиназа

Циклический GMP образуется из GTP под действием фермента гуанилатциклазы, которая существует в растворимой и мембраносвязанной формах. Каждый из этих изоферментов обладает собственной кинетикой, физико-химическими и антигенными свойствами. Одно время полагали, что действие сGMP функционально противоположно действию сАМР. Сейчас уже ясно, что сGMP играет специфическую роль в действии гормонов. Существует семейство пептидов, выделяемых тканью предсердий, — атриопептиды, которые вызывают выделение натрия с мочой, диурез, расширение сосудов, торможение секреции альдостерона. Эти пептиды (например, натрийуретический фактор предсердий) связываются с мембранной гуанилатциклазой и активи-

руют ее. В результате происходит увеличение (в некоторых случаях 50-кратное) концентрации сGMP, что, по-видимому, и опосредует эти эффекты. Накоплены данные, указывающие на связь сGMP с расширением сосудов. Так, ряд соединений, в частности нитропруссид, нитроглицерин, нитрит натрия, азид натрия, вызывают расслабление гладких мышц и являются мощными сосудорасширяющими агентами; все они увеличивают содержание сGMP путем активации растворимой формы гуанилатциклазы; ингибиторы сGMP-фосфодиэстеразы усиливают и пролонгируют указанные физиологические эффекты. Повышение концентрации сGMP в клетках ведет к активации сGMP-зависимой протеинкиназы, которая в свою очередь фосфорилирует ряд белков гладкой мышцы, в частности легкую цепь миозина; в результате именно этого процесса, как считается, происходит расслабление гладких мышц и расширение сосудов.

2. ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ, ОПОСРЕДОВАННОЕ КАЛЬЦИЕМ И ФОСФОИНОЗИТИДАМИ

Ионизированный кальций служит важнейшим регулятором разнообразных процессов, таких, как мышечное сокращение, сопряжение стимул-секреция, последовательность реакций свертывания крови, активность многих ферментов, возбудимость клеточных мембран. Он является также внутриклеточным посредником действия ряда гормонов.

Метаболизм кальция

Концентрация внеклеточного кальция (Ca^{2+}) составляет 5 ммоль/л и регулируется очень строго (см. гл. 47). Внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция гораздо ниже — 0,1—10 мкмоль/л, а количество Ca^{2+} , связанного с внутриклеточными органеллами (митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом), колеблется в пределах 1—20 мкмоль/л. Несмотря на этот 5000—10 000-кратный концентрационный градиент и благоприятствующий проникновению Ca^{2+} трансмембранный электрический градиент, вход Ca^{2+} в клетки резко ограничен. Изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле происходит по трем механизмам. Ряд гормонов (класса II. Б) повышает проницаемость мембраны для Ca^{2+} и тем самым увеличивает вход в клетку Ca^{2+} . Это может осуществляться по механизму $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена, обладающему большой емкостью, но низким сродством к Ca^{2+} . Существует также зависимый от АТФазы $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -насос, обеспечивающий выведение Ca^{2+} из клетки в обмен на H^+ . Этот механизм характеризуется высоким сродством к Ca^{2+} , но малой емкостью и, по-видимому, ответствен за тонкую настройку уровня Ca^{2+} в цитозоле. Наконец, возмо-

жна как мобилизация Ca^{2+} митохондрий и эндоплазматического ретикулума, так и накопление Ca^{2+} в этих органеллах.

Современные представления о роли Ca^{2+} как внутриклеточного посредника в действии гормонов основаны на двух наблюдениях. Во-первых, удалось количественно определить быстрые изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} — такие изменения соответствуют роли внутриклеточного посредника. Эти данные были получены разными методами, в том числе путем использования флуоресцирующих хелаторов Ca^{2+} — квин-2 (Quin 2) и фура-2 (Fura 2). С помощью этих соединений можно количественно оценить быстрые изменения концентрации Ca^{2+} на субмикромольном уровне. Второе важное наблюдение, указывающее на связь Ca^{2+} с эффектом гормонов, состояло в определении внутриклеточных мишеней действия этого иона: был обнаружен Ca^{2+} -зависимый регулятор фосфодиэстеразной активности, и это послужило основой для понимания того, каким образом Ca^{2+} и cAMP взаимодействуют внутри клетки.

Кальмодулин

Кальций-зависимый регуляторный белок назван кальмодулином; его мол. масса 17 000, по структуре и функции он гомологичен мышечному белку тропонину С. Кальмодулин содержит четыре участка связывания Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} по всем четырем участкам ведет к заметному изменению конформации белка: большая часть молекулы приобретает структуру α -спирали. Эти конформационные переходы определяют, видимо, способность кальмодулина активировать или инактивировать определенные ферменты. Взаимодействие ионов кальция с кальмодулином (и соответствующее изменение активности последнего) в принципе сходно с процессом связывания cAMP с протеинкиназой, обеспечивающим активацию этого фермента. Кальмодулин часто оказывается одной из многочисленных субъединиц сложных белков и, как правило, участвует в регуляции активности различных киназ, а также ферментов синтеза и распада циклических нуклеотидов. Список некоторых ферментов, прямо или косвенно (повидимому, через кальмодулин) регулируемых Ca^{2+} , приведен в табл. 44.5.

Ca^{2+} -кальмодулин оказывает регуляторное влияние не только на активность ферментов и транспорт ионов, но и на функционирование многих структурных элементов в клетке. К числу последних относится актин-миозиновый комплекс гладких мышц, находящийся под β -адренергическим контролем, а в неконтрактильных клетках — микрофиламенты, опосредующие такие процессы, как клеточная подвижность, изменение формы клеток, митоз, высвобождение гранул, эндоцитоз.

Таблица 44.5. Ферменты, регулируемые комплексом кальций-кальмодулин

Аденилатциклаза
Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа
$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза
Ca^{2+} /фосфолипид-зависимая протеинкиназа
Фосфодиэстераза циклических нуклеотидов
Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа
Гликогенсинтаза
Гуанилатциклаза
Миозинкиназа
NAD-киназа
Фосфолипаза A_2
Киназа фосфорилазы
Пируваткарбоксилаза
Пируватдегидрогеназа
Пируваткиназа

Кальций как медиатор действия гормонов

Роль ионизированного кальция в действии гормонов доказывается следующими наблюдениями: эффект многих гормонов 1) исчезает в бескальциевой среде или при истощении внутриклеточных запасов Ca^{2+} ; 2) может быть имитирован с помощью агентов, увеличивающих концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, например Ca^{2+} -ионофора A23187; 3) сопряжен с транспортом Ca^{2+} в клетку. Все эти явления были довольно подробно изучены на клетках гипофиза, гладких мышц, слюнных желез и на тромбоцитах; наиболее полно исследован механизм регуляции метаболизма гликогена в печени вазопрессином и λ -адренергическими катехоламинами. Указанный механизм схематически представлен на рис. 19.5 и 19.7.

Добавление α_1 -агонистов или вазопрессина к изолированным гепатоцитам уже через несколько секунд вызывает 3-кратное увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле (с 0,2 до 0,6 мкмоль/л). Это увеличение предшествует такому же возрастанию активности фосфорилазы; изучение каждого из указанных эффектов показало, что они наблюдаются при сопоставимых концентрациях гормона. α_1 -Антагонисты ингибируют повышение Ca^{2+} в цитозоле; удаление гормона приводит к быстрому снижению как концентрации Ca^{2+} в цитозоле, так и количества фосфорилазы а. Первоначально Ca^{2+} поступает, очевидно, из клеточных органелл, причем запасенного в них Ca^{2+} , видимо, достаточно для того, чтобы мог проявиться немедленный эффект гормона. Для более продолжительного действия необходим либо вход Ca^{2+} в клетку, либо торможение его выхода, осуществляемого Ca^{2+} -насосом. Последний процесс зависит от происходящего одновременно возрастания концентрации cAMP.

Активация фосфорилазы происходит путем превращения фосфорилазы b в фосфорилазу а под дей-

ствием фермента киназы фосфорилазы b. В состав этого фермента (в качестве его δ -субъединицы) входит кальмодулин, и активность фермента возрастает при увеличении концентрации Ca^{2+} в пределах 0,1—1 мкмоль/л, т. е. в тех же пределах, в каких содержание ионов кальция в цитозоле печени повышается в присутствии гормона. Связь между Ca^{2+} и активацией фосфорилазы совершенно определена.

С помощью Ca^{2+} или путем фосфорилирования или обоими способами одновременно осуществляется регуляция целого ряда ключевых ферментов метаболизма; к их числу относятся гликогенсинтаза, глицерол-3-фосфат—дегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, пируваткиназа и пируваткарбоксилаза. Остается не ясным, прямо ли участвует в этой регуляции кальмодулин или же основная роль принадлежит недавно открытым протеинкиназам (Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой либо Ca^{2+} /фосфолипид-зависимой).

Роль продуктов превращения фосфоинозитидов в Ca^{2+} -зависимом действии гормонов

Очевидно, что коммуникация между рецептором гормона на плазматической мембране и внутриклеточными резервуарами Ca^{2+} должна осуществляться с помощью какого-то сигнала. Наиболее вероятные кандидаты на роль такого сигнала — продукты превращения фосфоинозитидов. Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат под действием фосфолипазы C гидролизует до **миоинозитол-1,4,5-трифосфата** и **диацилглицерола** (рис. 44.5). В гепатоцитах эта реакция наблюдается через несколько секунд после добавления вазопрессина или адреналина. Как показано на различных препаратах мембран и целых органелл, миоинозитол- P_3 в концентрациях 0,1—0,4 мкмоль/л вызывает очень быстрое высвобождение Ca^{2+} . Попытки воспроизвести действие гормона посредством этого соединения (а это важный этап установления взаимосвязи между ними) были не совсем успешными, вероятно потому, что трудно добиться проникновения миоинозитола- P_3 в клетку, а внутри клетки он очень быстро гидролизует. Другой продукт гидролиза фосфоинозида — 1,2-диацилглицерол — активирует Ca^{2+} -фосфолипид-зависимую протеинкиназу за счет увеличения K_m -фермента по отношению к Ca^{2+} . Вопрос о том, какую роль играет этот процесс в действии Ca^{2+} -зависимых гормонов, в настоящее время исследуется.

Действие стероидогенных агентов, в том числе АКТГ и сАМР в коре надпочечников; ангиотензина II, K^+ , серотонина, АКТГ и дибутирил-сАМР в клубочковой зоне надпочечников; ЛГ в яичниках; ЛГ и сАМР в клетках Лейдига (в семенниках), сопряжено с возрастанием концентраций фосфатидной ки-

слоты, фосфоинозитола и полифосфоинозитидов в соответствующих тканях-мишенях.

Можно привести еще несколько примеров. Так, через 5—10 с после добавления ТРГ к клеткам гипofиза в них заметно возрастает расщепление фосфоинозитидов фосфолипазой C; при этом повышается уровень инозитолди- и трифосфатов в клетках и в результате происходит мобилизация внутриклеточного кальция. Это ведет к активации Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы, которая в свою очередь фосфорилирует ряд белков (один из них, вероятно, участвует в высвобождении ТСГ). Кальций, по-видимому, служит также внутриклеточным медиатором действия ГнРГ на высвобождение ЛГ. Полагают, что в этом процессе участвует также кальмодулин.

Роль кальция и продуктов расщепления полифосфоинозитидов в действии гормонов представлена на рис. 44.5. Как видно из схемы, продукты гидролиза фосфоинозитидов служат вторыми посредниками, а Ca^{2+} — фактически третьим посредником. Схеме можно было бы дополнить тем, что в сопряжении событий, происходящих на мембране, с высвобождением Ca^{2+} участвует, возможно, G-белок. Такая сложнейшая сеть внутриклеточных посредников, по-видимому, не уникальное явление.

3. ГОРМОНЫ С НЕИЗВЕСТНЫМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ ПОСРЕДНИКОМ

Для многих важных гормонов внутриклеточный посредник не идентифицирован. Любопытно, что эти гормоны распадаются на две группы. Одну из них составляют инсулин, инсулиноподобные факторы роста (ИФР-1 и ИФР-2) и ряд других факторов роста, причем все они, видимо, происходят от общего предшественника. Другая большая группа — это белки, принадлежащие генетически к семейству гормона роста (гормон роста, пролактин, хорионический соматомаммотропин) и явно родственные между собой (см. гл. 45). Указанные группы несколько перекрываются, поскольку ИФР-1 опосредует, по-видимому, многие эффекты гормона роста. Окситоцин не входит ни в первую, ни во вторую группу.

Очень много усилий было затрачено на то, чтобы выявить внутриклеточный посредник инсулина. В качестве кандидатов на эту роль рассматривали целый ряд соединений: сАМР, сGMP, H_2O_2 , Ca^{2+} и сам инсулин. Неоднократно сообщалось об обнаружении в тканевых экстрактах тех или иных «медиаторов» — производных белков или фосфолипидов, но до сих пор ни один из них не выделен и не охарактеризован. Недавно было обнаружено, что рецептор инсулина обладает собственной тирозинкиназной активностью; это вызвало интерес к поиску каскада реакций фосфорилирования, на основе которых можно было бы объяснить механизм действия инсулина. Указан-

ное наблюдение, к тому же не единичное, поскольку тирозинкиназой обладает и фактор роста эпидермиса, стимулировало изучение рецептора инсулина. Нужно отметить, что фактор роста из тромбоцитов тоже является тирозинкиназой, очень сходной со специфическими продуктами онкогенов *v-sis* и *c-sis* (соответственно вирусного и клеточного происхождения). При воздействии этого фактора роста на клетки-мишени (фибробласты, клетки глии или гладких мышц) синтезируются продукты ряда генов, вовлеченные в последующую репликацию этих клеток.

По всей вероятности, в действии этой большой группы гормонов используются совершенно разные механизмы внутриклеточной сигнализации, но традиционные посредники определенно в этом не участвуют.

ЛИТЕРАТУРА

Anderson J. E. The effect of steroid hormones on gene transcription. In: *Biological Regulation and Development*, Goldberger R. F., Yamamoto K. R. (eds.), Vol. 38, Hormone Action, Plenum Press, 1985.

- Blackmore P. F., Exton J. H.* Mechanisms involved in the actions of calcium dependent hormones. In: *Biochemical Action of the Hormones*, Vol. 12, Litwack G. (ed.), Academic Press, 1985.
- Catt K. J., Dufau M. L.* Hormone action: Control of target-cell function by peptide, thyroid, and steroid hormones, Pages 61—105. In: *Endocrinology and Metabolism*, Felig P. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1981.
- Codina J. et al.* Mechanism in the vectorial receptor-adenylate cyclase signal transduction, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1984, **17**, 111.
- Enhancers and eukaryotic gene expression. In: *Current Communications in Molecular Biology*, Gluzman Y., Shenk T. (eds.), Cold Spring Harbor Press, 1983.
- Gilman A.* G proteins and dual control of adenylate cyclase, *Cell*, 1984, **36**, 577.
- Means A. R., Chafouleas J. G.* Calmodulin in endocrine cells, *Annu. Rev. Physiol.*, 1982, **44**, 667.
- Niall H. D.* The evolution of peptide hormones, *Annu. Rev. Physiol.*, 1982, **44**, 615.
- O'Malley B. W.* Steroid hormone action in eukaryotic cells, *J. Clin. Invest.*, 1984, **74**, 307.
- Rasmussen H.* The calcium messenger system (2 parts), *N. Engl. J. Med.*, 1986, **314**, 1094, 1164.

Гормоны гипофиза и гипоталамуса

Дарил Греннер

Сокращения, использованные в этой главе

- АДГ — антидиуретический гормон
АКТГ — адренокортикотропный гормон, адренокортикотропин
ВИП — вазоактивный интестинальный пептид
ГАП — гонадолиберин-ассоциированный пептид
ГнРГ — гонадотропин-рилизинг-гормон, гонадолиберин
ГР — гормон роста
ИФР — инсулиноподобный фактор роста
КРГ — кортикотропин-рилизинг-гормон, кортиколиберин
ЛГ — лютеинизирующий гормон, лютропин
ЛПГ — липотропин
МСГ — меланоцит-стимулирующий гормон
ПОМК — проопиомеланокортин
ПРЛ — пролактин
ТРГ — тиреотропин-рилизинг-гормон, тиролиберин
ТТГ — тиреотропный гормон, тиреотропин
ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, фоллитропин
ХГ — хорионический гонадотропин, хориогонадотропин
ХС — хорионический соматомаммотропин
Т₃ — трийодтиронин
Т₄ — тироксин

ВВЕДЕНИЕ

Передняя доля гипофиза, находясь под контролем гипоталамических гормонов, секретирует ряд гормонов (тропные гормоны), которые регулируют рост и функцию других эндокринных желез или оказывают влияние на метаболические реакции в иных тканях-мишенях. Задняя доля гипофиза продуцирует гормоны, регулирующие водный баланс и выброс молока из лактирующей молочной железы.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Выпадение функции передней доли гипофиза (пангипопитуитаризм) приводит к атрофии щитовидной железы, коры надпочечников и половых желез. Вторичные эффекты, обусловленные отсутствием гормонов, секретируемых этими железами-мишенями, затрагивают большинство органов и тканей и многие универсальные жизненные процессы, такие, как белковый, жировой, углеводный обмен, обмен жидкости и электролитов. При выпадении функции задней доли гипофиза развивается сахарный диабет, теряется способность к концентрированию мочи.

ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА

Секреция (и в некоторых случаях образование) каждого из гипофизарных гормонов, перечисленных в табл. 45.1, находится под тоническим контролем по меньшей мере одного гормона гипоталамуса. Гормоны гипоталамуса высвобождаются из окончаний гипоталамических нервных волокон, окружающих капилляры гипоталамо-гипофизарной системы в ножке гипофиза, и достигают передней его доли через специальную портальную систему сосудов, соединяющую гипоталамус и эту долю. Сведения о структуре некоторых гормонов гипоталамуса можно почерпнуть из табл. 45.2.

Гипоталамические гормоны высвобождаются в пульсирующем режиме, и изолированные клетки-мишени передней доли гипофиза лучше реагируют на пульсовое введение этих гормонов, чем на их длительное воздействие. Высвобождение лютропина (ЛГ) и фоллитропина (ФСГ) контролируется концентрацией одного и того же рилизинг-гормона, гонадолиберина, а его концентрация в свою очередь определяется уровнем в крови половых гормонов, достигающих гипоталамуса (см. петлю обратной

Таблица 45.1. Гипоталамо-гипофизарные гормоны

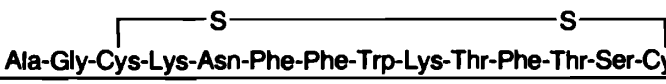
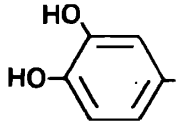
Гормоны гипоталамуса	Сокращение	Высвобождаемый гормон гипофиза ¹⁾
Кортикотропин- рилизинг-гормон (кортиколиберин)	КРГ	АКТГ (ЛПГ, МСГ, эндорфины)
Тиреотропин- рилизинг-гормон (тиролиберин)	ТРГ	ТТГ
Гонадотропин- рилизинг-гормон (гонадолиберин)	ГнРГ	ЛГ, ФСГ
Гормон роста-рилизинг-гормон (соматолиберин)	СТГ-РГ	ГР
Гормон, ингибирующий высвобождение гормона роста (соматостатин)	СС	ГР (ТТГ, ФСГ, АКТГ)
Гормоны, ингибирующие высвобождение пролактина; дофамин и ГАП	ПИГ (пролактин-ингибирующий гормон)	Пролактин

¹⁾ В скобках — гормоны гипофиза, на высвобождение которых данный гипоталамический гормон оказывает вторичное или более слабое действие.

связи на рис. 43.1). Высвобождение адренокортикотропина (АКТГ) контролируется в основном кортиколиберином (кортикотропин-рилизинг-гормоном, КРГ), но в регуляцию этого процесса может быть вовлечен и ряд других гормонов, включая антидиуретический гормон (АДГ), катехоламины, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) и ангиотензин II. На секрецию кортиколиберина влияет корти-

зол (глюкокортикоидный гормон, секретируемый надпочечниками). Высвобождение тиреотропина (ТТГ) зависит главным образом от тиролиберина (тиреотропин-рилизинг-гормон, ТРГ), секреция которого в свою очередь регулируется гормонами щитовидной железы, трийодтиронином (T_3) и тироксином (T_4); секреция ТТГ тормозится соматостатином (см. рис. 46.4). Секреция и продукция гормона роста (ГР) находятся под тоническим контролем как стимулирующих, так и ингибирующих гипоталамических гормонов. Кроме того, в регуляции секреции гормона роста участвует периферическая петля обратной связи. Инсулиноподобный фактор роста 1 (соматомедин С), который опосредует некоторые эффекты гормона роста, стимулирует высвобождение соматостатина и ингибирует секрецию соматолиберина (рис. 45.5). Регуляция синтеза и секреции пролактина (ПРЛ) сводится преимущественно к тоническому подавлению этих процессов гипоталамическими агентами. Ее отличительная особенность состоит в сочетании нервного (раздражение грудных сосков) и нейромедиаторного/нейрогормонального факторов. Дофамин (табл. 45.2) тормозит синтез пролактина (ингибируя транскрипцию пролактинового гена) и его секрецию; однако существуют данные, свидетельствующие о том, что подавление секреции пролактина обусловлено действием не одиого дофамина. Недавно открыт 56-членный нейропептид, обладающий как гонадолибериновой активностью, так и активностью гормона, подавляющего высвобождение пролактина (пролактостатина). Его называют гонадолиберин-ассоциированным (связанным) пептидом (ГАП, GAP). ГАП, общая структура которого и ее специфические особенности представлены на рис. 45.1, является мощным ингибитором секреции пролактина, и его, очевидно, можно

Таблица 45.2. Структура рилизинг-гормонов (либеринов) гипоталамуса

Гормон	Структура
ТРГ	(pyro)Glu-His-Pro-NH ₂
Соматостатин	
ГнРГ	(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂
Пролакто- статин	
КРГ овцы	Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH ₂
Соматоли- берин	Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂

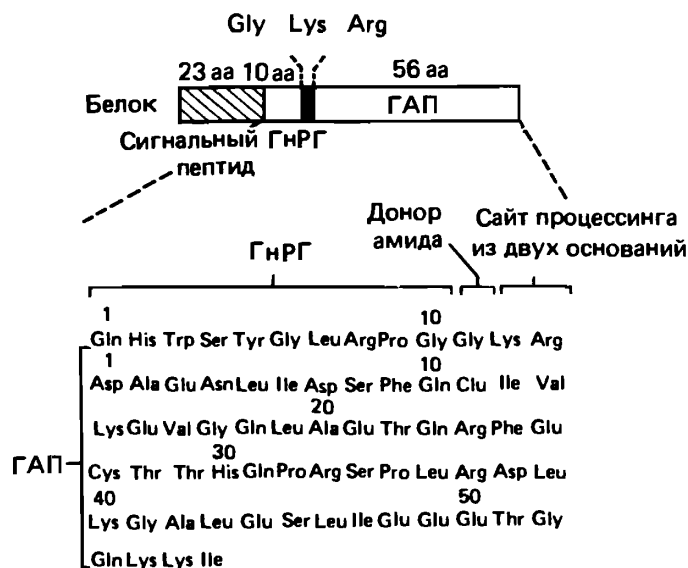


Рис. 45.1. Структура и аминокислотная последовательность плацентарной κ ДНК для препрогонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ). Белок состоит из трех доменов: сигнального пептида, ГнРГ и гонадолиберин-ассоциированного пептида (ГАП). В нижней части рисунка представлены аминокислотные последовательности ГнРГ и ГАП. Указан сайт ферментативного процессинга, приводящего к разделению двух молекул. Цифры обозначают положения в аминокислотной последовательности ГнРГ (1—10) и ГАП (1—56). (Reproduced with permission, from Nicolics K. et. al. A prolactin-inhibiting factor with the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 1986, 316, 511. Copyright 1985 by Macmillan Journals Ltd.)

считать пролактостатином. Существованием ГАП можно объяснить любопытную связь между секрецией гонадолиберина и пролактина, которая особенно выражена у некоторых видов.

Многие гипоталамические гормоны, в частности тиролиберин, кортиколиберин и соматостатин, обнаруживаются в других отделах нервной системы и в ряде периферических тканей. Концентрация соматостатина в поджелудочной железе выше, чем в гипоталамусе. Он образуется D-клетками островков Лангерганса и, по-видимому, регулирует секрецию глюкагона и инсулина. Кроме того, соматостатин входит в число более чем 40 пептидов, продуцируемых нейронами центральной и периферической нервной системы.

Посредником действия рилизинг-гормонов на аденогипофиз первоначально считали сАМР, однако недавние опыты с гонадолиберином и тиролиберином позволяют предположить участие в соответствующих процессах кальций-фосфолипидного механизма, подобного описанному выше (см. рис. 44.5). Вопрос о том, влияют ли рилизинг-гормоны помимо секреции и на синтез соответствующих гормонов гипофиза, остается спорным; недавно было показано, что соматолиберин повышает скорость транскрипции гена гормона роста, а тиролиберин оказывает аналогичное действие на ген пролактина.

ГОРМОНЫ ПЕРЕДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА

Передняя доля гипофиза продуцирует большое количество гормонов, стимулирующих различные физиологические и биохимические процессы в тканях-мишенях. Кроме того, гормоны, находящиеся в близком родстве с некоторыми гормонами передней доли гипофиза, синтезируются плацентой. По установившейся традиции эти гормоны рассматривались порознь, однако новые исследования механизма их синтеза и внутриклеточных посредников их действия позволяют объединить указанные гормоны в три общие группы: 1) группа, включающая гормон роста, пролактин и хорионический соматомаммотропин; 2) группа гликопротеиновых гормонов и 3) пептиды семейства проопиомеланокортина.

1. ГРУППА ГОРМОН РОСТА—ПРОЛАКТИН—ХОРИОНИЧЕСКИЙ СОМАТОМАММОТРОПИН

Гормон роста (ГР), пролактин (ПРЛ) и хорионический соматомаммотропин (ХС; плацентарный лактоген) представляют собой семейство белковых гормонов, обладающих значительной гомологией последовательностей. Их молекулы у разных видов насчитывают 190—199 аминокислотных остатков. Молекулы каждого из гормонов этой группы содержат один остаток триптофана (в положении 85 в ГР и ХС и в положении 91 в пролактине) и две гомологичные дисульфидные связи. Гомология аминокислотного состава ГР и ХС человека составляет 85%, а ГР и ПРЛ человека—35%. В связи с этим неудивительно, что все три гормона имеют общие антигенные детерминанты, обладают рост-стимулирующей и лактогенной активностью. Продуцируются они только определенными тканями: ГР и ПРЛ—передней долей гипофиза, ХС—синцитиотрофобластными клетками плаценты. Секреция каждого из них, по-видимому, находится под контролем собственного регуляторного механизма (см. ниже).

На основании сходства ГР, ПРЛ и ХС несколько лет назад была высказана гипотеза, согласно которой гены, детерминирующие синтез этих гормонов, возникли в результате дупликации одного гена-предшественника. С помощью метода генной инженерии установлено следующее: у приматов и человека существует несколько генов для ГР и ХС; единственный пролактиновый ген, кодирующий очень сходный белок, по размеру в 5 раз превосходит гены ГР и ХС; гены группы ГР—ХС локализованы у человека в хромосоме 17, а ген пролактина—в хромосоме 6; обнаружена заметная эволюционная дивергенция этих генов. В тканях крысы и крупного рогатого скота на гаплоидный геном приходится по одной ко-

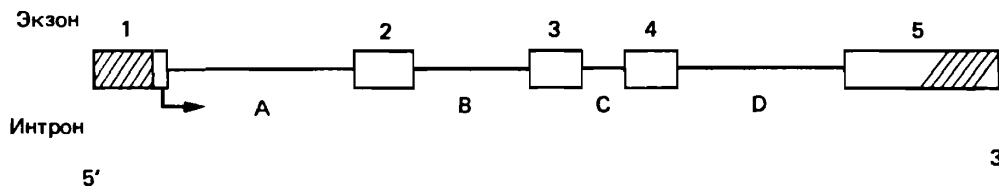


Рис. 45.2. Схематическое изображение структуры гена гормона роста человека. Ген имеет длину около 45 т. п. н. и состоит из 5 экзонов и 4 интронов. Заштрихованные участки обозначают некодирующие области в экзонах 1 и 5. Стрелки указывают направление транскрипции.

пии генов ГР и ПРЛ. У человека выявлен один пролактиновый ген, один функциональный ген гормона роста (ГР-N) и его вариант (ГР-V), кроме того, доказано существование двух экспрессируемых генов хорионического соматотропина (ХС-А и ХС-В) и одного неэкспрессируемого (ХС-Л). У некоторых видов обезьян имеется по меньшей мере 4 гена семейства ГР—ХС. Кодированная последовательность всех этих генов организована в 5 экзонов, прерываемых 4 интронами (рис. 45.2). Эти гены обладают высокой степенью гомологии в 5'-фланкирующих областях и в кодирующих последовательностях (в последнем случае ~93%-ная гомология) и обнаруживают дивергенцию в 3'-фланкирующих областях. Участки сплайсинга высококонсервативны, несмотря на значительно большую длину интронов в пролактиновом гене.

Семейство человеческих генов ГР—ХС локализовано в области q 22—24 длинного плеча хромосомы 17. На рис. 45.3 указаны относительные положения каждого из этих генов в ориентации от 5'- к 3'-положению. Гены транскрибируются в направлении 5'→3', и ГР-N отстоит от ХС-В примерно на 45 т. п. н.

Кодирующая последовательность ГР-N детерминирует аминокислотную последовательность циркулирующего ГР; этот ген чувствителен к ДНКазе I, что говорит о его локализации в зоне «активного хроматина». Ген ГР-V, если он экспрессируется, кодирует белок, отличающийся от ГР по 13 аминокислотам. Ген устойчив к ДНКазе I и поэтому может быть неактивным. Ген ГР-V обнаруживается у больных, у которых отсутствует ген ГР-N (наследственная недостаточность ГР); поскольку в таких случаях регистрируется отсутствие гормона роста, ген ГР-V либо является молчащим, либо образует неактивную молекулу ГР. Первое более вероятно, так как

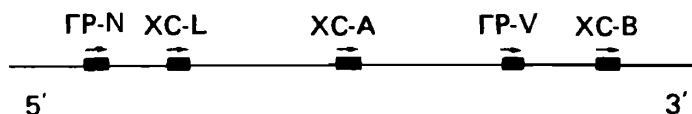


Рис. 45.3. Локализация и ориентация семейства генов ГР (гормона роста) — ХС (хорионического соматотропина) на хромосоме 17 человека. Относительные положения генов семейства ГР и ХС даны в ориентации от 5' к 3'.

Стрелки обозначают направление транскрипции.

в организме указанных больных образуются антитела к экзогенному ГР и, следовательно, их иммунная система не была ранее «знакомой» с этой молекулой.

Гены ХС-А и ХС-В экспрессируются в плаценте; ген ХС-Л является молчащим геном.

Гормон роста (ГР)

А. Синтез и структура. Гормон роста синтезируется в **соматотрофах**, которые составляют подкласс ацидофильных клеток гипофиза и являются наиболее многочисленной группой в этой железе. Концентрация ГР в гипофизе — 5—15 мг/г — значительно превышает содержание других гипофизарных гормонов (их количество исчисляется в мкг/г). Гормон роста у всех видов млекопитающих представляет собой одиночный пептид с молекулярной массой около 22 000. На рис. 45.4 представлена аминокислотная последовательность молекулы гормона роста человека (191 аминокислота). Несмотря на высокую степень гомологии последовательностей гормонов роста различных млекопитающих, в клетках человека активен только собственный гормон роста человека или ГР высших приматов.

Б. Регуляция секреции и синтеза. На секрецию ГР влияет ряд стимулов (сон, стресс), и она, подобно секреции многих гипофизарных гормонов, носит эпизодический и пульсирующий характер. В течение нескольких минут уровень ГР в плазме может измениться в 10 раз. Один из самых больших пиков отмечается вскоре после засыпания, что подтверждает поговорку: «Кто не спит, тот не растет». К другим стимулам относятся 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. Возможна связь этих и многих других эффекторов с основным физиологическим действием ГР, состоящим в сбережении глюкозы. При стрессе, гипогликемии, во время сна или голодания ГР стимулирует липолиз (поступление жирных кислот) и проникновение в клетки аминокислот (потенциальных субстратов глюконеогенеза), сберегая таким образом глюкозу для метаболизма мозга. Ключевую роль может играть внутриклеточ-

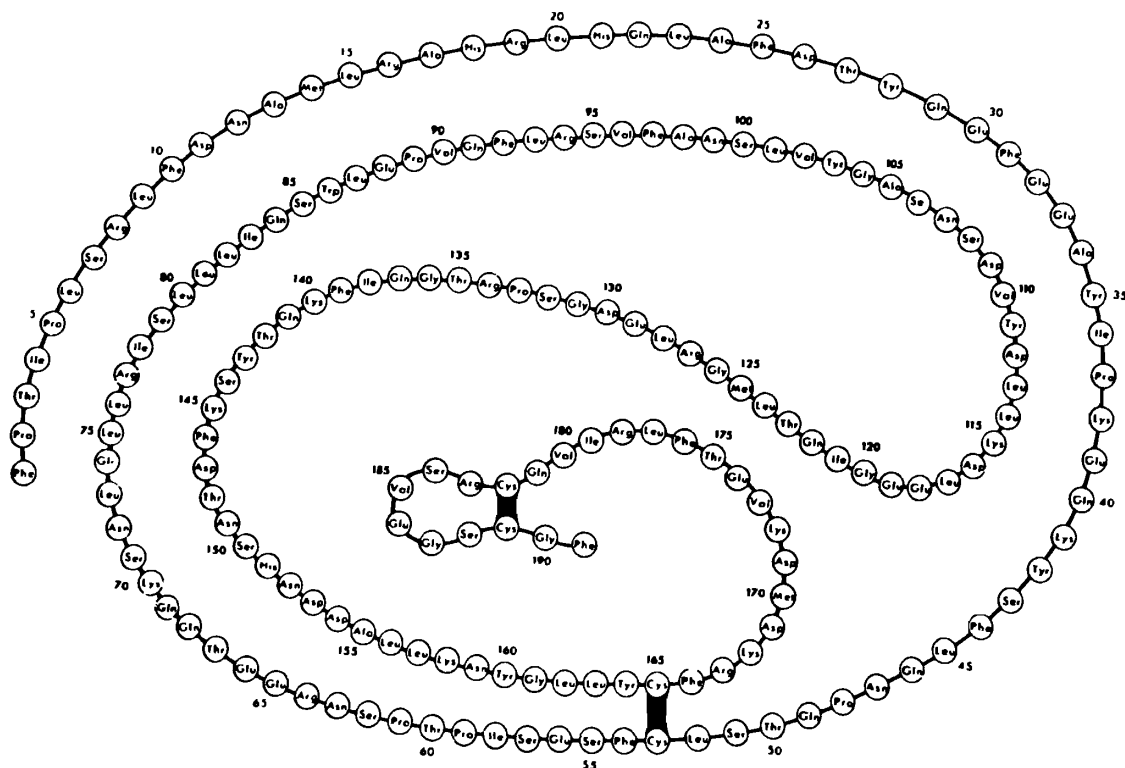


Рис. 45.4. Структура молекулы гормона роста человека. Цифры обозначают положение аминокислотных остатков, начиная с N-конца.

ная концентрация глюкозы (или ее метаболита) в регулирующей секрецию ГР области вентромедиального ядра гипоталамуса.

На высвобождение ГР оказывает влияние множество агентов, в том числе эстрогены, дофамин, α -адренергические соединения, серотонин, опиатные полипептиды, гормоны кишечника и глюкагон. Точкой приложения действия всех этих факторов является вентромедиальное ядро гипоталамуса, где осуществляется регуляция секреции гормона роста по типу обратной связи (рис. 45.5). **Короткая петля** системы включает положительный (стимулирующий) регулятор секреции—соматолиберин—и отрицательный (тормозящий) регулятор—соматостатин. **Периферическая петля** включает инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1, известный также как соматомедин С и сульфлирующий фактор).

Рост-стимулирующее действие ГР опосредуется в первую очередь ИФР-1, который образуется в печени. ИФР-1 регулирует секрецию ГР, подавляя высвобождение соматолиберина из клеток гипоталамусом и стимулируя высвобождение соматостатина. Ингибирование по короткой петле обратной связи обеспечивается самим ГР, тормозящим высвобождение соматолиберина. Этот гормон образуется в срединном возвышении и, как недавно было показано, стимулирует не только секрецию, но и транскрипцию гена ГР. Некоторые эффекты соматолиберина дублиру-

ются дофамином, который также повышает продукцию ГР.

Торможение секреции гормона роста осуществляется **соматостатином**, который, кроме того, подавляет секрецию глюкагона, инсулина, тиреотропина, фоллитропина, адренокортикотропина и многих других гормонов, но не влияет на высвобождение пролактина. Тетрадекапептид-соматостатин содержит дисульфидный мостик, но активен и в линейной, и в циклической форме (табл. 45.2). Соматостатин синтезируется как часть прогормона (мол. масса 11 500), обладающая такой же биологической активностью, что и 28-членный предшественник. Секрецию соматостатина повышают Ca^{2+} , Na^+ , гормоны щитовидной железы, сАМР и вазоактивный интестинальный пептид. Снижение секреции вызывают атропин, ацетилхолин и ГАМК (γ -аминомасляная кислота). Эффект ГАМК снимается пикротоксином и соединениями группы бензодиазепа. Механизм влияния этих агентов на высвобождение соматостатина и ГР гипоталамусом еще не выяснен. Поскольку соматостатин продуцируется целым рядом тканей, может существовать множество различных типов регуляции его синтеза и высвобождения.

По-видимому, соматостатин тормозит секрецию ГР, ингибируя мобилизацию кальция. Не ясно, осуществляется ли это благодаря изменению притока Ca^{2+} в клетку или в силу стабилизации его внутри-

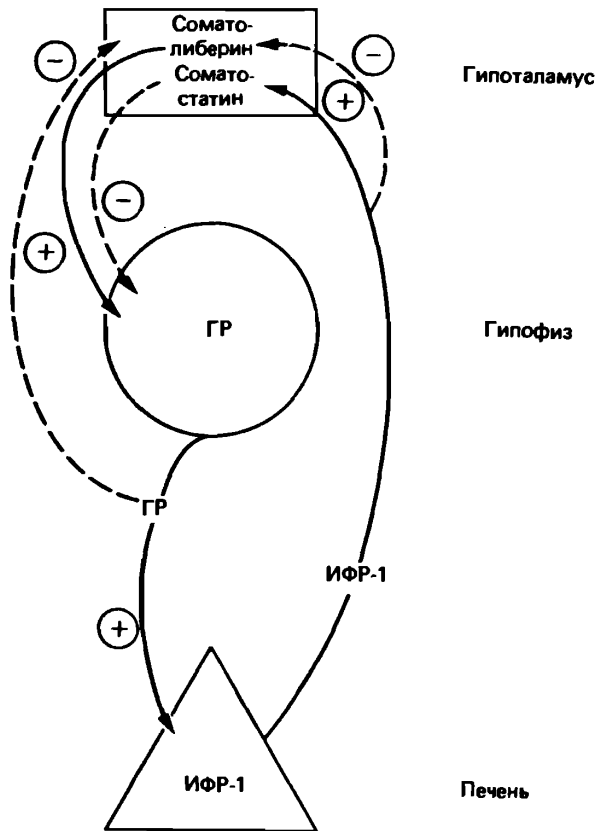


Таблица 45.3. Соотношение ГР, ИФР-1 и ИФР-2 при dwarfизме (карликовости)

	Содержание в плазме			Ответ на стимуляцию ГР
	ГР	ИФР-1	ИФР-2	
Карлики с дефицитом ГР	Низкое	Низкое	От низкого до нормального	Есть
Пигмеи	Нормальное	Низкое	Нормальное	Нет
Карлики Ларона	Высокое	Низкое	Низкое	Нет

ние ИФР-1 в плазме вдвое меньше содержания ИФР-2, именно ИФР-1 обнаруживает корреляцию с эффектами ГР. Лица с дефицитом ИФР-1, вырабатывающие ИФР-2 в достаточном количестве (см. табл. 45.3), лишены способности к нормальному росту.

1. Синтез белка. ГР стимулирует транспорт аминокислот в мышечные клетки и, кроме того, усиливает синтез белка, причем независимо от влияния на транспорт аминокислот. У животных, получающих ГР, возникает положительный азотный баланс, что отражает общее повышение белкового синтеза и снижение содержания аминокислот и мочевины в плазме и моче. Указанные изменения сопровождаются повышением уровня синтеза РНК и ДНК в отдельных тканях. В этом отношении действие ГР сходно с некоторыми эффектами инсулина.

2. Углеводный обмен. В плане влияния на углеводный обмен гормон роста является антагонистом инсулина. Гипергликемия, возникающая после введения ГР, — результат сочетания сниженной периферической утилизации глюкозы и ее повышенной продукции печенью в процессе глюконеогенеза. Действуя на печень, ГР увеличивает содержание в ней гликогена, вероятно, вследствие активации глюконеогенеза из аминокислот. ГР может вызывать нарушение некоторых стадий гликолиза, а также торможение транспорта глюкозы. Обусловлен ли данный эффект прямым действием ГР на транспорт или он является результатом подавления гликолиза, пока не установлено. Ингибирование гликолиза в мышцах может быть также связано с мобилизацией жирных кислот из триацилглицероловых резервов. При длительном введении ГР существует опасность возникновения сахарного диабета.

3. Липидный обмен. При инкубации жировой ткани с ГР *in vitro* усиливается высвобождение незэтерифицированных (свободных) жирных кислот и глицерола. Введение ГР *in vivo* вызывает быстрое (30–60 мин) повышение содержания свободных жирных кислот в крови и их окисления в печени. В условиях не-

Рис. 45.5. Схема регуляции секреции гормона роста по механизму обратной связи. Пунктирные линии обозначают ингибиторные эффекты, сплошные линии — стимулирующие эффекты. Описание см. в тексте.

клеточных резервов. Гормон также ингибирует отток K^+ , который может в свою очередь снижать приток Ca^{2+} .

В. Физиологические и биохимические эффекты. ГР необходим для постнатального роста и для нормализации углеводного, липидного, азотного и минерального обмена. Как упоминалось выше, ростовые эффекты ГР опосредуются главным образом ИФР-1, ген которого относится к семейству инсулиноподобных генов. Первоначально он был известен как «сульфирующий фактор» благодаря своей способности стимулировать включение сульфата в хрящ, позднее его стали называть соматомедин С. По структуре он сходен с проинсулином (см. гл. 51 и рис. 51.8). В плазме человека обнаруживается еще один родственный пептид — инсулиноподобный фактор роста 2 (ИФР-2). Его активность практически идентична той, которую по отношению к крысам называют «активностью, стимулирующей мультипликацию» (фактор АСМ). И ИФР-1, и ИФР-2 связываются с мембранными рецепторами, однако они могут быть разделены с помощью специфического радиоиммуноанализа. ИФР-1 состоит из 70 аминокислот, ИФР-2 — из 67. Несмотря на то что содержа-

достаточности инсулина (например, при диабете) может возрастет кетогенез. Эти эффекты так же, как и действие ГР на углеводный обмен, скорее всего не опосредуются ИФР-1.

4. Минеральный обмен. ГР или, что более вероятно, ИФР-1 способствует положительному 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 и образование хряща.

5. Прولاктиноподобные эффекты. ГР связывается с лактогенными рецепторами и поэтому обладает многими свойствами пролактина, в частности способностью к стимуляции молочных желез, лактогенеза и роста зоба у голубей.

Г. Патопфизиология. Недостаточность ГР, обусловленная пангипопитуитаризмом или только отсутствием самого ГР, особенно опасна у детей, поскольку нарушает их способность к нормальному росту. Другие метаболические последствия этой недостаточности менее опасны. Значение различных аспектов действия ГР наглядно иллюстрирует существование разных видов карликовости (табл. 45.3). Карлики с дефицитом ГР нормально реагируют на экзогенный ГР. Описаны два типа резистентности органов-мишеней к гормону. При карликовости Ларона присутствуют избыточные количества ГР-N, но отсутствуют рецепторы ГР в печени. У пигмеев, по-видимому, имеет место пострецепторный дефицит в действии ГР, вследствие чего сохраняются только опосредованные ИФР-1 эффекты гормона.

Если избыток ГР (обусловленный обычно ацидофильной опухолью гипофиза) возникает до зарастания эпифизарных щелей (когда еще возможен ускоренный рост длинных костей), у больного развивается гигантизм. Если же избыточная секреция ГР начинается после зарастания эпифизарных щелей и прекращения роста длинных костей, наблюдается акромегалия. Акральный рост костей приводит к характерным изменениям лица (выступающая челюсть, огромный нос) и увеличению размеров кистей, стоп и черепа. Другие симптомы включают разрастание внутренних органов, истончение кожи и различные метаболические расстройства, в том числе сахарный диабет.

Понимание механизмов регуляции секреции ГР помогает анализировать результаты клинических тестов, применяемых для диагностики перечисленных нарушений. Больные с дефицитом ГР утрачивают способность к повышению его уровня в ответ на индуцированную гипогликемию, введение аргинина или лево-ДОФА. У больных с обусловленным опухолью избытком ГР (гигантизм или акромегалия) не происходит уменьшения количества гормона при введении глюкозы.

Проллактин (ПРЛ: лактогенный гормон, маммотропин, лютеотропный гормон)

А. Синтез и структура. Проллактин (ПРЛ) — белковый гормон с мол. массой около 23 000; его первичная структура представлена на рис. 45.6. Проллактин секретируется лактотрофами — ацидофильными клетками передней доли гипофиза. Количество и размеры этих клеток возрастают в период беременности. О сходстве в структуре и функции между пролактином, гормоном роста и хорионическим соматомаммотропином уже говорилось выше.

Б. Регуляция секреции. Раннее и важное наблюдение, сделанное в ходе изучения регуляции секреции пролактина, заключалось в том, что этот процесс в отличие от секреции других гормонов гипофиза усиливается при помещении железы вне турецкого седла или при полном пересечении ножки гипофиза. Отсюда следует, по-видимому, что секреция пролактина может находиться под тоническим ингибиторным контролем со стороны гормона, тормозящего его высвобождение (пролактостатина), и этим гормоном, вероятно, является дофамин. Гипофизарные клетки обладают рецепторами дофамина; дофамин снижает секрецию пролактина и подавляет транскрипцию пролактинового гена, возможно, путем уменьшения уровня cAMP. Лево-ДОФА, используемый в клинике предшественник дофамина, ингибирует секрецию пролактина и в то же время стимулирует секрецию ГР. В торможении секреции пролактина участвует и гонадолиберин-ассоциированный пептид (ГАП; рис. 45.2). Что касается положительной регуляции секреции пролактина, то наличие пролактин-высвобождающего гормона (пролактолиберина) нельзя считать твердо установленным. Уровень пролактина возрастает на поздних сроках беременности и при лактации. Физиологическим индуктором секреции пролактина является раздражение грудных сосков, процесс секреции активируют также стресс, сон и сексуальные контакты.

В. Физиологическое и биохимическое действие. Проллактин участвует в инициации и поддержании лактации у млекопитающих. В физиологических количествах он влияет на ткань молочной железы только тогда, когда она испытывает действие женских половых гормонов. Однако в избыточных количествах пролактин может стимулировать развитие железы у овариэктомированных самок, а также у самцов. У грызунов пролактин способен поддерживать существование желтых тел — отсюда название «лютеотропный гормон». Родственные ему молекулы, по-видимому, обеспечивают адаптацию морских рыб к пресной воде, линьку рептилий и продукцию молока зобом птиц. Внутриклеточный медиатор действия пролактина неизвестен. Высказано

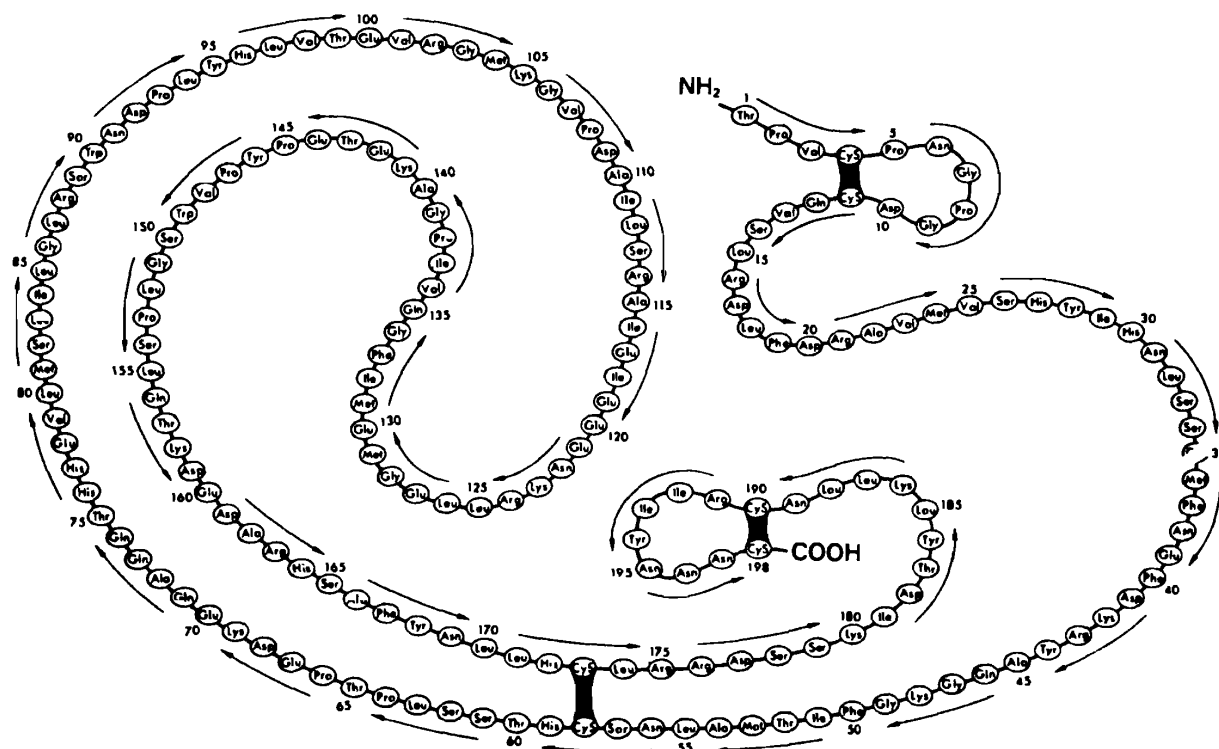


Рис. 45.6. Структура овечьего пролактина.

предположение о существовании пептида, выполняющего функцию такого медиатора, но это предположение не проверено.

Г. Патофизиология. Опухоли, состоящие из пролактин-секретирующих клеток, вызывают у женщин **амеорею** (прекращение менструаций) и **галакторею** (истечение молока из грудных желез). С избытком пролактина связаны **гинекомастия** (увеличение грудных желез) у женщин и **импотенция** у мужчин.

Хорионический соматомаммотропин (ХС; плацентарный лактоген)

Этот последний член семейства ГР—ПРЛ—ХС не выполняет у человека строго определенной функции. При биологических испытаниях он проявляет лактогенную и лютеотропную активность, а его метаболические эффекты качественно сходны с действием гормона роста, включая торможение поглощения глюкозы, стимуляцию высвобождения свободных жирных кислот и глицерола, усиление задержки азота и кальция (несмотря на повышение выделения кальция с мочой), а также снижение мочевого экскреции фосфора и калия. ХС может поддерживать рост развивающегося плода, однако и в тех случаях, когда ни у плода, ни в плаценте нет генов группы ГР—ХС (кроме генов ГР-N и ХС-L), внутриутробное развитие плода и рост младенца в неонатальном периоде протекают нормально. Поскольку

ген ХС-L у человека не экспрессирован, возможный источник ХС у таких лиц отсутствует.

2. ГРУППА ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ

Наиболее сложные из известных до сих пор белковых гормонов—это гликопротеиновые гормоны гипофиза и плаценты: **тиреотропный гормон** (тиреотропин; ТТГ), **лютеинизирующий гормон** (лютропин; ЛГ), **фолликулостимулирующий гормон** (фоллитропин; ФСГ) и **хорионический гонадотропин** (ХГ). Все они влияют на различные биологические процессы и в то же время обладают выраженным структурным сходством. Эта группа гормонов присутствует у всех млекопитающих, гормоны со сходным действием найдены и у более низких форм, а молекулы с активностью ТТГ и ХГ человека (ХГЧ) обнаружены у бактерий. Перечисленные соединения, подобно другим пептидным и белковым гормонам, взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности и активируют аденилатциклазу; таким образом, они используют сАМР в качестве внутриклеточного медиатора.

Каждый из рассматриваемых гормонов состоит из двух субъединиц, α и β , соединенных нековалентной связью. α -Субъединицы всех гормонов идентичны в пределах вида, кроме того, имеет место значительная межвидовая их гомология. Специфическая биологическая активность определяется β -

субъединицей, которая также обладает высокой консервативностью в составе разных гормонов, но все же значительно меньшей, чем α -субъединица. Сама по себе β -субъединица неактивна, и рецепторное распознавание включает взаимодействие с определенными участками обеих субъединиц. Межмолекулярные и межвидовые молекулярные гибриды полностью сохраняют активность; например, гибрид ТТГ_а—ЛГ_б обладает активностью ЛГ, а гибрид ТТГ_а человека—ТТГ_б мыши—активностью мышинного ТТГ. Таким образом, видовые различия α - и β -субъединиц не отражаются на их способности к ассоциации и на биологической функции домена β -субъединицы. Каждая субъединица синтезируется при участии своей мРНК, производной отдельного гена. Можно полагать, что все гормоны данной группы образовались на основе общего гена-предшественника, давшего две молекулы, α и β , последняя из которых обеспечила в дальнейшем возникновение различных гормонов.

О структуре этих соединений известно довольно много. Например, известно, что С-концевой пептид α -субъединицы важен для рецепторного связывания, но не для ассоциации с β -субъединицей. Отличительной особенностью гормонов гликопротеиновой группы является гликозилирование их молекул. В каждом гликопротеиновом гормоне α -субъединица содержит два, а β -субъединица—один или два связанных с аспарагином сложных олигосахарида. Возможно, что гликозилирование необходимо для взаимодействия α - и β -субъединиц. В составе α -субъединицы присутствует 5, а β -субъединицы—6 S—S-связей.

В гипофизе и плаценте найдены свободные α -субъединицы. Установлено, что трансляция α - и β -субъединиц осуществляется разными мРНК, и это подтверждает концепцию о раздельной регуляции их синтеза и о лимитирующей роли β -субъединицы в образовании целого гормона. Все молекулы синтезируются как препрогоны и подвергаются в клетке посттрансляционному процессингу с образованием гликозилированных белков.

Гонадотропины (ФСГ, ЛГ, ХГ)

Эти гормоны обеспечивают гаметогенез и стероидогенез в половых железах. Все они являются гликопротеинами с мол. массой около 25 000.

А. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фолитропин). ФСГ связывается со специфическими рецепторами на плазматических мембранах клеток-мишеней: фолликулярных клеток яичников и клеток Сертоли в семенниках. При этом имеет место активация аденилатциклазы и повышенное образование сАМР. ФСГ стимулирует рост фолликулов, подготавливает их к индуцирующему овуляцию действию ЛГ и усиливает вызываемую ЛГ секрецию эстроге-

нов. У самцов он связывается с клетками Сертоли, индуцируя в них синтез андроген-связывающего белка, который, по-видимому, участвует в транспорте тестостерона к семявыносящим каналам и эпидидимису (придатку яичка); благодаря этому механизму достигается высокая локальная концентрация тестостерона, требующаяся для сперматогенеза. ФСГ стимулирует рост семенных канальцев и семенников и играет важную роль в инициации сперматогенеза. В отсутствие ФСГ семенники атрофируются и образования спермы не происходит. Гормон также усиливает синтез эстрадиола в изолированных клетках Сертоли. Роль этого процесса в физиологии мужского организма неясна. Концентрация ФСГ в плазме низка у детей и возрастает в ходе полового созревания. Появление пульсирующей секреции ФСГ и ЛГ, в особенности во время сна, свидетельствует о вступлении организма в период полового созревания. Содержание ФСГ у самок изменяется циклически, причем пик во время овуляции или совсем незадолго до нее в 10 раз превышает базальный уровень.

Б. Лютеинизирующий гормон (ЛГ, лютропин). ЛГ связывается со специфическими рецепторами плазматических мембран и стимулирует образование прогестерона клетками желтых тел и тестостерона клетками Лейдига. Роль внутриклеточного сигнала действия ЛГ играет сАМР. Этот нуклеотид имитирует действие ЛГ, которое заключается в усилении превращения ацетата в сквален (предшественник в синтезе холестерина) и в повышении образования 2 α -гидроксистерола из холестерина, представляющего собой необходимый этап биосинтеза прогестерона и тестостерона. Отмечается тесное сопряжение между связыванием ЛГ и продукцией сАМР, однако стероидогенез происходит и при очень небольшом увеличении концентрации сАМР. Следовательно, в этой реакции участвуют резервные рецепторы (см. рис. 43.3). Длительное воздействие ЛГ приводит к десенситизации, обусловленной, вероятно, понижающей регуляцией рецепторов ЛГ.

Зависимый от эстрадиола пик секреции ЛГ в середине цикла индуцирует овуляцию у женщин, при этом ЛГ требуется для поддержания желтого тела, представляющего собой трансформированный фолликул, который наряду с эстрадиолом начинает вырабатывать прогестерон. После оплодотворения и имплантации яйцеклетки функция ЛГ переходит к гормону плаценты хорионическому гонадотропину (ХГ). В течение первых 6—8 нед беременность поддерживается желтым телом, затем сама плацента начинает вырабатывать прогестерон в количестве, достаточном для продолжения беременности, но продукция ХГ при этом продолжается.

У самцов ЛГ повышает образование тестостерона, который совместно с ФСГ стимулирует сперматогенез. Системные эффекты гормона включают развитие вторичных половых признаков, развитие

и поддержание аксессуарных половых органов, в том числе простаты, семявыносящих протоков и семенных пузырьков.

В интерстициальных клетках негерминативных тканей яичника ЛГ может индуцировать образование ряда андрогенов и их предшественников, в частности андростендиона, дегидроэпиандростерона и тестостерона. У больных с **поликистозом яичников** (синдром Штейна—Левенталю) отмечается повышенный уровень ЛГ, увеличенная продукция андрогенов, снижение фертильности, увеличение массы тела и усиленный рост волос на теле и лице. Предполагают, что этот синдром обуславливается гиперактивностью яичниковой струмы.

В. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). ХГЧ представляет собой гликопротеин, синтезируемый клетками синцитиотрофобласта плаценты. Он имеет структуру $\alpha\beta$ -димера, характерную для данной группы гормонов, и наиболее близок к ЛГ. Содержание ХГЧ в крови и моче возрастает вскоре после имплантации (см. выше), и поэтому его определение лежит в основе многих методов диагностики беременности.

Г. Регуляция секреции ЛГ и ФСГ. Секреция ЛГ и ФСГ регулируется стероидными половыми гормонами по классической петле отрицательной обратной связи. Длительное введение половых гормонов подавляет секрецию ЛГ и ФСГ. Кастрация или физиологическая атрофия яичников в период менопаузы сопровождаются гиперсекрецией обоих гонадотропинов. Регуляция их секреции может осуществляться и по механизму положительной обратной связи: эстрадиол (у некоторых видов—прогестерон или 20 α -гидроксипрогестерон) вызывает или «разрешает» овуляторный подъем высвобождения ЛГ. Секреция ЛГ и ФСГ носит эпизодический характер, что особенно наглядно проявляется во время пубертатного периода. Среднее содержание обоих гормонов в плазме сильно варьирует, демонстрируя пики в середине менструального цикла.

Высвобождение ЛГ и ФСГ регулируется одним и тем же гипоталамическим фактором, называемым **гонадотропин-рилизинг-гормоном (ГнРГ, гонадолиберин)**. Он представляет собой декапептид, N-концевая аминокислота которого, пироглутамат, является циклизированным производным глутамата (табл. 45.2). Высвобождение гонадолиберина тормозится гормонами органов-мишеней тестостероном и эстрадиолом, а также эндорфином. Гонадолиберин оказывает прямое действие на переднюю долю гипофиза, стимулируя секрецию гонадотропинов с помощью кальций-фосфолипид-зависимого механизма. Хотя для ФСГ и ЛГ не найдено отдельных рилизинг-факторов, концентрация обоих гонадотропинов в плазме не всегда изменяется параллельно. У мужчин с нарушением сперматогенеза на стадиях, следующих за образованием вторичных спермато-

цитов, отмечается повышенный уровень ФСГ. Эти и другие данные позволили предположить существование тестикулярного фактора, который подавляет высвобождение ФСГ (он назван ингибином). В настоящее время ингибин очищен и его физиологическая роль доказана. Различные аналоги гонадолиберина испытывают на их способность стимулировать фертильность или, наоборот, оказывать контрацептивный эффект.

Тиреотропный гормон (ТТГ, тиреотропин)

А. Структура и механизм действия. Тиреотропный гормон представляет собой гликопротеин с $\alpha\beta$ -димерной структурой и мол. массой около 30 000. Подобно другим гормонам данной группы, он связывается с рецепторами плазматических мембран и активирует аденилатциклазу. Последующее увеличение уровня сАМР обуславливает действие ТТГ на биосинтез тиреоидных гормонов. Менее ясна связь сАМР с трофическими воздействиями ТТГ на щитовидную железу.

Тиреотропин оказывает существенное влияние на функцию щитовидной железы. Эффекты, вызываемые им (их время исчисляется минутами), включают стимуляцию всех стадий биосинтеза трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4), в том числе концентрирование и органификацию иодида, конденсацию иодтиронинов и гидролиз тиреоглобулина. Наряду с этим ТТГ вызывает в щитовидной железе и хронические эффекты, для проявления которых требуется несколько дней. К ним относятся повышение синтеза белков, фосфолипидов и нуклеиновых кислот, увеличение размеров и количества тиреоидных клеток. Долговременные метаболические эффекты ТТГ обуславливаются образованием и действием тиреоидных гормонов.

Б. Регуляция секреции ТТГ. Высвобождение ТТГ регулируется системой отрицательной обратной связи, которая включает гормоны железы-мишени (трийодтиронин и тироксин), а также гипоталамическим тиреотропин-рилизинг-гормоном (ТРГ). Схема регуляции детально представлена на рис. 46.4.

ТРГ (тиролиберин)—нейтральный трипептид, состоящий из пироглутаминовой кислоты, гистидина и пролинамида (табл. 45.2). Он не имеет видовой специфичности; химическое метилирование гистидинового остатка в третьем положении приводит к восьмикратному повышению активности ТРГ. Этот гормон стимулирует секрецию ТТГ и увеличивает уровень сАМР уже на первой минуте, однако его действие, по-видимому, теснее связано с Ca^{2+} -фосфолипид-зависимым механизмом, как это имеет место и в случае ГнРГ (гонадолиберина). Продолжительное воздействие ТРГ на клетки также приводит к их десенситизации.

Тиролиберин, подобно соматостатину, присутствует во многих тканях вне гипоталамуса, где он

может служить нейромедиатором. Этот гормон применяют при гипотиреозе для разграничения гипофизарной или гипоталамической природы заболевания: в последнем случае больные реагируют на экзогенный тиролиберин повышением секреции тиреотропина, тогда как при гипотиреозе гипофизарного происхождения такая реакция отсутствует. В связи с быстрым исчезновением из плазмы ($t_{1/2} \sim 4$ мин) тиролиберин (ТРГ) не используется для длительной терапии.

3. СЕМЕЙСТВО ПЕПТИДОВ ПРООПИОМЕЛАНКОРТИНА (ПОМК)

Это семейство состоит из пептидов, действующих либо как гормоны (адренотропикотропин, липотропин, меланоцит-стимулирующий гормон), либо как нейромедиаторы или нейромодуляторы. Проопиомеланокортин (ПОМК) синтезируется в виде молекулы предшественника, состоящей примерно из 285 аминокислотных остатков, и подвергается различному процессингу в разных отделах гипофиза.

Распределение, процессинг и функции продуктов гена ПОМК

Ген ПОМК экспрессируется в передней и промежуточной долях гипофиза. Наиболее консервативные последовательности, сохраняющиеся у разных видов, локализируются в N-концевом фрагменте, кодирующем АКТГ и β -эндорфин. ПОМК или родственные ему продукты присутствуют во многих других тканях позвоночных, включая мозг, плаценту, желудочно-кишечный тракт, половой тракт, легкие и лимфоциты. Это обуславливается главным образом экспрессией гена ПОМК в указанных тканях, а не поглощением продуктов гена из плазмы; однако такой механизм можно считать доказанным только для мозга, плаценты и семенников. Родственные пептиды найдены также у многих видов беспозвоночных.

Процессинг белка ПОМК в передней и промежуточной долях гипофиза протекает по-разному. У взрослых людей промежуточная доля рудиментарна, но она активна у плодов человека, женщин в поздние сроки беременности, а также у многих видов животных. Процессинг белка ПОМК в периферических тканях (кишечник, плацента, мужской половой тракт) сходен с таковым в промежуточной доле гипофиза. Существуют три основные группы пептидов семейства ПОМК: 1) АКТГ, из которого могут образовываться меланоцит-стимулирующий гормон (α -МСГ) и кортикотропиноподобный пептид промежуточной доли; 2) β -липотропин (β -ЛПГ), служащий предшественником α -липотропина, β -МСГ и β -эндорфина и, следовательно, α - и γ -эндорфинов; 3) большой N-концевой пептид, из которого обра-

зуется γ -МСГ. Разнообразие этих продуктов обусловлено наличием множественных кластеров двух основных аминокислот, которые представляют собой потенциальные участки расщепления для трипсиноподобных ферментов. Каждому из упомянутых пептидов предшествуют остатки Lys-Arg, Arg-Lys, Arg-Arg или Lys-Lys. Сегмент прогормона отщепляется и подвергается посттрансляционной модификации путем гликозилирования, ацетилирования и фосфорилирования. Следующее расщепление продуктов ПОМК в передней и промежуточной доле гипофиза происходит на участке между АКТГ и β -ЛПГ, что приводит к отделению N-концевого пептида, включающего АКТГ, от β -ЛПГ (рис. 45.7). АКТГ₁₋₃₉ затем отделяется от N-концевого пептида, дальнейших расщеплений в передней доле гипофиза практически не происходит. В промежуточной доле АКТГ₁₋₃₉ расщепляется на α -МСГ (остатки 1—13) и кортикотропиноподобный пептид (18—39); β -липотропин (42—134) превращается в γ -липотропин (42—101) и β -эндорфин (104—134); β -МСГ (84—101) образуется из γ -липотропина.

Перечисленные пептиды претерпевают множество дополнительных модификаций. Большая часть N-концевого пептида и АКТГ₁₋₃₉ находится в передней доле гипофиза в гликозилированном состоянии. α -МСГ обнаруживается преимущественно в N-ацетилированной и амидированной с C-конца форме; деацетилированный α -МСГ намного менее активен. β -Эндорфин в промежуточной доле быстро ацетируется; ацетилированный β -эндорфин в противоположность α -МСГ обладает в 1000 раз меньшей активностью, чем немодифицированная форма. Таким образом, β -эндорфин может находиться в гипофизе в неактивном состоянии. В гипоталамусе молекулы этого пептида не ацетилированы и, по-видимому, присутствуют в активной форме. β -Эндорфин подвергается также укорочению с C-конца с образованием λ - и γ -эндорфинов (рис. 45.7). Таковы три главных эндорфина в промежуточной доле гипофиза грызунов. Большой N-концевой фрагмент, вероятно,

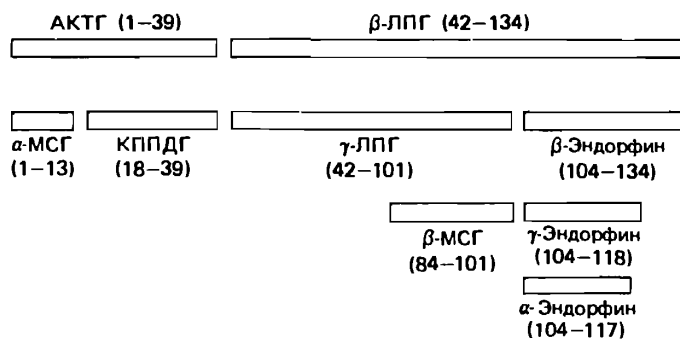


Рис. 45.7. Продукты расщепления проопиомеланокортина (ПОМК). МСГ — меланоцит-стимулирующий гормон; КПИДГ — кортикотропиноподобный пептид промежуточной доли гипофиза; ЛПГ — липотропин.

тоже подвергается множественному расщеплению, но о его судьбе известно меньше, хотя в гипофизах крысы и крупного рогатого скота найден γ -МСГ. Изложенные сведения о структуре пептидов получены главным образом при исследованиях гипофиза грызунов, но общая схема превращений, по-видимому, верна и для других видов.

Функции большинства пептидов семейства ПОМК точно не установлены. Постулированные для них эффекты перечислены в табл. 45.4.

Регуляция синтеза ПОМК

ПОМК синтезируются приблизительно 5% клеток передней доли гипофиза и всеми клетками промежуточной доли. Регуляция синтеза и секреции ПОМК в этих отделах гипофиза сильно различаются.

А. Передняя доля. Кортикотропин-рилизинг-гормон (КРГ, кортиколиберин) является основным фактором, регулирующим высвобождение ПОМК из передней доли гипофиза. Он действует через сАМР-опосредованную систему, требующую присутствия Ca^{2+} . Стимулирующий эффект кортиколиберина на секрецию ПОМК непосредственно прерывается глюкокортикоидными гормонами. Глюкокортикоиды могут также оказывать влияние на гипоталамус, ингибируя образование кортиколиберина, его секрецию или оба этих процесса. Адреналэктомия (которая уменьшает количество глюкокортикоидов и повышает уровень КРГ) сопровождается 20-кратным увеличением транскрипции гена ПОМК. Одновременное введение глюкокортикоидов может, однако, уменьшить этот прирост, причем тормозящее действие глюкокортикоидов, по-видимому, осуществляется через специфические рецепторы. Ингибирование секреции АКТГ глюкокортикоидами происходит быстрее, чем воздействие на транскрипцию гена ПОМК, поэтому можно предположить, что эти эффекты опосредуются независимыми механизмами. Минорные эффекты на секрецию ПОМК (АКТГ) передней долей включают прямую стимуляцию процесса вазопрессинном и α -адренергическими агентами, непрямую стимуляцию (через центральную нервную систему) серотонином и ацетилхолином и торможение γ -аминомасляной кислотой (ГАМК). Дофамин на секрецию ПОМК не влияет.

Б. Промежуточная доля. Эта доля гипофиза бедна кровеносными сосудами; гипоталамо-гипофизарная портальная система ее не достигает, и поэтому на нее не влияет кортиколиберин. В промежуточной доле нет рецепторов глюкокортикоидов, что исключает участие этих гормонов в регуляции продукции ПОМК. Промежуточная доля гипофиза обильно иннервирована дофаминергическими волокнами и, кроме того, содержит серотонинергические и катехо-

Таблица 45.4. Функции пептидов ПОМК

Пептид	Функция
АКТГ	Стимуляция роста надпочечников и продукции стероидов ¹⁾
α -МСГ	Влияние на распределение меланина у амфибий ¹⁾ ; влияние на обучение и половое поведение; влияние на рост и функцию клеток Сертоли семенников
β -ЛПГ	Стимуляция липолиза и мобилизации жирных кислот
β -Эндорфин	Обезболивание ¹⁾ ; влияние на поведение (питание, эмоции, обучение); регуляция температуры тела и кровяного давления; стимуляция сокращений мышц полового тракта
N-Концевой фрагмент	Усиление действия АКТГ на стероидогенез

¹⁾ Установленные функции.

ламинергические нервные окончания. Агонисты дофамина (эргокриптин) снижают, а антагонисты (галоперидол) повышают количество мРНК ПОМК и секрецию пептидов ПОМК. Время и степень этих изменений предполагают наличие сопряжения между образованием и секрецией пептидов. Указанные вещества не влияют на переднюю долю гипофиза. Высвобождение ПОМК в промежуточной доле стимулируется серотонином и β -адренергическими агентами.

В. Другие ткани. О регуляции продукции ПОМК в других тканях известно мало. На нее не влияют гипофизэктомия, адреналэктомия, кортиколиберин и глюкокортикоиды. Хронический стресс (иммобилизация) повышает содержание АКТГ в плазме и снижает его в гипофизе, но в мозге количество ПОМК при этом не меняется. В то же время острый стресс приводит к уменьшению количества β -эндорфина в гипоталамусе. Высвобождение β -эндорфина из гипоталамуса может стимулироваться эстрогенами.

Действие и регуляция специфических пептидов

А. Адrenокортикотропный гормон (АКТГ):

1. Структура и механизм действия

АКТГ представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 39 аминокислот (рис. 45.8) и регулирующий рост и функцию коры надпочечников. Для полного проявления биологической активности гормона необходимы 24 N-концевые аминокислоты, которые тождественны у разных видов; 16 C-концевых аминокислот значительно варьируют.

Синтетический аналог АКТГ₁₋₂₄ широко применяется для диагностики.

АКТГ повышает синтез и секрецию стероидов надпочечников, усиливая превращение холестерина в прегненолон. Эта стадия включает образование С₂₁-стероида из С₂₇-стероида путем отщепления 6-углеродной боковой цепи. Поскольку прегненолон служит предшественником всех стероидов надпочечников (см. рис. 48.3), длительная стимуляция АКТГ приводит к избыточному образованию глюкокортикоидов, минералокортикоидов и дегидроэпиандростерона (предшественника андрогенов). Однако в физиологических условиях вклад АКТГ в образование стероидов двух последних классов минимален. АКТГ стимулирует рост коры надпочечников (трофический эффект), повышая синтез белка и РНК.

Подобно другим пептидным гормонам, АКТГ связывается с рецепторами плазматических мембран. В течение нескольких секунд гормон-рецепторного взаимодействия происходит значительное увеличение уровня внутриклеточного сАМР. Аналоги сАМР имитируют действие АКТГ, причем этот эффект осуществляется с участием кальция.

АКТГ активирует аденилатциклазу в жировых клетках, в результате происходит сАМР-опосредованная активация липазы и усиление липолиза. Кроме того, АКТГ стимулирует секрецию инсулина поджелудочной железой, однако эти вненадпочечниковые эффекты невелики и требуют сверхфизиологических концентраций гормона.

2. Регуляция

Образование АКТГ из белка-предшественника ПОМК и регуляция синтеза и секреции последнего

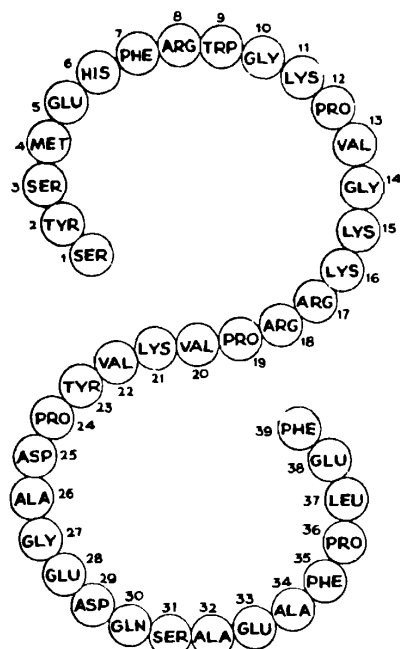


Рис. 45.8. Структура человеческого АКТГ.

рассматривались выше. Основная регуляция осуществляется по петле отрицательной обратной связи, включающей глюкокортикоиды и кортиколиберин. Избыточные количества АКТГ и сами могут тормозить продукцию кортиколиберина по механизму «короткая петля». Важная роль в регуляции образования и секреции АКТГ принадлежит центральной нервной системе. В регуляции этого типа принимает участие ряд нейромедиаторов, в том числе норадреналин, серотонин и ацетилхолин. Скорее всего именно нейромедиаторы опосредуют стрессорную реакцию со стороны АКТГ, который стимулирует продукцию глюкокортикоидов, необходимых для адаптации к таким воздействиям, как гипогликемия, хирургическая операция, физическая или эмоциональная травма, эффекты холода и пирогенов.

3. Патофизиология

В результате избыточного образования АКТГ гипофизом или его эктопического образования опухолью развивается синдром Кушинга. Слабое МСГ-подобное действие АКТГ, а также секреция β- или α-МСГ приводят к повышенной пигментации кожи. Возникающие метаболические нарушения обусловлены гиперпродукцией стероидов надпочечников, к ним относятся 1) отрицательный азотный, калиевый и фосфорный баланс; 2) задержка натрия, которая может привести к повышению артериального давления и отекам; 3) нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет; 4) повышение содержания жирных кислот в плазме; 5) уменьшение количества эозинофилов и лимфоцитов в крови при увеличении количества полиморфноядерных лейкоцитов. У больных с синдромом Кушинга может наблюдаться атрофия мышц и специфическое перераспределение жира с его отложением на туловище. Отсутствие АКТГ, связанное с опухолью, инфекцией или инфарктом гипофиза, вызывает противоположные сдвиги.

Б. β-Липотропин (β-ЛПГ). Этот пептид состоит из 91 аминокислотного остатка С-конца ПОМК (рис. 45.7). β-ЛПГ содержит последовательности β-МСГ, γ-липотропина, мет-энкефалина и β-эндорфина. В гипофизе человека найдены β-липотропин, γ-липотропин и β-эндорфин; β-МСГ не обнаружен. β-Липотропин характерен только для гипофиза, потому что в других тканях он быстро превращается в γ-липотропин и β-эндорфин. β-ЛПГ содержит 7-членную аминокислотную последовательность (β-ЛПГ₄₇₋₅₃), идентичную фрагменту АКТГ₄₋₁₀ (рис. 45.9). β-Липотропин стимулирует липолиз и мобилизацию жирных кислот, но его физиологическая роль невелика. По-видимому, он имеет значение только как предшественник β-эндорфина.

В. Эндорфины. β-Эндорфин представляет собой С-концевой участок β-липотропина (31 аминокислотный остаток с С-конца) (рис. 45.7). Для образования α- и γ-эндорфинов требуется отщепление от С-

-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-

АКТГ 2-12

-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-

β-ЛПГ 45-55

Рис. 45.9. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагментов молекул АКТГ и β-липотропина (β-ЛПГ). Подчеркнутые остатки указывают на различия между молекулами. Молекула АКТГ состоит из 39 аминокислот, β-липотропин включает 91 аминокислоту.

конца β-эндорфина соответственно 15 или 14 аминокислот. Эти пептиды обнаруживаются в гипофизе, где они находятся в ацетилированной форме и, по-видимому, неактивны. В других местах (например, в нейронах центральной нервной системы) они присутствуют в немодифицированном виде и поэтому, вероятно, могут служить нейромедиаторами или нейромодуляторами. Эндорфины связываются с теми же рецепторами центральной нервной системы, что и морфиновые опиаты, и могут играть роль в эндогенной регуляции чувствительности к боли. Они обладают более высокой активностью (при расчете на молекулу — в 18—30 раз), чем морфин. Последовательность энкефалина содержится в ПОМК, но ей не предшествуют двухосновные аминокислоты, и она, по-видимому, не отщепляется и не экспрессируется.

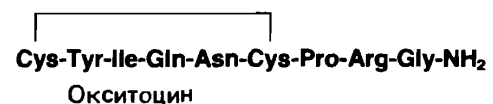
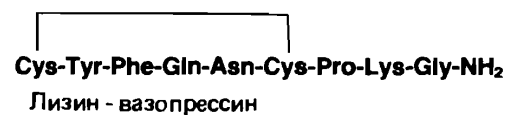
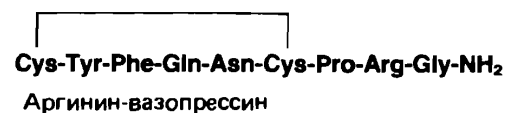
Г. Меланоцит-стимулирующий гормон (МСГ). МСГ стимулирует у некоторых видов меланогенез, вызывая дисперсию внутриклеточных меланиновых гранул, что приводит к потемнению кожи. Три различные молекулы МСГ (α, β и γ) содержатся в составе молекулы ПОМК, а две из них (α и β) секретируются у некоторых видов животных. У людей активностью МСГ обладают компоненты больших по размеру молекул γ- или β-липотропинов. α-МСГ содержит аминокислотную последовательность, идентичную участку АКТГ₁₋₁₃, но N-концевой фрагмент молекулы находится в ацетилированной форме. α-МСГ, а также кортикотропиноподобный пептид промежуточной доли гипофиза обычно обнаруживаются у животных с хорошо развитой промежуточной долей. У людей в постнатальном периоде эти пептиды не найдены.

Лица с низким уровнем глюкокортикоидов (болезнь Аддисона) характеризуются усиленной пигментацией кожи, связанной с повышенной активностью МСГ в плазме. Это может быть обусловлено секрецией АКТГ, но скорее является результатом совместной секреции β- и γ-липотропинов, которым, как известно, присуща активность МСГ.

ГОРМОНЫ ЗАДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА

Задняя доля гипофиза содержит два активных гормона — вазопрессин и окситоцин. **Вазопрессин**, получивший свое название благодаря способности повышать артериальное давление при введении в фармакологических дозах, правильнее называть антидиуретическим гормоном (АДГ), поскольку его самое важное физиологическое действие заключается в стимуляции реабсорбции воды в дистальных почечных канальцах. Название другого гормона «окситоцин» также связано с его эффектом, который заключается в ускорении родов из-за усиления сокращения гладких мышц матки. Вероятная физиологическая роль этого гормона — стимуляция выброса молока из молочной железы.

Оба гормона образуются в гипоталамусе, затем с аксоплазматическим током переносятся в нервные окончания задней доли гипофиза, из которых секретируются в кровоток при соответствующей стимуляции. Смысл такого механизма состоит, вероятно, в том, что он позволяет миновать гематоэнцефалический барьер. АДГ синтезируется преимущественно в **супраоптическом ядре**, окситоцин — в **паравентрикулярном ядре**. Каждый из них перемещается по аксону в связанной со специфическим белком-переносчиком (**нейрофизинном**) форме. Нейрофизины I и II синтезируются вместе с окситоцином и АДГ соответственно как части одного белка (его иногда называют пропрессофизинном), кодируемого единственным геном. Нейрофизины I и II представляют собой своеобразные белки с мол. массами соответственно 19 000 и 21 000. АДГ и окситоцин секретируются в кровоток по отдельности, каждый вместе со своим нейрофизинном. В крови они не связаны с белком и имеют короткий период полужизни в плазме (2—4 мин). Структура АДГ и окситоцина представлена ниже.



Каждый нонапептид содержит молекулы цистеина в положениях 1 и 6, связанные дисульфидным мостиком. У большинства животных обнаруживается

аргинин-вазопрессин, однако у свиней и родственных видов в положении 8 находится лизин. Поскольку АДГ и окситоцин очень близки по структуре, не удивительно, что они обладают некоторыми общими биологическими эффектами. Оба пептида метаболизируются в основном в печени, но и почечная экскреция АДГ вносит существенный вклад в его исчезновение из крови.

1. ОКСИТОЦИН

Регуляция секреции

Главными стимулами высвобождения окситоцина являются нервные импульсы, возникающие при раздражении грудных сосков. Растяжение влагалища и матки играет второстепенную роль. При многих воздействиях, вызывающих секрецию окситоцина, происходит высвобождение пролактина; предполагают, что фрагмент окситоцина может играть роль пролактин-рилизинг-фактора. Эстрогены стимулируют, а прогестерон ингибирует продукцию окситоцина и нейрофизина I.

Механизм действия

Механизм действия окситоцина неизвестен. Он вызывает сокращение гладких мышц матки и поэтому используется в фармакологических дозах для стимуляции родовой деятельности у женщин. Интересно, что у беременных животных с поврежденной гипоталамо-гипофизарной системой вовсе не обязательно возникают нарушения родовой деятельности. Наиболее вероятная физиологическая функция окситоцина заключается в стимуляции сокращений миоэпителиальных клеток, окружающих альвеолы молочной железы. Это вызывает перемещение молока в систему альвеолярных протоков и приводит к его выбросу. Мембранные рецепторы для окситоцина найдены в тканях матки и молочной железы. Их количество возрастает под действием эстрогенов и снижается под влиянием прогестерона. Наступление лактации до родов можно, очевидно, объяснить одновременным повышением количества эстрогенов и падением уровня прогестерона непосредственно перед родами. Производные прогестерона часто используются для подавления послеродовой лактации у женщин. Окситоцин и нейрофизин I, по видимому, образуются и в яичниках, где окситоцин может ингибировать стероидогенез.

Химические группы, существенные для действия окситоцина, включают первичную аминогруппу N-концевого цистеина, фенольную группу тирозина, 3 карбоксамидные группы аспарагина, глутамина и глицинамида, дисульфидную (S—S) связь. Путем удаления или замещения этих групп получены мно-

гочисленные аналоги окситоцина. Например, удаление свободной первичной аминогруппы концевого остатка полуцистеина (положение 1) приводит к образованию дезаминокситоцина, антидиуретическая активность которого в 4—5 раз превышает активность природного окситоцина.

2. АНТИДИУРЕТИЧЕСКИЙ ГОРМОН (АДГ; ВАЗОПРЕССИН)

Регуляция секреции

Нервные импульсы, вызывающие секрецию АДГ, являются результатом действия ряда различных стимулирующих факторов. Главный физиологический стимул — это повышение осмоляльности плазмы. Его эффект опосредуется **осморецепторами**, локализованными в гипоталамусе, и **барорецепторами**, находящимися в сердце и других отделах сосудистой системы. Гемодилюция (снижение осмоляльности) оказывает противоположное действие. К другим стимулам относятся эмоциональный и физический стресс и воздействие фармакологических агентов, в том числе ацетилхолина, никотина и морфина. В большинстве случаев усиление секреции сочетается с повышением синтеза АДГ и нейрофизина II, поскольку при этом не происходит истощения резервов гормона. Адреналин и агенты, вызывающие увеличение объема плазмы, подавляют секрецию АДГ; аналогичным эффектом обладает этанол.

Механизм действия

Наиболее важные в физиологическом плане клетки-мишени для АДГ у млекопитающих — клетки дистальных извитых канальцев и собирательных трубочек почки. Эти протоки пересекают мозговое вещество почек, где градиент осмоляльности внеклеточных растворенных веществ в 4 раза выше, чем в плазме. Клетки этих протоков относительно непроницаемы для воды, так что в отсутствие АДГ моча не концентрируется и может выделяться в количествах, превышающих 20 л в сутки. АДГ увеличивает проницаемость клеток для воды и способствует поддержанию осмотического равновесия между мочой собирательных трубочек и гипертоническим содержимым интерстициального пространства, благодаря чему объем мочи сохраняется в пределах 0,5—1 л в сутки. На слизистых (мочевых) мембранах эпителиальных клеток этих структур присутствуют рецепторы АДГ, которые связаны с аденилатциклазой; считают, что действие АДГ на почечные каналцы опосредуется сАМР. Описанное физиологическое действие послужило основанием для того, чтобы назвать гормон «антидиуретическим». сАМР и ингибиторы фосфодиэстеразы имитируют эффекты АДГ. В ус-

ловиях *in vivo* повышение уровня кальция в среде, омывающей слизистую поверхность канальцев, тормозит действие АДГ на перемещение воды (очевидно, путем ингибирования аденилатциклазы, поскольку эффект самого сАМР при этом не уменьшается). Описанный механизм может отчасти обуславливать повышенный диурез, характерный для больных с гиперкальциемией.

Патофизиология

Нарушения секреции или действия АДГ приводят к **несахарному диабету**, который характеризуется выделением больших объемов разбавленной мочи. Первичный несахарный диабет, связанный с дефицитом АДГ, обычно развивается при повреждении гипоталамо-гипофизарного тракта вследствие перелома основания черепа, опухоли или инфекции; однако он может иметь и наследственную природу. При **наследственном нефрогенном несахарном диабете** секреция АДГ остается нормальной, но клетки-мишени утрачивают способность реагировать на гормон, вероятно, из-за нарушения его рецепции (см. табл. 43.2). Этот наследственный дефект отличается от **приобретенного нефрогенного несахарного диабета**, который чаще всего возникает при терапевтическом введении лития больным с маниакально-депрессивным психозом. Синдром **неадекватной секреции** АДГ связан обычно с эктопическим образованием гормона различными опухолями (обычно опухолями легких), но может также наблюдаться и при болезнях мозга, легочных инфекциях или гипотиреозе. Неадекватной такая секреция считается потому, что продукция АДГ происходит с нормальной или повышенной скоростью в условиях гипоосмолярности, и это вызывает устойчивую и прогрессирующую гипонатриемию с выделением гипертонической мочи.

ЛИТЕРАТУРА

Гормоны передней доли гипофиза

- Douglass J., Civelli O., Herbert E.* Polypeptide gene expression: Generation of diversity of neuroendocrine peptides, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 665.
- Frantz A. G.* Prolactin, *N. Engl. J. Med.*, 1978, **298**, 201.
- Krieger D. T.* The multiple faces of pro-opiomelanocortin, a prototype precursor molecule, *Clin. Res.*, 1983, **3**, 342.
- Krulich L.* Central neurotransmitters and the selection of prolactin, GH, LH, and TSH, *Annu. Rev. Physiol.*, 1979, **41**, 603.
- Nikolics K. et al.* A prolactin-inhibiting factor with the precursor for human gonadotropin-releasing hormone, *Nature*, 1986, **316**, 511.
- Pierce J. G., Parsons T. F.* Glycoprotein hormones: Structure and function, *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 465.
- Seeburg P.* The human growth hormone gene family: Structure and evolution of the chromosomal locus, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 3939.

Гормоны задней доли гипофиза

- Chord I. T.* The posterior pituitary gland, *Clin. Endocrinol.*, 1975, **4**, 89.
- Robertson G. L.* Regulation of vasopressin function in health and disease, *Resent Prog. Horm. Res.*, 1977, **33**, 333.

Гормоны гипоталамуса

- Imura H. et al.* Effect of CNS peptides on hypothalamic regulation of pituitary secretion, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1981, **28**, 557.
- Labrie F. et al.* Mechanism of action of hypothalamic hormones in the adenohipophysis, *Annu. Rev. Physiol.*, 1979, **41**, 555.
- Reichlin S.* Systems for the study of regulation of neuropeptide secretion. In: *Neurosecretion and Brain Peptides: Implications for Brain Function and Neurological Disease*, Martin J. B., Reichlin S., Bick K. L. (eds.), Raven Press, 1981.

Гормоны щитовидной железы

Дарил Греннер

Сокращения, использованные в настоящей главе

ГР	— гормон роста
ДИТ	— дииодтирозин
ИФР	— инсулиноподобный фактор роста
МИТ	— моноиодтирозин
T ₃	— трийодтиронин
T ₄	— тироксин, тетраиодтиронин
ТРГ	— тиреотропин-рилизинг-гормон, тиролиберин
ТСГ	— тироксин-связывающий глобулин
ТСПА	— тироксин-связывающий преальбумин
ТТГ	— тиреотропный гормон, тиреотропин

ВВЕДЕНИЕ

Щитовидная железа вырабатывает два иодаминокислотных гормона — **3,5,3'-трийодтиронин (T₃)** и **3,5,3',5'-тетраиодтиронин (T₄, тироксин)**, которые давно известны благодаря их важной роли в регуляции общего метаболизма, развития и дифференцировки тканей. Эти гормоны (их структура представлена на рис. 46.1) регулируют экспрессию генов по механизму, сходному с таковым для стероидных гормонов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Заболевания щитовидной железы принадлежат к наиболее часто встречающимся поражениям эндокринной системы. Их диагностика и лечение базируются на характерных особенностях физиологии и биохимии тиреоидных гормонов. Большим подспорьем в изучении этих особенностей является доступность радиоизотопов иода. Радиоактивный иод благодаря способности накапливаться в щитовидной железе широко используется в диагностике и лечении ее заболеваний. Однако применение этого изотопа сопряжено с определенной опасностью, поскольку его избыток (так же, как и радиоактивные

осадки) считают основным фактором риска возникновения рака щитовидной железы. Особенно это относится к детям и подросткам, клетки щитовидной железы которых находятся в состоянии активного деления.

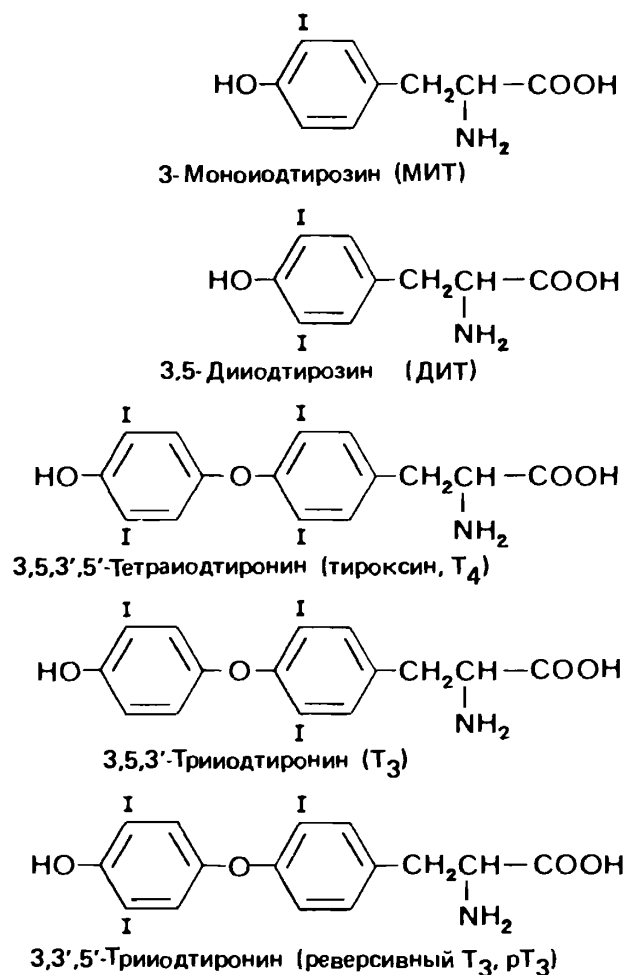


Рис. 46.1. Структура гормонов щитовидной железы и родственных соединений

БИОСИНТЕЗ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Отличительная особенность тиреоидных гормонов состоит в том, что для их биологической активности требуется микроэлемент иод. Почти во всех частях света иод является следовым компонентом почвы и поэтому в малых количествах присутствует в пище. Его превращение в форму, способную включаться в органические соединения, осуществляется с помощью сложного механизма. Известно, что щитовидная железа синтезирует тиронин, причем образование этого вещества происходит в составе тиреоглобулина. Указанные процессы будут обсуждаться по отдельности, хотя в организме они протекают одновременно.

1. МЕТАБОЛИЗМ ТИРЕОГЛОБУЛИНА

Биосинтез

Тиреоглобулин служит предшественником тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Это большой иодированный гликозилированный белок с мол. массой 660 000. Углеводы составляют 8—10% массы тиреоглобулина, иодид — в зависимости от содержания иода в пище — 0,2—1%. Тиреоглобулин состоит из двух субъединиц. Он содержит 115 остатков тирозина, каждый из которых представляет собой потенциальный сайт иодирования. Около 70% иодида в тиреоглобулине присутствует в составе неактивных предшественников — **моноиодтирозина (МИТ)** и **дйодиотирозина (ДИТ)**, 30% — в **иодтиронильных остатках**, T_4 и T_3 . Если иод поступает в достаточном количестве, отношение T_4/T_3 составляет примерно 7:1. При недостаточности иода оно снижается, так же как отношение ДИТ/МИТ. Смысл синтеза молекул из 5000 аминокислот для образования нескольких молекул модифицированной диаминокислоты заключается, по-видимому, в том, что для конденсации тирозильных остатков или органификации иодида необходима конформация именно этой большой структуры. Тиреоглобулин синтезируется в базальной части клетки, перемещается к просвету и хранится во внеклеточном **коллоиде**; затем он вновь поступает в клетку и движется в направлении от апикальной к базальной ее части, гидролизуясь при этом с образованием активных гормонов T_3 и T_4 .

Аминокислоты для синтеза тиреоглобулина, в том числе и тирозин, попадают в клетку через базальную мембрану и включаются в образующиеся субъединицы тиреоглобулина при участии полирибосом, прикрепленных к эндоплазматическому ретикулуму. Включение углеводного компонента начинается в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума и продолжается в комплексе Гольджи. Каждая молекула содержит более 20 углеводных цепей, которые могут быть короткими или длинными, простыми или разветвленными. «Упаковка», включая полимеризацию, далее идет в пузырьках Гольджи, мигрирующих к апикальной мембране клетки. Секретция тиреоглобулина в просвет фолликула происходит путем экзоцитоза. Все опи-

санные процессы усиливаются тиреотропином: этот гормон (или cAMP) стимулирует и транскрипцию тиреоглобулинового гена.

Гидролиз

Тиреоглобулин представляет собой форму хранения T_3 и T_4 в коллоиде и при нормальной функции щитовидной железы обеспечивает поступление этих гормонов в кровь на протяжении нескольких недель. После стимуляции щитовидной железы тиреотропином (или cAMP) уже за несколько минут заметно увеличивается число микроворсинок на апикальной мембране. В ходе зависящего от микротрубочек процесса происходит захват тиреоглобулина, а последующий пиноцитоз обеспечивает его перенос обратно в фолликулярную клетку. Фагосомы сливаются с лизосомами с образованием **фаголизосом**, в которых различные кислые протеазы и пептидазы гидролизуют тиреоглобулин на аминокислоты, включая иодтиронины. T_4 и T_3 высвобождаются в кровь из базальной части клетки, вероятно, путем облегченной диффузии. Отношение T_4/T_3 в крови ниже, чем в тиреоглобулине, откуда следует, что в щитовидной железе должно иметь место избирательное деиодирование T_4 . Ежедневная секреция гормонального иода щитовидной железой составляет 50 мкг. С учетом среднего захвата иодида (25—30% потребленного иодида) дневная потребность в нем колеблется от 150 до 200 мкг.

Как упоминалось выше, большая часть иодида в тиреоглобулине не входит в состав иодтиронинов: около 70% его приходится на неактивные соединения МИТ и ДИТ. Эти аминокислоты высвобождаются при гидролизе тиреоглобулина, а иодид отщепляется от них присутствующей в системе NADPH-зависимой **деиодиназой**, которая обнаруживается также в почках и печени. Иодид, выделяющийся из МИТ и ДИТ, образует внутри щитовидной железы существенный пул, отличный от I^- , поступающего из крови. В равновесных условиях количество иодида, которое входит в щитовидную железу, соответствует количеству, покидающему железу. Если 1/3 иодида тиреоглобулина выходит из железы (в виде T_4 и T_3), то, следовательно, 2/3 доступного для процессов биосинтеза иодида образуются в ней благодаря деиодированию МИТ и ДИТ.

2. МЕТАБОЛИЗМ ИОДИДА

Метаболизм иодида включает ряд отдельных этапов, представленных на рис. 46.2.

Концентрирование иодида (I^-)

Щитовидная железа наряду с некоторыми другими эпителиальными тканями, такими, как молочная железа, плацента, слюнные железы и желудок, обладает способностью концентрировать I^- против высокого электрохимического градиента. Это требующий энергии процесс, связанный с зависимым от АТФазы Na^+/K^+ -насосом. Активность **I-насоса** щи-

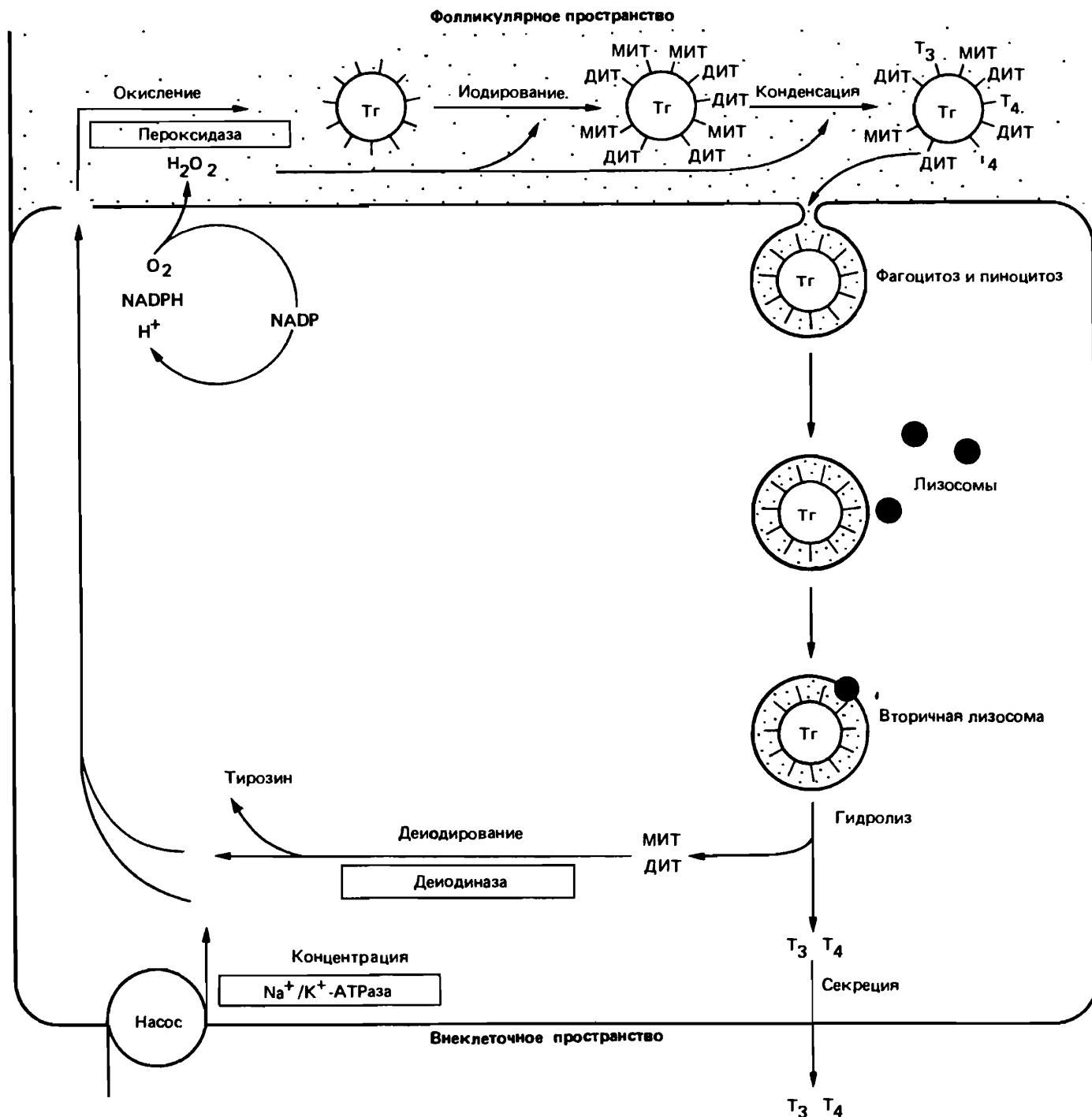


Рис. 46.2. Схема метаболизма иодида в тиреоидном фолликуле. Показана фолликулярная клетка, контактирующая с просветом фолликула (верхняя часть рисунка, выделенная точками) и с внеклеточным пространством (нижняя часть рисунка). Иодид поступает в щитовидную железу благодаря действию насоса и путем пассивной диффузии. Синтез тиреоидных гормонов протекает в фолликулярном пространстве через ряд реакций, многие из которых опосредуются пероксидазой. Гормоны высвобождаются из тиреоглобулина путем гидролиза. ТГ — тиреоглобулин; МИТ — моноиодтирозин; ДИТ — диiodтирозин; T_3 — триiodтиронин; T_4 — тетраiodтиронин. Звездочки обозначают стадии или процессы, катализируемые ферментами, врожденная недостаточность которых вызывает зоб и часто приводит к гипотиреозу.

щитовидной железы можно оценить отдельно путем ингибирования органификации I^- соединениями класса тиомочевин (рис. 46.3). Отношение количества иодида в щитовидной железе к иодиду сыворотки (отношение ЩЖ/С) отражает активность этого насо-

са (или концентрирующего механизма). Она регулируется в первую очередь тиреотропином (ТТГ), и отношение ЩЖ/С колеблется от 500 у животных, длительно получавших тиреотропин, до 5 и меньше у гипofизэктомированных животных. У людей, потре-

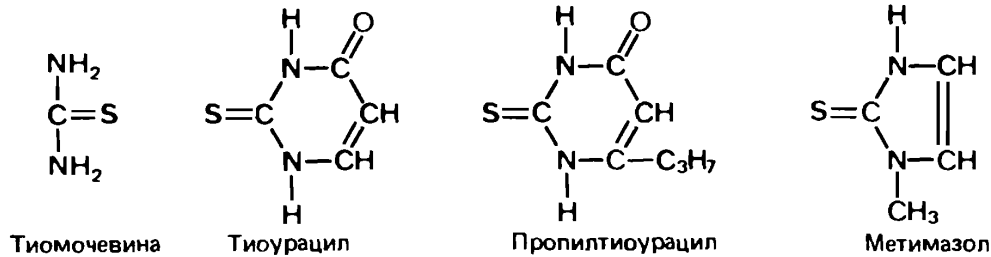


Рис. 46.3. Антитиреоидные препараты группы тиомочевины.

бляющих с пищей нормальные количества иода, эта величина составляет примерно 25.

Очень малые количества иодида поступают в щитовидную железу также путем диффузии. Внутриклеточный I⁻, не включившийся в МИТ или ДИТ (обычно менее 10%), с помощью этого механизма может и покидать железу.

Транспортный механизм ингибируется двумя классами молекул. Первая группа состоит из анионов с таким же специфическим парциальным объемом, как у I⁻, и включает перхлорат (ClO₄⁻), перренат (ReO₄⁻) и пертехнетат (TcO₄⁻). Эти анионы конкурируют с иодидом за переносчик концентрируются щитовидной железой. Радиоизотоп TcO₄⁻ часто применяют для изучения транспорта иодида у человека. В качестве примера молекул второй группы можно привести линейный анион тиоцианата (SCN⁻), который конкурентно тормозит транспорт I⁻, но не концентрируется железой. Ингибиторы транспорта I⁻ позволяют оценить быструю диффузию обменивающегося I⁻ из щитовидной железы и применяются для диагностики нарушений его органификации. После разового введения блокирующей дозы ингибитора транспорта количество аккумулированного I⁻ (обычно измеряемого с использованием ¹³¹I), покидающего железу, обнаруживает прямую зависимость от величины несвязанной или неорганифицированной (неорганической) фракции. У лиц с неполной органификацией в ответ на введение ClO₄⁻ «высвобождается» больше ¹³¹I, чем у здоровых людей.

Окисление I⁻

Щитовидная железа — единственная ткань, способная окислять I⁻ до состояния с более высокой валентностью, что необходимо для органификации I⁻ и биосинтеза тиреоидных гормонов. В этом процессе, протекающем на люминальной поверхности фолликулярной клетки, участвует содержащая гем пероксидаза.

Тиреопероксидаза представляет собой тетрамерный белок с мол. массой 60 000, требующий перекись водорода в качестве окисляющего агента. H₂O₂ образуется NADPH-зависимым ферментом, сходным с цитохром-с-редуктазой. Ряд соединений тор-

мозит окисление I⁻ и, следовательно, его дальнейшее включение в МИТ и ДИТ. Среди них наибольшее значение для клиники имеют соединения группы тиомочевины; некоторые из них представлены на рис. 46.3. Эти соединения применяют в качестве антитиреоидных препаратов в силу их способности подавлять на данном этапе биосинтез гормонов щитовидной железы.

Иодирование тирозина

Окисленный иодид реагирует с тирозильными остатками тиреоглобулина, причем и в этой реакции, вероятно, принимает участие тиреопероксидаза. В первую очередь иодированию подвергается третье положение ароматического кольца, а затем — пятое с образованием соответственно МИТ и ДИТ. Указанная реакция, иногда называемая **органификацией**, протекает в люминальном тиреоглобулине в течение секунд. После иодирования иод уже не может быстро покинуть железу. Иодированию может подвергаться свободный тирозин, но он не включается в белки из-за отсутствия тРНК, распознающей иодированный тирозин.

Конденсация иодтирозинов

Конденсация двух молекул ДИТ с образованием Т₄ или МИТ и ДИТ с образованием Т₃ происходит в составе молекулы тиреоглобулина, хотя нельзя полностью исключить и возможность конденсации свободных МИТ и ДИТ со связанным ДИТ. Специальный конденсирующий фермент, осуществляющий это взаимодействие, не найден, и, поскольку процесс имеет окислительный характер, считают, что и он катализируется тиреопероксидазой, которая стимулирует образование свободных радикалов иодтирозина. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что реакция конденсации подавляется теми же агентами, которые ингибируют окисление I⁻. Образовавшиеся гормоны остаются в составе тиреоглобулина до начала его деградации, о которой говорилось выше. Гидролиз тиреоглобулина стимулируется тиреотропином, но тормозится I⁻; последний эффект иногда используют, применяя KI для лечения гипертиреоза.

ТРАНСПОРТ И МЕТАБОЛИЗМ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

От половины до двух третей T_4 и T_3 присутствуют в организме вне щитовидной железы, причем бо́льшая часть их находится в крови в связанной форме в комплексе с двумя белками: **тироксин-связывающим глобулином (ТСГ)** и **тироксин-связывающим преальбумином (ТСПА)**. В количественном отношении бо́льшее значение имеет ТСГ, который представляет собой гликопротеин с мол. массой 50 000. Он связывает T_4 и T_3 со сродством, в 100 раз превышающим сродство ТСПА, и емкостью, равной 20 мкг/100 мл плазмы. При нормальных условиях ТСГ связывает (нековалентно) почти весь T_4 и весь T_3 , содержащиеся в плазме (табл. 46.1). Биологическая активность гормонов обуславливается небольшой несвязанной (свободной) фракцией. Несмотря на значительные различия в общем количестве гормонов, свободная фракция T_3 близка к таковой T_4 , однако время полужизни T_4 в плазме в 4—5 раз больше, чем T_3 .

ТСГ также выступает в качестве объекта регуляции, и это важное обстоятельство надо учитывать при диагностическом тестировании функции щитовидной железы, поскольку большинство методов определения T_4 или T_3 позволяет измерять общее количество гормонов в плазме, а не их свободную фракцию. ТСГ образуется в печени, и его синтез повышается эстрогенами (беременность и противозачаточные пилюли). Снижение продукции ТСГ имеет место при терапевтическом введении андрогенов или глюкокортикоидов и при некоторых болезнях печени. Известны также примеры наследственного увеличения или уменьшения уровня ТСГ. Во всех этих случаях регистрируются сдвиги общего содержания T_4 и T_3 , тогда как величина их свободной фракции не меняется. Фенил оин и салицилаты конкурируют с T_3 и T_4 за связывание с ТСГ, что приводит к снижению общего уровня гормонов без изменения количества их свободных форм, и это обстоятельство должно учитываться при интерпретации результатов диагностических тестов. Внетиреоидное деиодирование приводит к превращению T_4 в T_3 . Преобладающей метаболически активной молекулярной формой гормона является, по-видимому, T_3 , поскольку он

связывается с рецепторами клеток-мишеней со сродством, в 10 раз превышающим сродство T_4 . Около 80% циркулирующего T_4 превращается на периферии в T_3 или реверсивный («обратный») T_3 , и этот процесс служит главным источником T_3 . Реверсивный T_3 представляет собой очень слабый агонист гормона, который образуется в относительно больших количествах при хронических болезнях, при углеводном голодании и у плодов. Пропилтиоурацил и пропранолол ингибируют превращение T_4 в T_3 .

Другие пути метаболизма тиреоидных гормонов включают полное деиодирование или инактивацию посредством дезаминирования или декарбоксилирования. Образование конъюгатов в печени (глюкуро-нидация и сульфирование) приводит к формированию более гидрофильных молекул, которые выделяются в желчь, вновь всасываются в кишечнике, деиодируются в почках и выделяются с мочой.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА И ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Главные компоненты, составляющие петлю отрицательной обратной связи,— это T_4 , T_3 , тиреотропин и тиролиберин (рис. 46.4). T_4 и T_3 тормозят свой собственный синтез по механизму обратной связи. Медиатором этого процесса может служить T_3 , поскольку T_4 превращается в гипофизе в T_3 . На этом уровне обратная связь ингибирует высвобождение тиреотропина. T_3 (или, возможно, T_4) может подавлять высвобождение и образование тиролиберина гипоталамусом. Стимулом для повышенной секреции тиролиберина и тиреотропина служит снижение содержания тиреоидных гормонов в крови. Однако даже при полной блокаде биосинтеза тиреоидных гормонов (например, при лечении антитиреоидными средствами) не происходит немедленного усиления высвобождения тиролиберина и тиреотропина. Щитовидная железа содержит запас ранее образованного гормона, обеспечивающий его «поставку» в течение нескольких недель; имеются также внетиреоидные резервы гормона (в печени и в связанной с ТСГ форме), которые расходуются в первую очередь. Кроме того, при угрозе снижения биосинтеза гормона в связи с недостаточностью иода дополнительную компенсаторную роль выполняет ауторегуляторный механизм щитовидной железы.

Существует интересное взаимодействие петель отрицательной обратной связи для щитовидной железы и гормона роста, обуславливающее регуляторные механизмы, представленные на рис. 46.4. T_3 и T_4 усиливают высвобождение соматостатина из гипоталамуса, а этот пептид ингибирует секрецию тиреотропина гипофизом. Соматостатин участвует и в другом механизме: его уровень возрастает в ответ на повышение содержания в плазме инсулиноподоб-

Таблица 46.1. Сравнение содержания T_4 и T_3 в плазме

Общее содержание гормона (мкг%)		Свободный гормон			Период полужизни в крови
		в % от общего содержания	в нг%	в молях	
T ₄	8	0,03	~ 2,24	3,0 · 10 ⁻¹¹	6,5
T ₃	0,15	0,3	~ 0,4	~ 0,6 · 10 ⁻¹¹	1,5

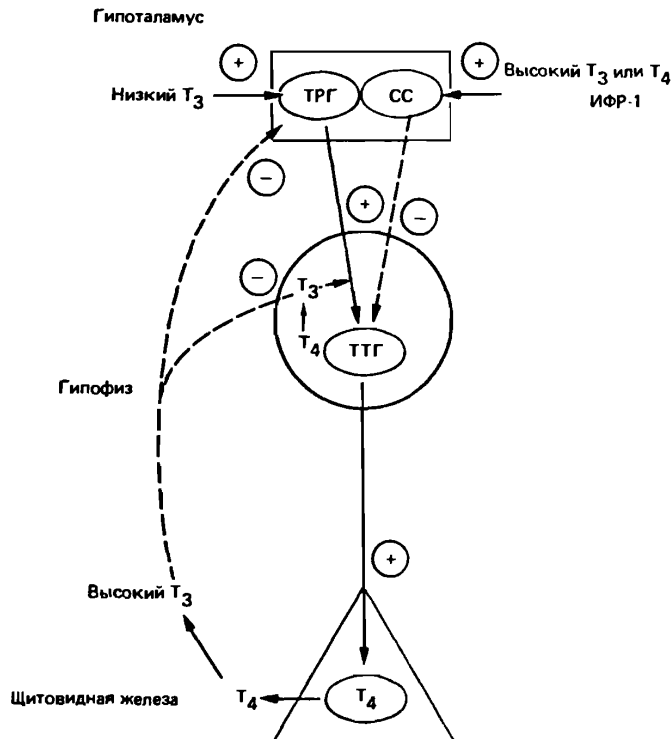


Рис. 46.4. Регуляция биосинтеза гормонов щитовидной железы по механизму обратной связи. Сплошными линиями и знаками $\oplus$ обозначены пути стимуляции, пунктирными линиями и знаками $\ominus$ — ингибиторные пути. ИФР — инсулиноподобный фактор роста; СС — соматостатин; ТРГ — тиреотропин-рилизинг-гормон (тиролиберин); ТТГ — тиреотропный гормон.

ного фактора роста (ИФР-1), которое в свою очередь стимулируется гормоном роста (см. гл. 45 и рис. 45.5). У малорослых детей, получающих гормон роста, иногда развивается гипотиреоз, по-видимому, вследствие увеличения концентрации ИФР-1, повышающего секрецию соматостатина, что в свою очередь сопровождается падением секреции тиреотропина.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Гормоны щитовидной железы с высоким сродством связываются с ядерными рецепторами клеток-мишеней. Сродство T_3 примерно в 10 раз превышает сродство T_4 . Вопрос о том, принадлежит ли вся гормональная активность щитовидной железы только T_3 , остается спорным; активностью, по-видимому, обладают оба гормона, и T_3 , и T_4 . Сравнение различных гормональных аналогов выявляет высокую корреляцию между их сродством к рецепторам и способностью вызывать биологическую реакцию. Тиреоидные гормоны взаимодействуют и с низкоаффинными связывающими участками в цитоплазме, которые, очевидно, не тождественны белку ядерного рецептора. Цитоплазматическое связывание может

служить для удержания гормонов поблизости от истинных рецепторов. Описано связывание T_3 с плазматическими мембранами, роль этого феномена в транспорте гормона неясна.

Главная метаболическая функция гормонов щитовидной железы состоит в повышении поглощения кислорода. Эффект наблюдается во всех органах, кроме мозга, ретикулоэндотелиальной системы и гонад. Особое внимание привлекают к себе митохондрии, в которых T_4 вызывает морфологические изменения и разобщает окислительное фосфорилирование. Эти эффекты требуют больших количеств гормона и почти наверняка не имеют места в физиологических условиях. Тиреоидные гормоны индуцируют митохондриальную α -глицеро-фосфатдегидрогеназу, что, возможно, связано с их действием на поглощение O_2 .

Согласно гипотезе Эдельмана, большая часть энергии, утилизируемой клеткой, используется для работы Na^+/K^+ -АТФазного насоса. Гормоны щитовидной железы повышают эффективность этого насоса, увеличивая количество составляющих его единиц. Поскольку все клетки обладают таким насосом и практически каждая из них реагирует на тиреоидные гормоны, повышенная утилизация АТФ и связанное с ней увеличение потребления кислорода в процессе окислительного фосфорилирования могут представлять собою основной механизм действия этих гормонов.

Гормоны щитовидной железы, подобно стероидам, индуцируют синтез белков путем активации механизма генной транскрипции (см. рис. 44.1). По-видимому, именно таков механизм, посредством которого T_3 усиливает общий синтез белка и обеспечивает положительный азотный баланс. Здесь вновь проявляется любопытная связь между двумя группами гормонов, оказывающих влияние на рост: тиреоидными гормонами и гормоном роста. T_3 и глюкокортикоиды повышают уровень транскрипции гена гормона роста, увеличивая тем самым образование последнего. Это объясняет классическое наблюдение, согласно которому в гипофизе животных с дефицитом T_3 отсутствует гормон роста. Аналогичным образом можно трактовать некоторые общие анаболические эффекты T_3 . Очень высокие концентрации T_3 подавляют синтез белка и обуславливают отрицательный азотный баланс.

Гормоны щитовидной железы известны как важные модуляторы процессов развития. Это особенно ярко проявляется в их действии на метаморфоз амфибий. Тиреоидные гормоны необходимы для превращения головастика в лягушку. Этот процесс включает резорбцию хвоста, пролиферацию зачатков конечностей, замену эмбриональной формы гемоглобина на взрослую, стимуляцию ферментов цикла мочевины (так что выделение мочевины начинает преобладать над выделением аммиака) и изме-

нения эпидермиса. Гормоны щитовидной железы необходимы и для нормального развития человека. Гипотиреоз у плодов или новорожденных приводит к **кретинизму**, который характеризуется множественными врожденными нарушениями и тяжелой необратимой задержкой умственного развития.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Зоб

Зобом называют любое увеличение щитовидной железы. Простой зоб является результатом «попытки» организма компенсировать сниженное образование тиреоидных гормонов, поэтому все случаи простого зоба сопровождаются повышением уровня тиреотропина. Причинами таких нарушений могут быть недостаток йодида, избыток йодида при недостаточности ауторегуляторного механизма и различные редкие дефекты метаболизма, иллюстрирующие важность отдельных стадий биосинтеза тиреоидных гормонов. К подобным дефектам относятся 1) нарушение транспорта; 2) нарушение йодирования; 3) нарушение реакции конденсации; 4) недостаточность деиодиназы и 5) образование аномальных йодированных белков. Частичная недостаточность перечисленных функций может вызвать простой зоб у взрослых людей. Любая из этих причин возникновения простого зоба, если она резко выражена, приводит к гипотиреозу. Простой зоб лечат экзогенными тиреоидными гормонами. При специфических формах зоба рекомендуют увеличение или ограничение потребления йода.

Гипотиреоз

Дефицит свободных T_3 или T_4 обуславливает появление клинического состояния, известного как гипотиреоз. Обычно гипотиреоз связан с недостаточностью функции щитовидной железы, но может быть и результатом заболевания гипофиза или гипоталамуса. При гипотиреозе снижаются основной обмен, а также скорость других процессов, зависящих от тиреоидных гормонов. Характерными особенностями этой патологии являются низкая частота сердечбиений, диастолическая гипертензия, вялость, сонливость, запоры, чувствительность к холоду, сухость кожи и волос, бледность. Другие нарушения

зависят от возраста, в котором возникает гипотиреоз. О кретинизме говорилось выше. При возникновении гипотиреоза у детей старшего возраста наблюдается отставание в росте без задержки умственного развития. Различные формы гипотиреоза лечат заместительным введением тиреоидных гормонов.

Гипертиреоз

Гипертиреоз, или **тиреотоксикоз**, обусловлен избыточным образованием тиреоидных гормонов. Существует множество форм этой патологии, но большинство случаев в США связано с **болезнью Грейса**, которая является результатом образования **тиреоид-стимулирующего иммуноглобулина (IgG)**, активирующего рецептор тиреотропина (см. табл. 43.2). Это приводит к диффузному разрастанию щитовидной железы и избыточной неконтролируемой продукции T_3 и T_4 , поскольку образование IgG не регулируется по типу обратной связи. Проявления гипертиреоза включают многосистемные сдвиги, куда относятся учащение сердечбиений, увеличение пульсового давления, нервозность, бессонница, похудание (несмотря на повышенный аппетит), слабость, потливость, повышенная чувствительность к теплу, а также гиперемия и влажность кожи. Лечение гипертиреоза, или болезни Грейса, состоит в подавлении образования гормонов, что достигается применением антитиреоидных средств, блокированием функции железы радиоактивным изотопом йода (таким, как ^{131}I) или комбинацией этих двух приемов. Иногда производят хирургическое удаление железы.

ЛИТЕРАТУРА

- Chopra I. J. et al.* Pathways of metabolism of thyroid hormones, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1978, 34, 531.
- Jackson I. M. D.* Thyrotropin-releasing hormone, *N. Engl. J. Med.*, 1982, 306, 145.
- Larsen P. R.* Thyroid-pituitary interaction: Feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones, *N. Engl. J. Med.*, 1982, 306, 23.
- Lo G. S. et al.* Dependence of renal (Na^+ and K^+)-ATPase activity on thyroid status, *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7826.
- Oppenheimer J. H.* Thyroid hormone action at the nuclear level, *Ann. Intern. Med.*, 1985, 102, 374.
- Robins J. et al.* Thyroxine transport proteins of plasma: Molecular properties and biosynthesis, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1978, 34, 477.

Гормоны, регулирующие метаболизм кальция

Дарил Греннер

Список сокращений, используемых в данной главе

ВЖ — внеклеточная жидкость
 КСБ — кальций-связывающий белок
 КТ — кальцитонин
 МТК — медуллярная тиреокарцинома
 ПТГ — паратиреоидный гормон

ВВЕДЕНИЕ

Ионы кальция регулируют ряд важнейших физиологических и биохимических процессов, в частности **нейромышечное возбуждение, свертывание крови, процессы секреции, поддержание целостности мембран и транспорт через мембраны, многие ферментативные реакции, высвобождение гормонов и нейромедиаторов, внутриклеточное действие ряда гормонов**. Кроме того, для минерализации костей необходимо поддержание определенных концентраций Ca^{2+} и PO_4^{3-} во внеклеточной жидкости и надкостнице. Нормальное протекание этих процессов обеспечивается тем, что концентрация Ca^{2+} в плазме крови поддерживается в очень узких пределах. Цель данной главы — объяснить, как это осуществляется.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аномальные концентрации Ca^{2+} в организме могут служить причиной множества патологий и даже гибели. Нарушениями гомеостаза кальция страдают до 3% госпитализированных больных.

ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Содержание кальция в организме человека составляет примерно 1 кг. 99% кальция локализовано в костях, где вместе с фосфатом он образует кристаллы **гидроксиапатита**, составляющие неорганический структурный компонент скелета. Кость — это динамическая ткань, претерпевающая перестройку в зависимости от нагрузки; в состоянии динамиче-

ского равновесия процессы образования и резорбции костной ткани сбалансированы. Большая часть кальция кости не может свободно обмениваться с **кальцием внеклеточной жидкости (ВЖ)**. Итак, в дополнение к своей роли механической опоры кости служат огромным резервуаром кальция. Около 1% кальция скелета составляет легкообменивающийся пул, еще 1% общего количества находится в периостальном пространстве (надкостнице), и вместе эти два источника составляют мобильный (смешанный) пул Ca^{2+} . Обсуждаемые в этой главе гормоны регулируют количество кальция во ВЖ путем изменения транспорта Ca^{2+} через мембрану, отделяющую ВЖ от периостальной жидкости. Паратиреоидный гормон оказывает стимулирующий эффект на этот транспорт; кальцитриол тоже участвует в стимуляции. Кальцитонин (КТ) способен предотвращать этот эффект.

В плазме крови кальций присутствует в трех формах: 1) в комплексе с органическими и неорганическими кислотами, 2) в связанной с белками форме, 3) в **ионизированном виде**. В комплексы с цитратом, фосфатом и другими анионами вовлечено около 6% общего кальция. Остальное количество распределяется почти поровну между связанной с белками (в первую очередь альбумином) формой 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 нормы. В случаях снижения уровня Ca^{2+} у животного нарастают явления повышенной возбудимости вплоть до возникновения тетанических судорог. Заметное повышение Ca^{2+} в плазме может привести к смерти из-за паралича мышц и комы.

Ион кальция и парный ему ион фосфата присутствуют в плазме крови в концентрациях, близких к пределу растворимости их соли; отсюда следует, что связывание Ca^{2+} с белками предупреждает воз-

возможность образования осадка и **эктопической кальцификации**. Изменения концентрации плазменных белков (прежде всего альбумина, хотя глобулины тоже связывают кальций) сопровождаются соответствующими сдвигами уровня общего кальция в плазме крови. Например, при гипоальбуминемии падение уровня общего кальция в плазме составляет 0,8 мг% на каждый г% снижения концентрации альбумина. Соответственно при возрастании количества альбумина плазмы наблюдается противоположное явление. Связывание кальция с белками плазмы зависит от pH: ацидоз способствует переходу кальция в ионизированную форму, а алкалоз повышает связывание с белками, т. е. снижает концентрацию Ca^{2+} . Вероятно, этим обусловлены звон в ушах и потеря кожной чувствительности, возникающие при синдроме гипервентиляции, которая вызывает острый респираторный алкалоз.

ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ

Первичный океан содержал преимущественно K^+ и Mg^{2+} , и потому появившиеся в ходе эволюции белки функционируют наилучшим образом именно в такой среде. Со временем состав морской воды изменился так, что преобладающими ионами стали Na^+ и Ca^{2+} . В результате для обеспечения условий функционирования внутриклеточных белков потребовался механизм ограничения концентрации Na^+ и Ca^{2+} в клетках при сохранении K^+ и Mg^{2+} . Таким механизмом стали связанные с мембраной натриевый и кальциевый насосы, способные поддерживать высокий (1000-кратный в случае Ca^{2+}) градиент концентрации иона между цитозолем и внеклеточной жидкостью. У современных многоклеточных организмов Na^+ и Ca^{2+} — это основные ионы внеклеточной среды. Гормоны и другие биологически активные вещества вызывают быстрые кратковременные изменения тока ионов кальция через плазматическую мембрану клетки и от одного внутриклеточного компартмента к другому. В итоге ионы кальция служат внутриклеточным медиатором, воздействующим на разнообразные обменные процессы (см. гл. 44).

Переход от водной среды, богатой Ca^{2+} , к наземной, где этот элемент относительно дефицитен, был сопряжен с развитием сложного механизма гомеостаза кальция, обеспечивающего экстракцию Ca^{2+} из источников питания и предотвращения резких изменений концентрации Ca^{2+} во ВЖ. В этот механизм включены три гормона — **паратиреоидный (ПТГ), кальцитриол $[1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3]$ и кальцитонин (КТ)**, — которые действуют на три органа: кости, почки и кишечник. При падении уровня ионизированного кальция в плазме крови ниже допустимой границы ($< 1,1$ ммоль/л) увеличивается секреция ПТГ паращитовидными железами. ПТГ стимулирует переход

кальция и фосфата из костей в кровь, а также резорбцию кальция и экскрецию фосфата в почках.

Второй важный аспект действия ПТГ на почки — стимуляция образования $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$. Это соединение, называемое теперь кальцитриолом, — активная форма того, что раньше называли витамином D. Кальцитриол влияет на кишечник, усиливая всасывание кальция, и, по-видимому, играет перmissive роль в эффекте ПТГ на кости и почки. Координированные действия этих агентов направлены на увеличение уровня Ca^{2+} во ВЖ при постоянстве или снижении уровня фосфата. Как только концентрация внеклеточного Ca^{2+} возвращается к норме, секреция ПТГ по механизму обратной связи снижается. Увеличение концентрации Ca^{2+} тормозит и образование кальцитриола (частично через снижение ПТГ), причем одновременно возрастает количество неактивных продуктов метаболизма этого соединения. Все это приводит к уменьшению всасывания кальция в кишечнике и снижению влияния ПТГ на почки и скелет. У некоторых животных при возрастании внеклеточного уровня Ca^{2+} усиливается секреция кальцитонина (КТ) К-клетками щитовидной железы или ультимобранхиальными тельцами. У человека роль КТ в гомеостазе кальция (в норме) остается неясной; по некоторым данным, полученным *in vitro*, КТ может тормозить резорбцию костей.

ГОРМОНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ГОМЕОСТАЗЕ КАЛЬЦИЯ

1. ПАРАТИРЕОИДНЫЙ ГОРМОН (ПТГ)

Структура

ПТГ — одноцепочечный пептид, состоящий из 84 аминокислотных остатков (молярная масса 9500) и не содержащий углеводов или каких-либо иных ковалентно-связанных компонентов (рис. 47.1). Вся биологическая активность принадлежит N-концевой трети молекулы: ПТГ₁₋₃₄ полностью активен. Область 25—34 ответственна в первую очередь за связывание с рецептором.

ПТГ синтезируется в виде молекулы-предшественника, состоящего из 115 аминокислотных остатков (рис. 47.1). Непосредственный предшественник ПТГ — это **проПТГ**, отличающийся от активного гормона тем, что содержит на N-конце дополнительный гексапептид с выраженными основными свойствами и неясной функцией. Первичным генным продуктом и непосредственным предшественником проПТГ оказался **препроПТГ**; он отличается от проПТГ наличием дополнительной N-концевой последовательности из 25 аминокислотных остатков, обладающей (как и другие лидерные или сигнальные последовательности, характерные

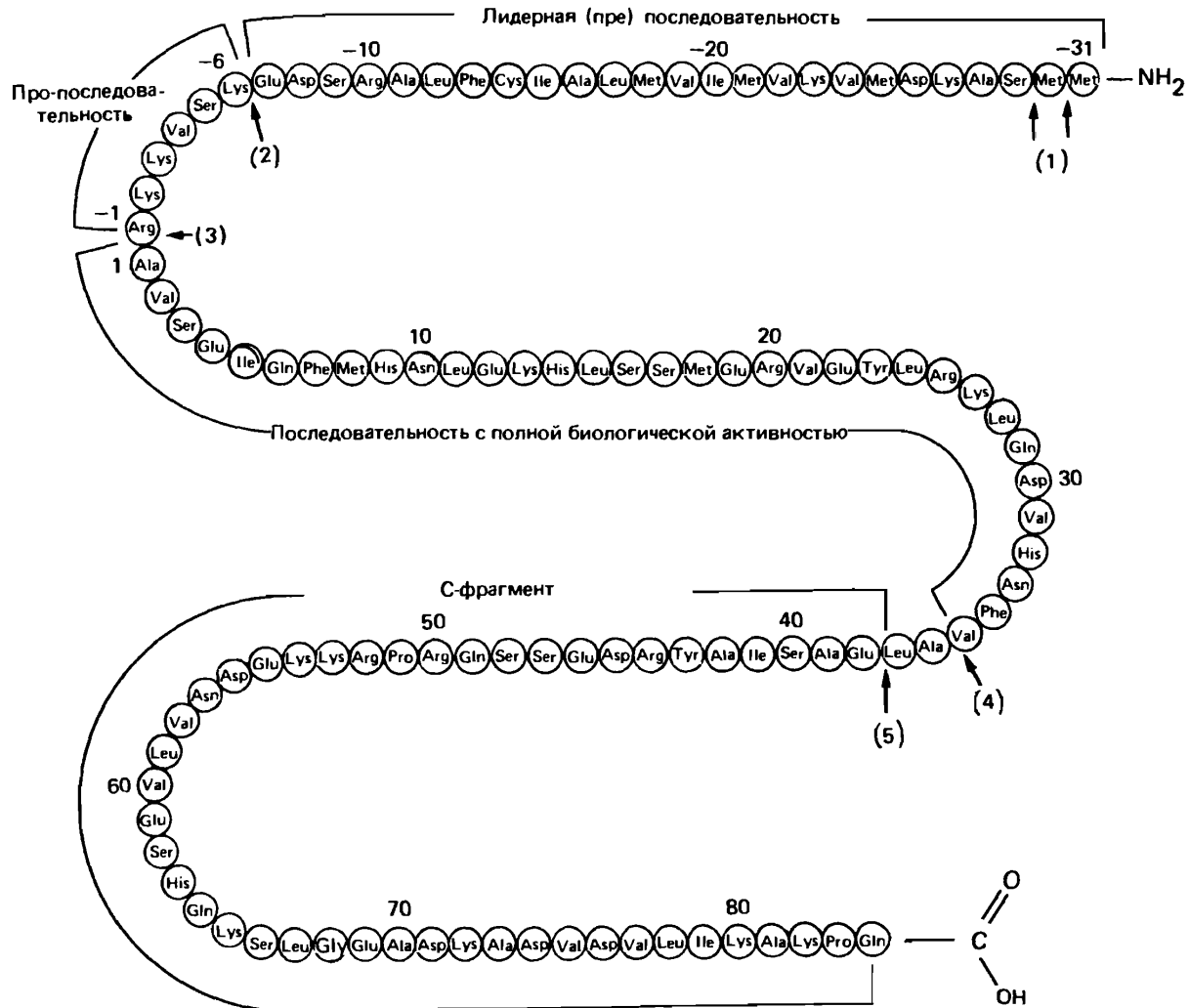


Рис. 47.1. Структура препаратиреоидного гормона быка. Стрелками указаны участки ферментативного расщепления, осуществляемого при процессинге гормона в паращитовидной железе (1–5) и после секретиции гормона — в печени (4,5). К биологически активной области молекулы присоединена последовательность, не участвующая в проявлении опосредованной рецепторами активности. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Habener J. F.. Recent advances in parathyroid hormone research. Clin. Biochem 1981; 14:223.)

для секреторных белков) гидрофобными свойствами. Полная структура препроПТГ и последовательности проПТГ и ПТГ показаны на рис. 47.1.

ПрепроПТГ оказался первым идентифицированным препрогормоном. Последовательные стадии его превращения в ПТГ показаны на рис. 47.2. По мере того как молекулы препроПТГ синтезируются на рибосомах, происходит их перенос внутрь цистерн эндоплазматического ретикулума. Во время переноса отщепляется пропептид из 25 аминокислотных остатков (сигнальный или лидерный пептид) и образуется проПТГ. Далее проПТГ транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит ферментативное отщепление пропептида и образование конечного продукта — ПТГ. Из аппарата Гольджи ПТГ поступает в секреторные пузырьки (везикулы) и далее этот гормон может 1) накапливаться, 2) распадаться, 3) немедленно секретироваться.

Участие ПТГ в минеральном гомеостазе

А. Кальцевый гомеостаз. На центральную роль ПТГ в обмене кальция указывает следующее наблюдение: в процессе эволюции этот гормон впервые появляется у животных, пытающихся адаптироваться к наземному существованию. В основе физиологического механизма поддержания баланса кальция лежат долгосрочные эффекты ПТГ, который регулирует всасывание кальция в кишечнике путем стимуляции образования кальцитриола. В случаях хронической недостаточности Ca^{2+} в пище его поступление путем всасывания в кишечнике оказывается неадекватным потребностям и тогда включается сложная регуляторная система, в которой тоже участвует ПТГ. При этом ПТГ восстанавливает нормальный уровень кальция во внеклеточной жидкости путем прямого воздействия на кости и почки и опос-

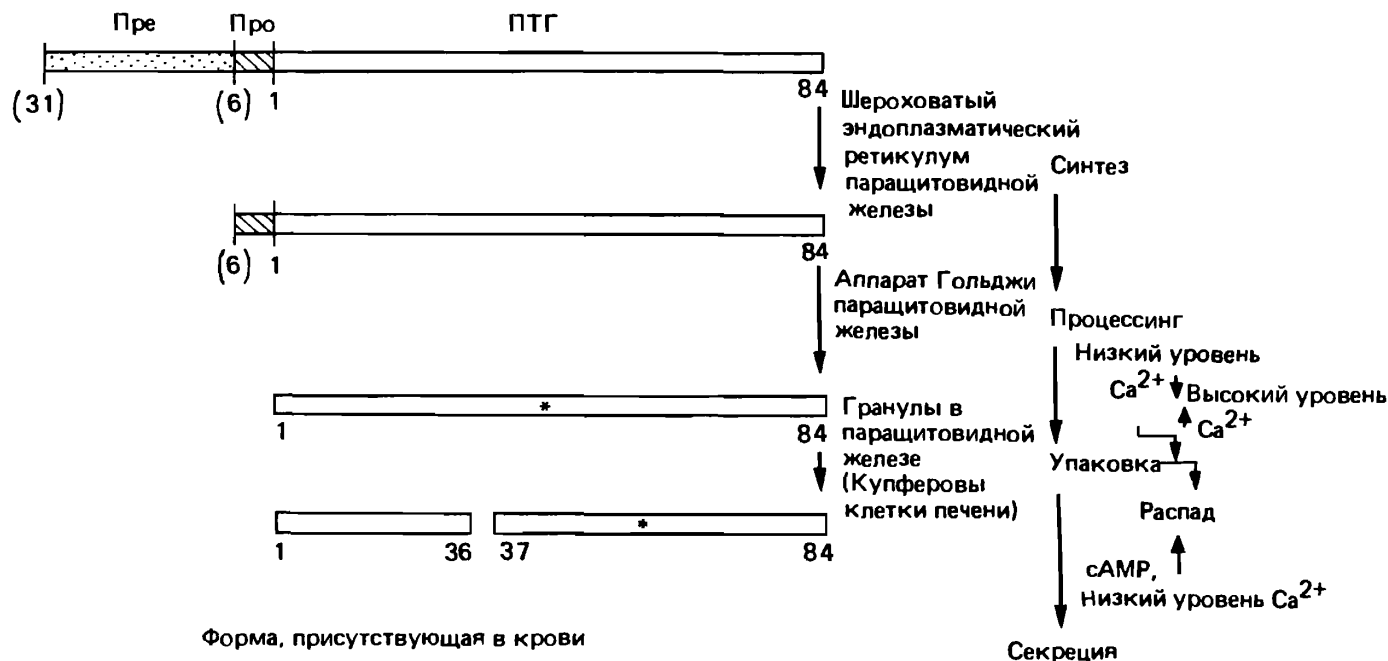


Рис. 47.2. Предшественники и продукты расщепления ПТГ и локализация отдельных этапов расщепления в парашитовидных железах и печени. Цифры в скобках соответствуют числу аминокислот в пре(31) и про(6) фрагментах.

редованного (через стимуляцию синтеза кальцитриола) на слизистую кишечника. ПТГ 1) повышает скорость растворения кости (вымывание как органических, так и неорганических компонентов), что обеспечивает переход Ca^{2+} во ВЖ; 2) снижает почечный клиренс, т. е. экскрецию кальция, тем самым способствуя повышению концентрации этого катиона во ВЖ; 3) посредством стимуляции образования кальцитриола увеличивает эффективность всасывания Ca^{2+} в кишечнике. Быстрее всего проявляется действие ПТГ на почки, но самый большой эффект дает воздействие на кости. Таким образом, ПТГ предотвращает развитие гипокальциемии при недостаточности кальция в пище, но этот эффект осуществляется за счет вещества кости.

Б. Гомеостаз фосфата. Парным кальцию ионом обычно является фосфат; кристаллы гидроксиапатита в костях состоят из фосфата кальция. Когда ПТГ стимулирует растворение минерального матрикса кости, фосфат высвобождается вместе с кальцием. ПТГ повышает также почечный клиренс фосфата. В итоге суммарный эффект ПТГ на кости и почки сводится к увеличению концентрации кальция и снижению концентрации фосфата во ВЖ. Очень важно, что тем самым предотвращается возможность перенасыщения плазмы крови кальцием и фосфатом.

Биохимия

А. Регуляция синтеза. Концентрация Ca^{2+} в среде не влияет на скорость синтеза проПТГ, но скорость

образования и секреции ПТГ значительно возрастает при снижении концентрации Ca^{2+} . Оказалось, что 80—90% синтезированного проПТГ не удается обнаружить в виде ПТГ, накапливаемого в клетках либо в среде инкубации при проведении опытов *in vitro*. Отсюда был сделан вывод, что большая часть синтезированного проПТГ быстро распадается. Позднее было обнаружено, что скорость процесса распада снижается при низких концентрациях Ca^{2+} и увеличивается при высоких. Таким образом, кальций влияет на продукцию ПТГ путем регуляции процесса распада, а не синтеза. Об уровне общего синтеза проПТГ можно судить по количеству ПТГ-мРНК; оказалось, что и оно не меняется при значительных колебаниях концентраций внеклеточного Ca^{2+} . По-видимому, увеличение синтеза ПТГ в организме может произойти лишь в результате возрастания числа и размеров вырабатывающих ПТГ главных клеток парашитовидных желез.

Б. Регуляция метаболизма. Распад ПТГ начинается спустя примерно 20 мин после синтеза проПТГ и на первоначальном этапе не зависит от концентрации Ca^{2+} ; распаду подвергаются молекулы гормона, находящиеся в секреторных везикулах. Вновь образованный ПТГ либо немедленно секретруется, либо накапливается в везикулах для последующей секреции. Процессы распада начинаются после того, как секреторные везикулы попадают в компартмент накопления.

В ходе протеолитического расщепления ПТГ образуются весьма специфические фрагменты (рис.

47.1 и 47.2), причем большое количество С-концевых фрагментов ПТГ поступает в кровь. Их молекулярная масса составляет около 7000. В основном это последовательность ПТГ₃₇₋₈₄, в меньшей степени — ПТГ₃₄₋₈₄. Большая часть новосинтезированного ПТГ подвергается протеолизу; в целом на один моль интактного ПТГ секретируются примерно два моля С-концевых фрагментов. Таким образом, ПТГ в крови представлен в основном этими молекулами. Биологическая роль С-концевых фрагментов ПТГ не выявлена, но возможно, что они удлиняют время существования гормона в кровотоке. В ткани паращитовидных желез был обнаружен ряд протеолитических ферментов, в том числе **катепсины В и D**. Катепсин В расщепляет ПТГ на два фрагмента — ПТГ₁₋₃₆ и ПТГ₃₇₋₈₄; последний не подвергается дальнейшему протеолизу, а ПТГ₁₋₃₆ быстро последовательно расщепляется до ди- и трипептидов. ПроПТГ не поступает в кровь; ПТГ₁₋₃₄ выходит из железы в минимальных количествах (если вообще выходит). ПрепроПТГ удалось идентифицировать путем расшифровки кодирующей последовательности гена ПТГ. Протеолиз ПТГ проходит в основном в паращитовидной железе, но, кроме того, как показано в ряде работ, секретированный ПТГ подвергается протеолизу и в других тканях. Однако вклад этого протекающего вне эндокринной железы процесса в общий протеолитический распад ПТГ не определен; неизвестно также, какие протеазы участвуют в расщеплении и насколько сходны последовательность и продукты протеолиза.

В периферическом обмене секретированного ПТГ участвуют печень и почки. После гепатэктомии фрагменты 34—84 практически исчезают из крови, из чего следует, что печень служит основным органом, в котором они образуются. Роль почек состоит, по-видимому, в удалении из крови и экскреции этих фрагментов. **Периферический протеолиз** протекает главным образом в **купферовых клетках**, выстилающих просвет синусоидов печени. Эндопептидаза, ответственная за начальный этап протеолиза (расщепление на N- и С-концевые фрагменты), локализована на поверхности этих макрофагоподобных клеток, непосредственно контактирующих с плазмой крови. Этот фермент, который также является катепсином В, расщепляет ПТГ между 36 и 37 остатками; аналогично событиям в паращитовидной железе образовавшийся С-концевой фрагмент продолжает циркулировать в кровотоке, а N-концевой быстро распадается.

В. Регуляция секреции. Секреция ПТГ находится в обратной зависимости от концентрации ионов кальция и магния в среде, а также от уровня иммунореактивного ПТГ в крови. Как показано на рис. 47.3, между содержанием ПТГ в сыворотке крови и концентрацией кальция в ней (в пределах от 4 до 10,5 мг% сыворотки) существует линейная зависимость.

Присутствие биологически активного ПТГ в сыворотке крови в случаях, когда уровень кальция достигает 10,5 мг% и более, служит признаком **гиперпаратиреоза**.

Существует также линейная зависимость между высвобождением ПТГ и уровнем сАМР в клетках паращитовидных желез. Вероятно, эта зависимость опосредована изменениями уровня Ca^{2+} в клетках, поскольку между внутриклеточными концентрациями Ca^{2+} и сАМР существует обратная связь. В основе ее может лежать хорошо известный активирующий эффект кальция на фосфодиэстеразу (через Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу) либо ингибирующий эффект (по аналогичному механизму) на аденилатциклазу. Фосфат не влияет на секрецию ПТГ.

В паращитовидных железах сравнительно мало накопительных гранул, и количество гормона в них может обеспечить максимальную секрецию лишь в течение 1,5 ч. Это составляет контраст с островковой тканью поджелудочной железы, где содержание инсулина достаточно для нескольких дней секреции, а также со щитовидной железой, содержащей запас гормона на несколько недель. Таким образом, процессы синтеза и секреции ПТГ должны идти беспрепятственно.

Механизм действия

А. Рецептор ПТГ. ПТГ связывается с мембранным рецептором, представленным простым белком с мол. массой около 70 000. В клетках почек и кости

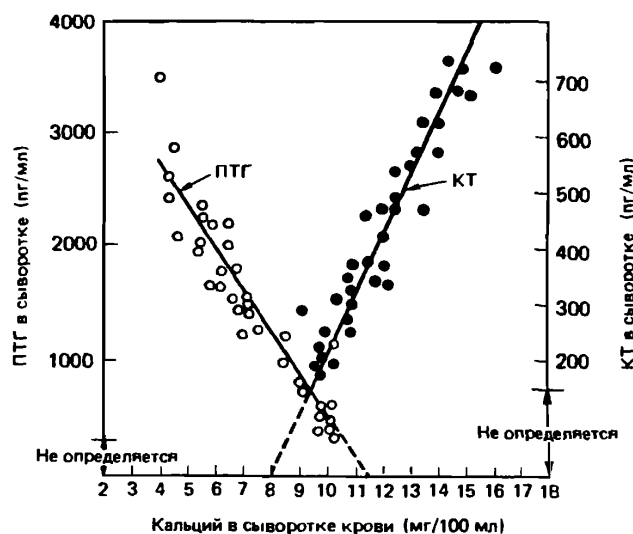


Рис. 47.3. Концентрация кальцитонина (КТ) и паратиреоидного гормона (ПТГ) как функция концентрации кальция в плазме крови. (Modified and reproduced, with permission, from Arnaud C. D., Littledike T., Tsao H. S. Calcium homeostasis and the simultaneous measurement of calcitonin and parathyroid hormone in pig. Pages 95 - 101. In: Calcitonin: Proc. of the 2 nd intern. Symp. Taylor S. (ed.). Heinemann, 1969.)

рецепторы, по-видимому, идентичны; в клетках, не являющихся мишенями ПТГ, этот белок отсутствует. Взаимодействие гормона с рецептором инициирует типичный каскад событий: активация аденилатциклазы — увеличение клеточной концентрации сАМР — увеличение содержания кальция в клетке — фосфорилирование специфических внутриклеточных белков киназами — активация определенных внутриклеточных ферментов или белков, определяющих в конечном счете биологическое действие гормона. Система, отвечающая на действие ПТГ, подобно системам других белковых и пептидных гормонов, является объектом **понижающей регуляции** количества рецепторов; кроме того, ей свойствен феномен «десенситизации», механизм которой связан не с увеличением содержания сАМР, а с последующими реакциями каскада.

Б. Влияние ПТГ на кости. ПТГ проявляет множественные эффекты на костную ткань, влияя, по-видимому, на разные типы ее клеток. Суммарный эффект ПТГ — деструкция кости, сопровождающаяся высвобождением кальция, фосфора и элементов органического матрикса, в том числе продуктов распада коллагена. Клетками, ответственными за этот процесс, могут быть **остеокласты**, относительно которых доказано, что они разрушают кость при хронической стимуляции посредством ПТГ, либо остециты, которые тоже способны резорбировать кость. Возможно, ПТГ стимулирует дифференцировку клеток-предшественников и их превращение в клетки, резорбирующие кость. В низких концентрациях, вероятно соответствующих физиологическим, ПТГ оказывает анаболический эффект и ответствен за перестройку кости. При воздействии этих концентраций гормона наблюдается увеличение числа **остеобластов**, возрастание активности щелочной фосфатазы, свидетельствующее о формировании новой костной ткани, и повышенное включение радиоактивной серы (в виде сульфата) в хрящ. В действии ПТГ на кость перmissive роль может играть кальцитриол.

Внутриклеточным посредником ПТГ служит, видимо, Ca^{2+} . Первое проявление эффекта ПТГ состоит в снижении концентрации Ca^{2+} в перикеллюлярном пространстве и возрастании его внутри клетки. Увеличение внутриклеточного кальция стимулирует синтез РНК в клетках кости и высвобождение ферментов, участвующих в резорбции кости. Эти процессы, по-видимому, опосредованы присоединением кальция к кальмодулину. В отсутствие внеклеточного кальция ПТГ по-прежнему повышает концентрацию сАМР, но уже не стимулирует резорбцию кости. Таким образом, важным условием для проявления стимулирующего действия ПТГ на резорбцию кости может быть парадоксальное увеличение входа ионизированного кальция в резорбирующие кость клетки.

В. Влияние ПТГ на почки. ПТГ оказывает на почки целый ряд эффектов, а именно он влияет на транспорт некоторых ионов и регулирует синтез кальцитриола. В нормальных условиях свыше 90% Ca^{2+} , содержащегося в клубочковом фильтрате, подвергается ресорбции (реабсорбции), но ПТГ увеличивает эту величину до 98% и более. Ресорбция фосфата в норме составляет 75—90% в зависимости от диеты и некоторых других факторов; ПТГ тормозит ресорбцию фосфата независимо от ее базального уровня. ПТГ ингибирует также транспорт ионов натрия, калия и бикарбоната. Эффект ПТГ на метаболизм кальцитриола (см. ниже) осуществляется, видимо, через те же участки (сайты) клеток, что и действие на минеральный обмен.

При вливании ПТГ наблюдается быстрое увеличение концентрации сАМР в почечных клетках и выведение сАМР с мочой. Этот эффект предшествует характерной для действия ПТГ фосфатурии и, очевидно, ответствен за нее. ПТГ-стимулируемая аденилатциклаза находится в базолатеральной части клеток, расположенных в кортикальных участках почечных канальцев; она отличается от аденилатциклазы почек, стимулируемой кальцитонином, катехоламином и АДГ. Внутриклеточные белки — рецепторы сАМР (т. е., как принято считать, протеинкиназы) — выявляются в щеточной каемке этих клеток, на люминальной поверхности канальцев. Следовательно, сАМР, синтезированная под влиянием ПТГ, мигрирует от базолатеральной области клетки к ее поверхности, обращенной в просвет канальца, где и оказывает эффект на транспорт ионов.

Кальций, видимо, вовлечен в механизм действия ПТГ на почки. В самом деле, первый физиологический эффект введения ПТГ — снижение содержания Ca^{2+} во внеклеточной жидкости и увеличение его внутри клетки. Однако эти сдвиги происходят после изменения внутриклеточной концентрации сАМР, так что в почках связь между током Ca^{2+} в клетки и действием ПТГ не столь отчетлива, как в кости.

Г. Влияние ПТГ на слизистую кишечника. ПТГ, по-видимому, не оказывает прямого эффекта на транспорт Ca^{2+} через слизистую кишечника, но он служит решающим фактором регуляции биосинтеза кальцитриола (см. ниже) и оказывает безусловно важное не прямое действие на кишки.

Патофизиология

Недостаток ПТГ приводит к **гипопаратиреозу**. Биохимические признаки этого состояния — сниженный уровень ионизированного кальция и повышенный уровень фосфата в сыворотке крови. К числу симптомов относится высокая нейромышечная возбудимость, вызывающая (при умеренной тяжести) судороги и тетанические сокращения мышц. Тяжелая острая гипокальциемия ведет к тета-

ническому параличу дыхательных мышц, ларингоспазму, сильным судорогам и смерти. Длительная гипокальциемия сопровождается изменениями в коже, развитием катаракт и кальцификацией базальных ганглиев мозга. Причиной гипопаратиреоза обычно служит случайное удаление или повреждение паратиреоидных желез при операциях на шее (вторичный гипопаратиреоз), но иногда болезнь возникает вследствие аутоиммунной деструкции паратиреоидных желез (первичный гипопаратиреоз).

Псевдогипопаратиреоз обсуждается в гл. 44. При этом наследственном заболевании эндокринная железа продуцирует биологически активный ПТГ, но органы-мишени к нему резистентны, т. е. он не оказывает эффекта. В результате возникают те же биохимические сдвиги, что и при гипопаратиреозе. Они сопряжены обычно с такими нарушениями развития, как малый рост, укороченные пястные и плюсневые кости, задержка умственного развития. Существует несколько типов псевдогипопаратиреоза; их связывают 1) с частичным дефицитом регуляторного G_s -белка аденилатциклазного комплекса либо 2) с нарушением какого-то этапа, не относящегося к механизму образования cAMP.

Гиперпаратиреоз, т. е. избыточная продукция ПТГ, возникает, как правило, вследствие **аденомы паратиреоидных желез**, но может быть обусловлен и их **гиперплазией** либо эктопической продукцией ПТГ злокачественной опухолью. Биохимические критерии гиперпаратиреоза — повышенные уровни ионизированного кальция и ПТГ и сниженный уровень фосфата в сыворотке крови. В запущенных случаях гиперпаратиреоза можно наблюдать выраженную резорбцию костей скелета и различные повреждения почек, включая камни в почках, нефрокальциноз, частое инфицирование мочевых путей и (в отдельных случаях) снижение функции почек. **Вторичный гиперпаратиреоз**, характеризующийся гиперплазией паратиреоидных желез и гиперсекрецией ПТГ, можно наблюдать у больных с почечной недостаточностью. Считается, что развитие гиперпаратиреоза у этих больных обусловлено снижением синтеза $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ из 25-OH-D_3 в патологически измененной паренхиме почек и, как следствие, нарушением всасывания кальция в кишечнике; это нарушение в свою очередь вызывает вторичное высвобождение ПТГ как компенсаторную реакцию организма, направленную на поддержание нормальных уровней кальция во ВЖ.

лет и сильно выраженными, уродующими деформациями костей, — был широко распространен в Северной Америке и Западной Европе в начале века. Результаты серии исследований позволили предположить, что рахит обусловлен недостаточностью какого-то компонента диеты. После того как было обнаружено, что рахит можно предотвратить добавлением в пищу жира тресковой печени, но при этом не витамин А является ее активным компонентом, этот фактор предупреждения рахита обозначили как **жирорастворимый витамин D**. Примерно в то же время было показано, что ультрафиолетовое облучение (искусственное или солнечным светом) также предупреждает развитие заболевания. В последующем было выявлено заболевание взрослых, эквивалентное рахиту, а именно **остеомаляция**. Это заболевание, характеризующееся нарушением минерализации костей, также поддавалось лечению витамином D. В развитии дальнейших исследований ключевую роль сыграли данные, показавшие, что лечение витамином D больных, имевших повреждения печени или почек, не давало ожидаемого эффекта. На протяжении последних 50 лет велось изучение структуры витамина D и механизма его действия, причем особенно быстро оно продвинулось в последнее десятилетие.

Б. Роль в гомеостазе. Основная биологическая роль кальцитриола — это **стимуляция всасывания кальция и фосфата в кишечнике**. Кальцитриол — единственный гормон, способствующий транспорту кальция против концентрационного градиента, существующего на мембране клеток кишечника. Поскольку продукция кальцитриола очень строго регулируется (рис. 47.4), очевидно, что существует тонкий механизм, поддерживающий уровень Ca^{2+} во ВЖ, несмотря на значительные колебания в содержании кальция в пище. Этот механизм поддерживает такие концентрации кальция и фосфата, которые необходимы для образования кристаллов гидроксиапатита, откладывающихся в коллагеновых фибриллах кости. При недостаточности витамина D (кальцитриола) замедляется формирование новых костей и нарушается обновление (ремоделирование) костной ткани. В регуляции этих процессов участвует в первую очередь ПТГ, воздействующий на клетки кости, но при этом необходим и кальцитриол в небольших концентрациях. Кальцитриол способен также усиливать действие ПТГ на реабсорбцию кальция в почках.

Биохимия

А. Биосинтез. Кальцитриол — это во всех отношениях гормон. Он образуется в сложной последовательности ферментативных реакций, которая включает перенос кровью молекул-предшественников, поступающих в различные ткани (рис. 47.4). Далее

2. КАЛЬЦИТРИОЛ [$1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$]

Общие положения о роли кальцитриола в гомеостазе кальция

А. История вопроса. Рахит — заболевание детей, характеризующееся нарушением минерализации ске-

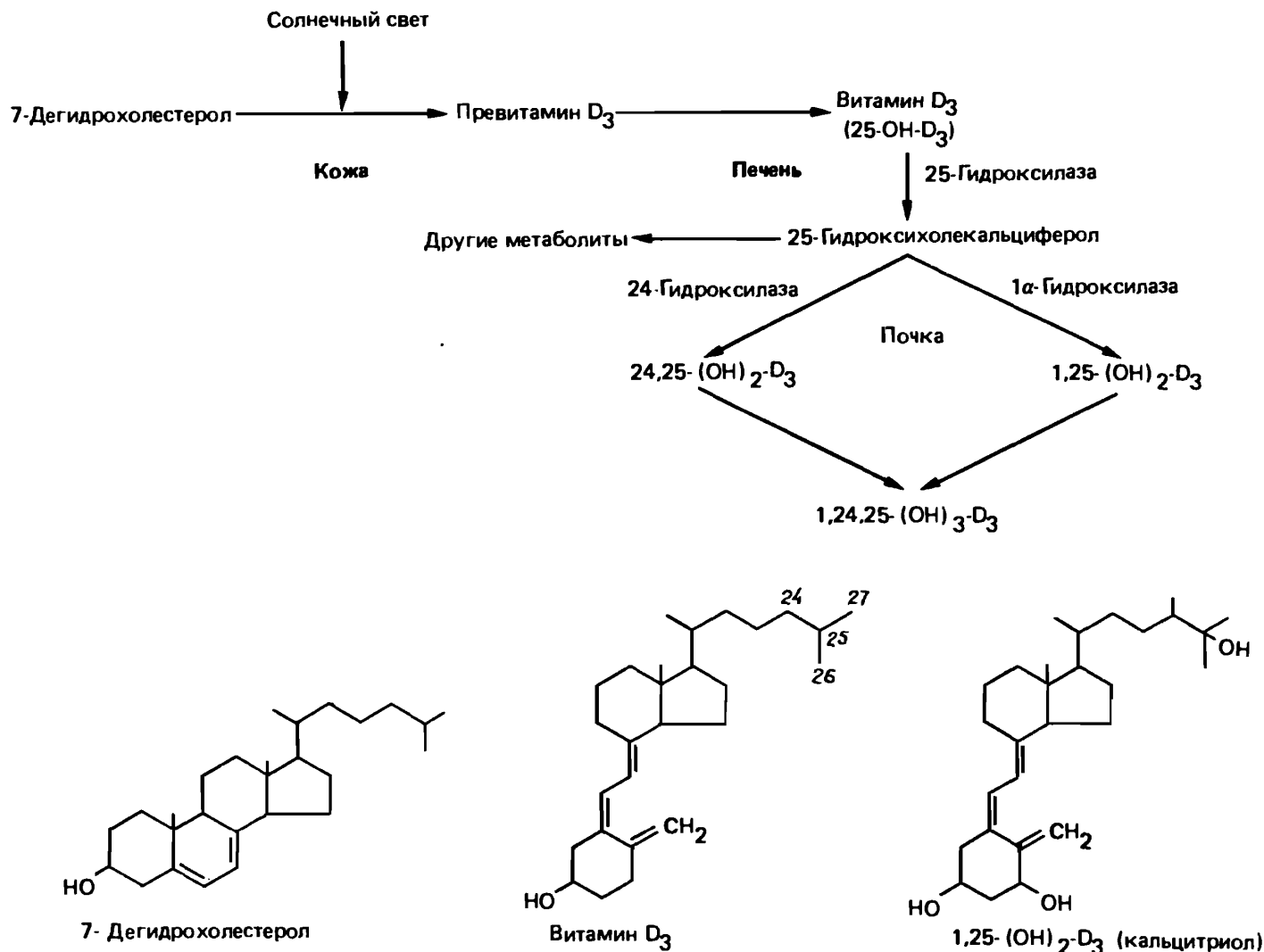


Рис. 47.4. Образование и гидроксилирование витамина D₃. 25-Гидроксилирование происходит в печени, гидроксилирование по иным положениям - в почках. Вполне вероятно образование 25, 26-(OH)₂-D₃ и 1, 25, 26-(OH)₃-D₃. Изображены формулы 7-дегидрохолестерола, витамина D₃ и 1,25-(OH)₂-D₃ (кальцитриола). (Reproduced, with permission, from Ganong W. F. Review of Medical Physiology, 13th. ed. Appleton and Lange, 1987.)

активное соединение — кальцитриол — транспортируется в другие органы, где активирует определенные биологические процессы по механизму, сходному с механизмом действия стероидных гормонов.

1. Кожа. Небольшие количества витамина D содержатся в продуктах питания (жир, печень рыб, желток яйца), но большая часть витамина D, используемого в синтезе кальцитриола, образуется в мальпигиевом слое эпидермиса из 7-дегидрохолестерола в ходе неферментативной, зависимой от ультрафиолетового света реакции **фотолиза**. Активность процесса находится в прямой зависимости от интенсивности облучения и в обратной — от степени пигментации кожи. С возрастом содержание 7-дегидрохолестерола в эпидермисе снижается, что может иметь прямое отношение к развитию отрицательного баланса кальция у стариков.

2. Печень. Специфический транспортный белок, называемый **D-связывающим белком**, связывает витамин D₃ и его метаболиты и переносит D₃ от кожи или кишечника в печень, где он подвергается 25-гидроксилированию, составляющему первый обязательный этап в образовании кальцитриола. 25-Гидроксилирование происходит в эндоплазматическом ретикулуме в ходе реакции, протекающей с участием магния, NADPH, молекулярного кислорода и неидентифицированного цитоплазматического фактора. В реакции участвуют два фермента: NADPH-зависимая цитохром *P-450*-редуктаза и цитохром *P-450*. Реакция не регулируется; она протекает не только в печени, но (с малой интенсивностью) также в почках и кишках. Продукт реакции 25-OH-D₃ поступает в плазму крови (составляя основную форму витамина D, присутствующего в крови)

и при посредстве D-связывающего белка транспортируется в почки.

3. Почки. 25-OH-D₃ является слабым агонистом; для проявления полной биологической активности это соединение должно быть модифицировано путем гидроксилирования при C-1. Это происходит в митохондриях проксимальных извитых почечных канальцев в ходе сложной монооксигеназной реакции, протекающей при участии NADPH, Mg²⁺, молекулярного кислорода и по крайней мере трех ферментов: 1) почечной ферредоксин-редуктазы (флавопротеин), 2) почечного ферредоксина (железосодержащий сульфопротейн) и 3) цитохрома P-450. В этой системе образуется 1,25-(OH)₂-D₃—самый активный из природных метаболитов витамина D.

4. Другие ткани. В плаценте содержится 1α-гидроксилаза, которая, по-видимому, играет важную роль как источник внепочечного кальцитриола. Активность этого фермента выявляется и в других тканях, включая костную, однако физиологическое значение фермента этих тканей минимально, судя по тому, что у небеременных животных после нефрэктомии уровень кальцитриола очень низок.

Б. Регуляция метаболизма и синтеза. Подобно другим стероидным гормонам, кальцитриол является объектом жесткой регуляции по механизму обратной связи (рис. 47.4 и табл. 47.1). У интактных животных низкое содержание кальция в пище и гипокальциемия вызывают значительное повышение 1α-гидроксилазной активности. В механизме этого эффекта участвует ПТГ, который также высвобождается в ответ на гипокальциемию. Роль ПТГ при этом пока не ясна, но установлено, что он стимулирует 1α-гидроксилазную активность как у D-авитаминозных животных, так и у животных, получавших витамин D. Недостаток фосфора в диете и гипофосфатемия тоже индуцируют 1α-гидроксилазную активность, но служат, видимо, более слабым стимулом, чем гипокальциемия.

Кальцитриол—важный регулятор своего собственного продуцирования. Повышение уровня кальцитриола тормозит 1α-гидроксилазу почек и активирует синтез 24-гидроксилазы, что ведет к образо-

ванию побочного продукта—24,25-(OH)₂-D₃, лишённого, по-видимому, биологической активности. Эстрогены, прогестероны и андрогены значительно увеличивают количество 1α-гидроксилазы у овулирующих (несущихся) птиц. Какую роль в синтезе кальцитриола играют эти гормоны (наряду с инсулином, гормоном роста и пролактином) у млекопитающих, остается неясным.

Стерольная структура, составляющая основу кальцитриола, может подвергаться модификациям в альтернативных метаболических последовательностях, а именно гидроксилироваться по положениям 1, 23, 24, 25 и 26 с образованием различных лактонов. Было обнаружено свыше 20 метаболитов, но ни для одного из них не удалось однозначно доказать наличие биологической активности.

Механизм действия

Действие кальцитриола на клеточном уровне аналогично действию других стероидных гормонов (рис.47.5). В исследованиях, проведенных с радиоактивным кальцитриолом, было показано, что он накапливается в ядре клеток кишечных ворсинок и крипт, а также остеобластов и клеток дистальных почечных канальцев. Кроме того, он был обнаружен в ядре клеток, в отношении которых и не предполагалось, что они являются клетками-мишенями кальцитриола; речь идет о клетках мальпигиевого слоя кожи и островков Лангерганса поджелудочной железы, некоторых клетках головного мозга, а также некоторых клетках гипофиза, яичников, семенников, плаценты, матки, грудных желез, тимуса, клетках-предшественниках миелоидного ряда. Связывание кальцитриола было обнаружено и в клетках паратимических желез, что крайне интересно, так как указывает на возможное участие кальцитриола в регуляции обмена ПТГ.

А. Рецептор кальцитриола. Присутствующий в клетках кишечника белок с мол. массой 90 000—100 000 связывает кальцитриол с высокой степенью сродства и малой емкостью. Связывание насыщаемо, специфично и обратимо. Таким образом, этот белок отвечает основным критериям, характеризующим рецептор; он обнаружен во многих из перечисленных выше тканей. Если при анализе используют физиологические концентрации солей, то большая часть незанятого рецептора выявляется в ядре в связанном с хроматином виде. Это аналогично локализации рецепторов если не всех стероидных гормонов, то во всяком случае прогестерона и T₃. Остается не ясным, требуется ли для связывания с хроматином предварительная активация комплекса кальцитриол—рецептор, как это имеет место с типичными стероид-рецепторными комплексами.

Б. Кальцитриол-зависимые генные продукты. Как известно уже на протяжении ряда лет, изменение

Таблица 47.1. Регуляция почечной 1α-гидроксилазы

Первичные регуляторы	Вторичные регуляторы
Гипокальциемия (↑)	Эстрогены
ПТГ (↑)	Андрогены
Гипофосфатемия (↑)	Прогестерон
Кальцитриол (↑)	Инсулин
	Гормон роста
	Пролактин
	Тиреоидный гормон

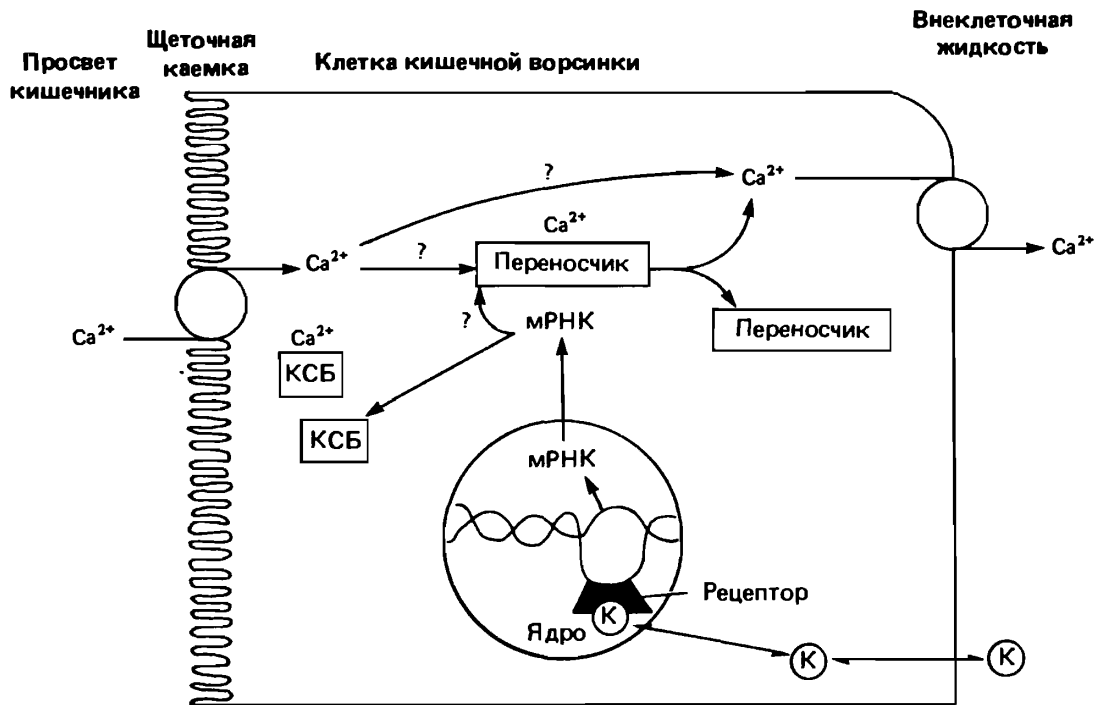


Рис. 47.5. Кальцитриол (К) функционирует подобно другим стероидным гормонам. Он индуцирует генные продукты, обеспечивающие перенос кальция из просвета кишечника во внеклеточную жидкость. КСБ — кальций-связывающий белок.

процессов транспорта в кишечных клетках в ответ на добавление кальцитриола требует участия РНК и синтеза белка. Исследования, показавшие связывание в ядре рецепторов кальцитриола с хроматином, позволили предположить, что кальцитриол стимулирует транскрипцию генов и образование специфических мРНК. Действительно, удалось выявить один такой пример, а именно индукцию мРНК, кодирующей кальций-связывающий белок (КСБ).

Существует несколько цитозольных белков, связывающих Ca^{2+} с высокой степенью сродства. Часть из них принадлежит к группе кальцитриол-зависимых. В группу входит несколько белков, различающихся по молекулярной массе, антигенности и тканевому происхождению (кишки, кожа, кость). Из этих белков лучше всего изучен КСБ клеток кишечника. У D-авитаминозных крыс КСБ в таких клетках практически отсутствует; в целом концентрация КСБ в высокой степени коррелирует с количеством кальцитриола ядерной локализации.

В. Влияние кальцитриола на слизистую кишечника. Для переноса Ca^{2+} и PO_4^{3-} через слизистую кишки необходимы 1) захват и перенос через мембрану щеточной каемки и микроворсинок, 2) транспорт через мембрану клеток слизистой, 3) выведение через базальную латеральную мембрану во ВЖ. Совершенно очевидно, что кальцитриол активирует один или более из этих этапов, но конкретный механизм его действия не установлен. Предполагалось, что непосредственное участие в этом принимает КСБ, но впоследствии было показано, что перенос

Ca^{2+} происходит через 1—2 ч после введения кальцитриола, т. е. задолго до увеличения концентрации КСБ в ответ на кальцитриол. Вероятно, КСБ, связывая Ca^{2+} , защищает от него клетки слизистой в периоды активного транспорта этого иона. Некоторые исследователи продолжают поиски белков, могущих участвовать в транспорте Ca^{2+} , тогда как другие считают, что этот процесс, в особенности начальное увеличение тока Ca^{2+} , может быть опосредован изменением заряда мембраны. Обсуждается также роль метаболитов полифосфоинозитидов.

Г. Влияние кальцитриола на другие ткани. О действии кальцитриола на иные ткани известно гораздо меньше. Его ядерные рецепторы выявлены в клетках кости, причем показано, что обусловленное кальцитриолом увеличение концентрации Ca^{2+} сопряжено с синтезом РНК и белка. Однако генные продукты, предположительно индуцируемые кальцитриолом, не идентифицированы; не известен также механизм связи между кальцитриолом и ПТГ в их действии на клетки кости.

Любопытное указание на роль кальцитриола в клеточной дифференровке получено в исследованиях, продемонстрировавших, что этот гормон способствует превращению клеток промиелоцитарной лейкемии в макрофаги. Поскольку, как предполагают, остеокласты либо являются родственными макрофагам клетками, либо непосредственно происходят из них, вполне вероятно, что кальцитриол участвует в этом процессе, способствуя дифференровке клеток кости.

Патофизиология

Рахит — заболевание детского возраста, которое характеризуется низким уровнем кальция и фосфата в плазме крови и нарушением минерализации костей, ведущим к деформациям скелета. Чаще всего рахит вызывается недостатком витамина D. Различают два типа наследственного витамин D-зависимого рахита. Тип I обусловлен аутосомным рецессивным геном, детерминирующим нарушение превращения 25-ОН-D₃ в кальцитриол. Тип II представляет собой аутосомный рецессивный дефект, при котором, по всей видимости, отсутствуют рецепторы кальцитриола.

У взрослых недостаточность витамина D вызывает **остеомаляцию**. При этом наблюдается снижение как всасывания кальция и фосфата, так и уровня этих ионов во ВЖ. Вследствие этого нарушается минерализация остеоида и формирование кости; такая недостаточная минерализация костей обуславливает их структурную слабость. В случаях когда значительная часть паренхимы почек повреждена патологическим процессом или утрачена, образование кальцитриола снижается и соответственно уменьшается всасывание кальция. Последующая гипокальциемия вызывает компенсаторное увеличение секреции ПТГ, который воздействует на костную ткань таким образом, чтобы вызвать увеличение уровня Ca²⁺ во ВЖ. Этому сопутствует интенсивное обновление костей, их структурные изменения; развиваются симптомы заболевания, известного как почечная остеодистрофия. Своевременное, на ранней стадии лечение витамином D позволяет ослабить проявление болезни.

3. КАЛЬЦИТОНИН (КТ)

Происхождение и структура

Кальцитонин (КТ) — пептид, состоящий из 32 аминокислотных остатков (рис. 47.6); у человека он секретируется парафолликулярными К-клетками щитовидной железы (реже — паращитовидной железы или тимуса), а у других видов — аналогичными клетками, расположенными в ultimobranchialных железах. Эти клетки происходят из нервного гребешка и в биологическом отношении родственны клеткам многих других эндокринных желез.

Для проявления биологической активности необходима вся молекула КТ целиком, включая 7-членную N-концевую петлю, образованную с помощью цистеинового мостика. Существует огромная межвидовая вариабельность в аминокислотной последовательности кальцитонинов (в КТ человека и свиньи имеется только 14 общих аминокислотных остатков из 32), но несмотря на различия, они проявляют перекрестно-видовую биологическую актив-

ность (т. е. КТ одного вида животных биологически активен при введении животным других видов). Самый активный из природных КТ был выделен из лосося.

Регуляция секреции

Уровни секреции КТ и ПТГ связаны обратной зависимостью (рис. 43.3) и регулируются концентрацией ионизированного кальция (и, вероятно, магния) во ВЖ. Секреция КТ возрастает пропорционально концентрации Ca²⁺ при изменении последней в пределах от 9,5 до 15 мг%. Мощными стимуляторами секреции КТ служат глюкагон и пентагастрин, причем последний используется в качестве провоцирующего агента при диагностирующем тестировании модулярной тиреокарциномы (злокачественное перерождение парафолликулярных К-клеток).

Механизм действия

История изучения КТ уникальна. За семь лет (1962—1968) КТ был открыт, выделен, секвенирован и синтезирован, но его роль в физиологии человека до сих пор не вполне ясна. Удаление щитовидной железы у животных не вызывает гиперкальциемии, а введение КТ здоровым испытуемым не приводит к заметному снижению уровня кальция в крови.

В тест-системах первичной мишенью КТ служит кость, где этот гормон тормозит резорбцию матрикса и тем самым снижает высвобождение кальция и фосфата. Этот эффект КТ не зависит от ПТГ. КТ увеличивает содержание cAMP в кости, влияя, по-

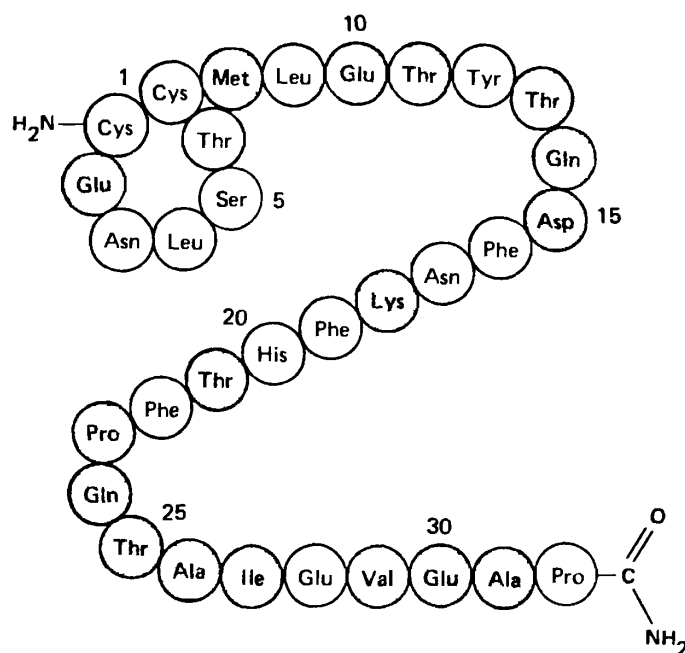


Рис. 47.6. Структура кальцитонина человека.

видимому, на те клетки, которые не являются мишенями ПТГ.

КТ оказывает также значительный эффект на метаболизм фосфата. Он способствует входу фосфата в клетки кости и периостальную жидкость, снижая при этом выход кальция из костей в плазму крови. Этот вход фосфата может сопровождаться и входом кальция, судя по тому, что гипокальциемический эффект КТ зависит от фосфата. Такое действие КТ наряду с его способностью тормозить опосредованную остеокластами резорбцию костей позволяет объяснить эффективность применения данного гормона в борьбе с гиперкальциемией при раке.

Патофизиология

Клинические проявления недостаточности КТ не выявлены. Избыточность КТ наблюдается при медуллярной тиреокарциноме (МТК)—заболевании, которое может быть спорадическим или семейным. Уровень КТ при МТК нередко в тысячи раз превышает норму, однако это очень редко сопровождается гипокальциемией. Хотя биологическое значение такого возрастания уровня КТ не понятно, сам по себе этот факт важен в диагностическом отношении. Измерение КТ в плазме крови, причем часто на фоне

провоцирующих секрецию агентов—кальция или пентагастрина, позволяет диагностировать это тяжелое заболевание на ранней стадии, когда оно поддается лечению.

ЛИТЕРАТУРА

- Cohn D. V., Elting J.* Biosynthesis, processing, and secretion of parathormone and secretory protein-1, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1983, **39**, 181.
- Copp C. H.* Parathyroids, calcitonin and control of plasma calcium, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1964, **20**, 59.
- DeLuca H. F., Schnoes H. K.* Vitamin D: Recent advances, *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, **52**, 411.
- Norman A. W., Roth J., Orci L.* The vitamin D endocrine system: Steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding). *Endocr. Rev.*, 1982, **3**, 331.
- Potts J. T. Jr., Kronenberg H. M., Rosenblatt M.* Parathyroid hormone: Chemistry, biosynthesis and mode of action, *Adv. Protein Chem.*, 1982, **35**, 323.
- Rosenblatt M.* Pre-proparathyroid hormone, parathyroid hormone, and parathyroid hormone, *Clin. Orthop. (Oct.)*, 1982, **170**, 260.
- Talmadge R. V., VanderWiel C. J., Matthews J. L.* Calcitonin and phosphate, *Mol. Cell Endocrinol.*, 1981, **24**, 235.

Гормоны коры надпочечников

Дарил Греннер

Сокращения, используемые в данной главе

АКТГ — адренокортикотропный гормон (кортикотропин)
АДГ — антидиуретический гормон
ДЭА — дегидроэпиандростерон
ДОК — дезоксикортикостерон
ГР — гормон роста
ФЕП-КК — фосфоенолпируват-карбоксикиназа
ПОМК — проопиомеланокортин
ПТГ — паратиреоидный гормон
ТСГ — тироксин-связывающий глобулин

ВВЕДЕНИЕ

В коре надпочечников синтезируются десятки различных стероидов, но лишь очень немногие из них обладают биологической активностью. Эти последние составляют три класса гормонов: глюкокортикоиды, минералокортикоиды и андрогены. Механизм действия перечисленных гормонов состоит в том, что сначала они соединяются со специфическими внутриклеточными рецепторами, далее этот комплекс связывается со специфическими участками ДНК и оказывает регулирующий эффект на экспрессию генов; в результате меняется скорость синтеза некоторых белков, что в свою очередь влияет на различные метаболические процессы, например глюконеогенез, и соотношение Na^+ и K^+ .

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гормоны коры надпочечников, в особенности глюкокортикоиды, играют важную роль в адаптации к сильным стрессам. Минералокортикоиды необходимы для поддержания уровня Na^+ и K^+ . Синтетические аналоги гормонов этих классов нашли клиническое применение. В частности, многочисленные аналоги глюкокортикоидов используются как мощные противовоспалительные средства. Повышенный либо пониженный уровень в крови любого из этих трех классов гормонов (независимо от того, возник ли сдвиг от болезни или проводимой тера-

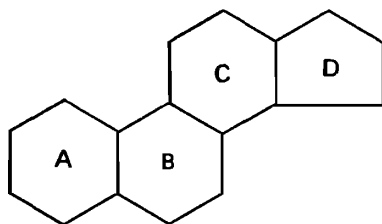
пии) приводит к очень тяжелым, иногда угрожающим жизни, осложнениям. Изучение ряда наследственных ферментных недостаточностей позволило определить основные этапы стероидогенеза, а также показать, что относительные скорости продукции различных гормонов в коре надпочечников могут подвергаться изменениям.

ЗОНЫ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Кора надпочечников взрослого человека состоит из трех четко различимых слоев, или зон. Субкапсулярная область называется **клубочковой зоной**; она связана с продукцией минералокортикоидов. Следующей идет **пучковая зона**; в ней, а также в **сетчатой зоне** вырабатываются глюкокортикоиды и андрогены.

ГОРМОНЫ

Из ткани коры надпочечников выделено и получено в кристаллической форме около 50 стероидов. Большинство из них — промежуточные продукты; только немногие секретируются в значительном количестве и совсем малое число стероидов обладает значительной гормональной активностью. Кора надпочечников вырабатывает три основных класса стероидных гормонов, которые группируются в соответствии с их преобладающим действием. 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; они оказывают разнообразные эффекты, наиболее важный из которых — стимуляция глюконеогенеза. Основной глюкокортикоид человека — это **кортизол**, образующийся в пучковой зоне. **Кортикостерон**, образуемый в пучковой и клубочковой зонах, у человека представлен в меньшем количестве, но является основным глюкокортикоидом у грызунов. **Минералокор-**



Циклопентанпергидрофенантреновое ядро

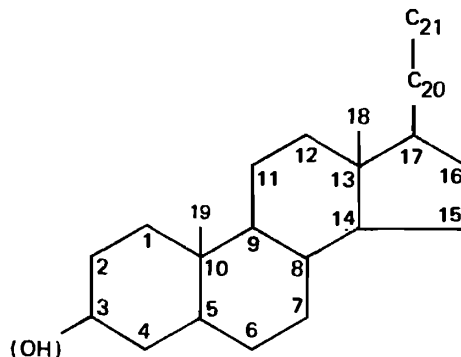
Нумерация углеродных атомов.
Заштрихованы асимметричные
атомы углерода

Рис. 48.1. Характерные элементы структуры стероидов.

тикоиды также относятся к 21-углеродным стероидам. Первичное действие этих гормонов состоит в том, что они способствуют задержке Na^+ и выделению K^+ и H^+ главным образом через почки. Самый активный гормон этого класса — **альдостерон**, образуемый только в клубочковой зоне. В пучковой и сетчатой зонах вырабатываются в значительных количествах предшественник андрогенов — **дегидроэпиандростерон** и слабый андроген — **андростендион**. Эти стероиды превращаются в более активные андрогены в тканях вне надпочечников и в случаях недостаточности ферментов стероидогенеза оказываются патологическим источником андрогенов. Что касается эстрогенов, то в норме они не продуцируются надпочечниками в заметных количествах, однако при некоторых опухолях надпочечников они могут вырабатываться; андрогены надпочечников служат основными предшественниками эстрогенов (превращение путем периферической ароматизации) у женщин в постменопаузе.

НОМЕНКЛАТУРА И ХИМИЯ СТЕРОИДОВ

Все стероидные гормоны построены на основе 17-углеродной структуры **циклопентанпергидрофенантрена**, включающей четыре кольца, обозначаемые A, B, C, D (рис. 48.1). Дополнительные атомы углерода могут присоединяться по положениям 10 и 13 или — в виде боковой цепи — по C-17. Стероидные гормоны, их метаболиты и предшественники различаются по числу и типу заместителей, числу и положению двойных связей, а также по стереохимической конфигурации. Для обозначения всех этих соединений разработана четкая номенклатура. Асимметричные атомы углерода (выделены штриховкой на рис. 48.1) определяют возможность **стереоизомерии**. Угловые метильные группы (C-19 и C-18 по положениям 10 и 13) расположены над плоскостью системы колец и именно их используют для определения пространственной ориентации стереоизомеров. Так, за-

мещения при атомах основной структуры, проецирующиеся на ту же плоскость, что и эти группы, обозначаются *цис*- или « β » и на рисунках изображаются с помощью сплошных линий. Замещения, расположенные сзади плоскости системы колец, обозначаются *транс*- или « α » и изображаются с помощью пунктирных линий. Местоположение двойных связей указывают по номеру предшествующего атома углерода (например, Δ^3 , Δ^4). Название стероидных гормонов определяется тем, содержат ли они одну угловую метильную группу (эстран, 18 атомов углерода), две угловые метильные группы (андростан, 19 атомов углерода), либо две угловые группы плюс двухуглеродная боковая цепь при C-17 (прегнан, 21 атом углерода). С помощью этой информации, а также

Таблица 48.1. Номенклатура стероидов

Приставка	Суффикс	Химическая природа
Гидрокси-	-ол	Спирты
Дигидрокси-	-диол	
-		
Оксо-(кето)-	-он	Кетоны (например, -дион = 2 кетогруппы)
<i>Цис</i> -		Расположение двух групп при C-19 по одну сторону от плоскости молекулы
<i>Транс</i> -		Расположение двух групп при C-19 по противоположным сторонам от плоскости молекулы
α -		Группа в <i>транс</i> -положении по отношению к метилу при C-19
β -		Группа в <i>цис</i> -положении по отношению к метилу при C-19
Дезокси-		Отсутствие гидроксильной группы
Изо- или эпи-		Изомерия по связям C—C, C—OH или C—H, например андростерон (5 α) и изоандростерон (5 β)
Дегидро-		Утрата двух атомов водорода с образованием двойной связи
Дигидро-		Присоединение двух атомов водорода по месту двойной связи
Алло-		<i>Транс</i> -конфигурация колец A и B

Таблица 48.2. Тривиальные и химические названия ряда стероидов

Тривиальное название	Химическое наименование
Альдостерон	11 β , 21-Дигидрокси-3,20-диоксо-4-прегнен-18-аль
Андростендион	4-Андростен-3,17-дион
Холестерол	5-Холестен-3 β -ол
Кортикостерон (соединение В)	11 β , 21-Дигидрокси-4-прегнен-3,20-дион
Кортизол (соединение F)	11 β , 17 α , 21-Тригидрокси-4-прегнен-3,20-дион
Кортизон (соединение E)	17 α , 21-Дигидрокси-4-прегнен-3,11,20-трион
Дегидроэпиандростерон (ДЭА)	3 β -Гидрокси-5-андростен-17-он
11-Дезоксикортикостерон (ДОК)	21-Гидрокси-4-прегнен-3,20-дион
11-Дезоксикортизол (соединение S)	17, 21-Дигидрокси-4-прегнен-3, 20-дион
Дексаметазон	9 α -Фтор-16 α -метил-11 β , 17 α , 21-тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион
Эстрадиол	1,3,5(10)-Эстратриен-3,17 β -диол
Эстриол	1,3,5(10)-Эстратриен-3,16 α , 17 β -триол
Эстрон	3-Гидрокси-1,3,5(10)-эстратриен-3-ол-17-он
Этиохоланолон	3 α -Гидрокси-5 β -андростан-17-он
9 α -Фторкортизол	9 α -Фтор-11 β , 17 α , 21-тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион
Преднизолон	11 β , 17 α , 21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион
Преднизон	17 α , 21-Дигидрокси-прегна-1,4-диен-3,11,20-трион
Прегнандиол	5 β -Прегнан-3 α , 20 α -диол
Прегнантриол	5 β -Прегнан-3 α , 17 α , 20 α -триол
Прегненолон	3 β -Гидрокси-5-прегнен-20-он
Прогестерон	4-Прегнен-3,20-дион
Тестостерон	17 β -Гидрокси-4-андростен-3-он

словарика, приведенного в табл. 48.1, можно понять смысл химических названий природных и синтетических стероидов, перечисленных в табл. 48.2.

БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Предшественники стероидов и основные этапы ферментативных превращений

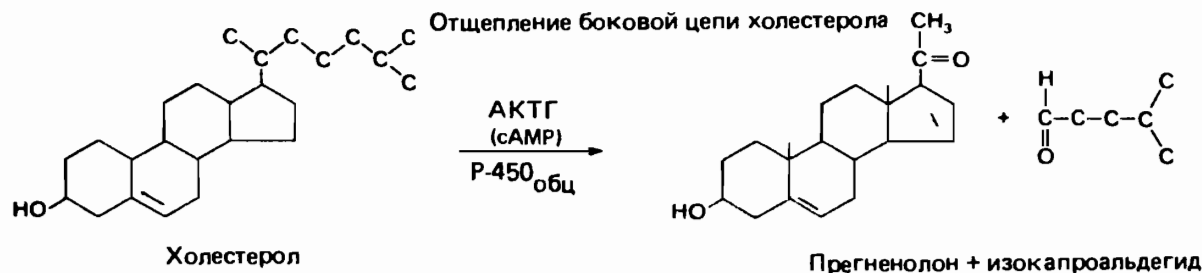
Стероидные гормоны надпочечников образуются из холестерина, который главным образом поступает из крови, но в небольшом количестве синтезируется *in situ* из ацетил-СоА через промежуточное образование мевалоната и сквалена. Значительная часть холестерина подвергается в надпочечниках этерификации и накапливается в цитоплазме в липидных каплях. При стимуляции надпочечников

посредством АКТГ (или сАМР) происходит активация эстеразы и образующийся свободный холестерол транспортируется в митохондрии, где фермент цитохром Р-450, отщепляющий боковую цепь (Р-450_{обн}), превращает его в прегненолон. Отщепление боковой цепи включает в себя две реакции гидроксилирования: сначала при С-22, затем при С-20; последующее расщепление боковой связи (удаление 6-углеродного фрагмента изокапроальдегида) приводит к образованию 21-углеродного стероида (рис. 48.2). АКТГ-зависимый белок может связывать и активировать холестерол или Р-450_{обн}. Мощным ингибитором Р-450_{обн} и биосинтеза стероидов является аминоклутэтимид.

У млекопитающих все стероидные гормоны синтезируются из холестерина через промежуточное образование прегненолона в ходе последовательных реакций, которые протекают в митохондриях либо эндоплазматическом ретикулуме клеток надпочечников. Важную роль в стероидогенезе играют гидроксилазы, катализирующие реакции с участием молекулярного кислорода и NADPH; в определенных этапах процесса участвуют дегидрогеназы, изомеразы и лиаза. В отношении стероидогенеза клетки проявляют определенную специфичность. Так, 18-гидроксилаза и 18-гидроксистероид-дегидрогеназа — ферменты, необходимые для синтеза альдостерона, — присутствуют только в клетках клубочковой зоны и потому только они продуцируют этот минералокортикоид. На рис. 48.3 схематически изображены пути синтеза трех основных классов стероидов надпочечников. Названия ферментов заключены в рамки, превращения на каждом из этапов выделены цветом.

Синтез минералокортикоидов

Синтез альдостерона протекает по специфичному для минералокортикоидов пути и локализован в клубочковой зоне надпочечников. Превращение прегненолона в прогестерон происходит в результате действия двух ферментов гладкого эндоплазматического ретикулума — 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназы (3 β -ОН-СД) и $\Delta^{5,4}$ -изомеразы. Далее прогестерон подвергается гидроксилированию по положению С-21 и образуется 11-дезоксикортикостерон (ДОК), являющийся активным минералокортикоидом (задерживает Na⁺). Следующее гидроксилирование (по С-11) приводит к образованию кортикостерона, обладающего глюкокортикоидной активностью и в малой степени — минералокортикоидной (менее 5% от активности альдостерона). У некоторых видов (например, у грызунов) кортикостероид — самый мощный глюкокортикоидный гормон. Гидроксилирование по С-21 необходимо для проявления как глюко-, так и минералокортикоидной активности, но наличие гидроксильной группы при С-17 ведет в большинстве случаев к тому, что стероид обла-



Основные структуры стероидных гормонов

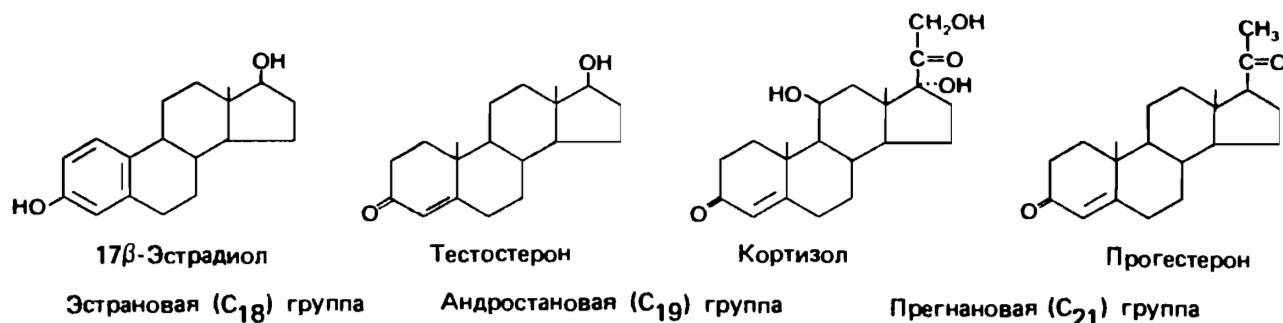


Рис. 48.2. Отщепление боковой цепи холестерина и основные структуры стероидных гормонов.

дает в большей мере глюкокортикоидной активностью и в меньшей степени — минералокортикоидной. В клубочковой зоне фермент гладкого эндоплазматического ретикулума 17α-гидроксилаза отсутствует, но есть митохондриальная **18-гидроксилаза**. Под действием этого последнего фермента кортикостерон превращается в 18-гидроксикортикостерон, из которого далее образуется альдостерон — путем окисления спиртовой группы при C-18 в альдегидную. Уникальный набор ферментов в клубочковой зоне и специфический характер ее регуляции (см. ниже) позволили ряду ученых не только рассматривать надпочечники как две эндокринные железы, но и кору надпочечников — как два фактически разных органа.

Синтез глюкокортикоидов

Для синтеза кортизола необходимы три гидроксилазы, воздействующие последовательно на положения C-17, C-21 и C-11. Первые две реакции идут очень быстро, тогда как гидроксилирование по C-11 относительно медленно. Если сначала происходит гидроксилирование по C-21, то это создает препятствие для действия 17α-гидроксилазы и синтез стероидов направляется по минералокортикоидному пути (образование альдостерона или кортикостерона в зависимости от типа клеток). 17α-Гидроксилаза — фермент гладкого эндоплазматического ретикулума, воздействующий либо на проге-

стерон, либо (чаще) на прегненолон. Продукт реакции — 17α-гидроксипрегностерон — далее гидроксилируется по C-21 с образованием 11-дезоксикортизола. Гидроксилирование последнего по C-11 дает кортизол — самый мощный из природных глюкокортикоидных гормонов человека. **21-Гидроксилаза** — фермент гладкого эндоплазматического ретикулума, а **11β-гидроксилаза** — митохондриальный фермент. Из этого следует, что во время стероидогенеза в клетках клубочковой и пучковой зон происходит челночное движение субстратов: их вход в митохондрии и выход из них (рис. 48.4).

Синтез андрогенов

Основной андроген или, точнее, предшественник андрогенов, вырабатываемый корой надпочечников, — это **дегидроэпиандростерон (ДЭА)**. Большая часть 17-гидроксипрегностерона направляется на синтез глюкокортикоидов, но небольшая его доля подвергается окислению с отщеплением двухуглеродной боковой цепи под действием 17,20-лиазы. Этот фермент выявлен в надпочечниках и гонадах; его субстратом служат только 17α-гидроксисоединения. Продукция андрогенов заметно возрастает, если нарушается биосинтез глюкокортикоидов из-за недостаточности одной из гидроксилаз (см. ниже, адреногенитальный синдром). Большая часть

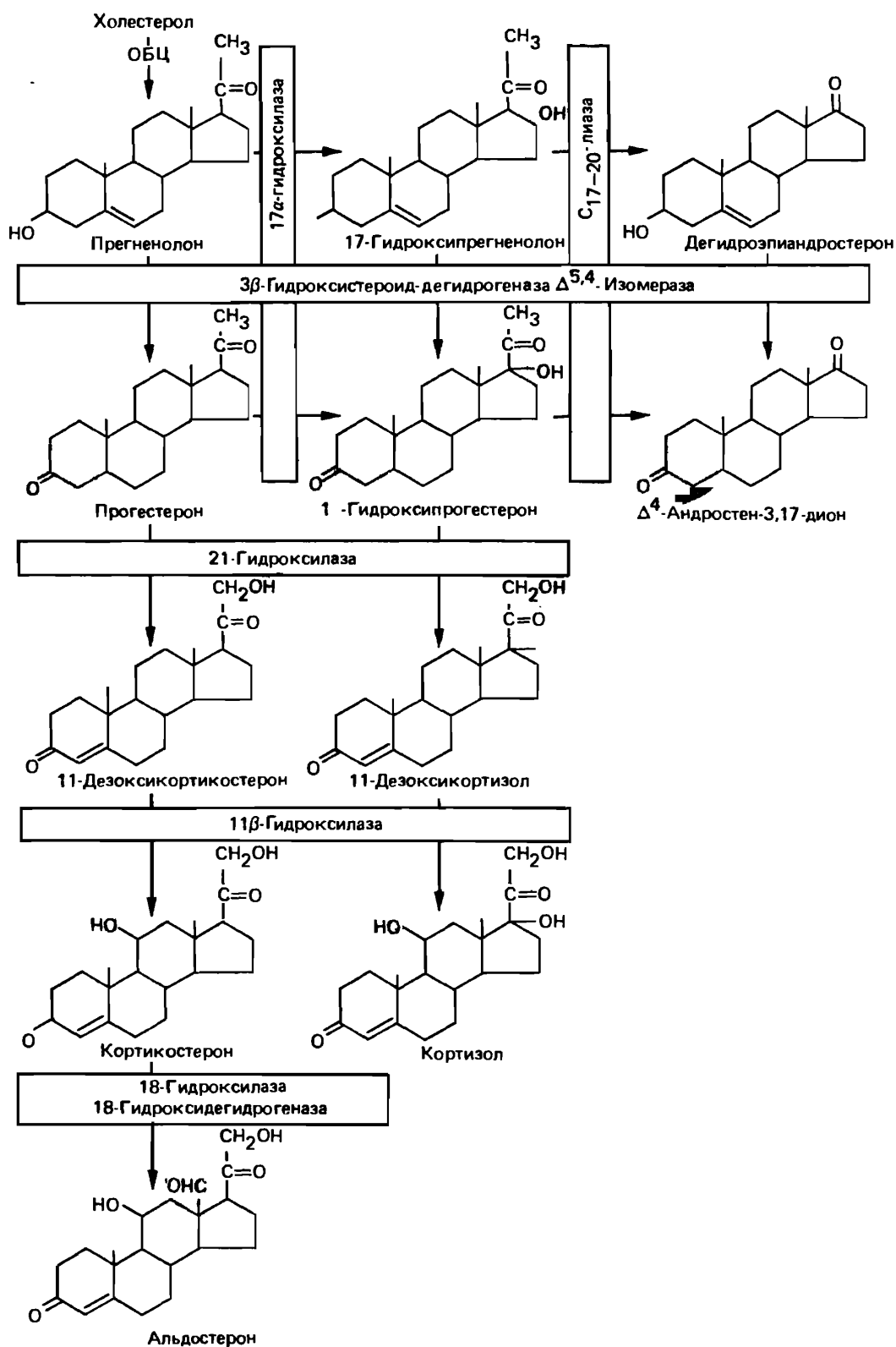


Рис. 48.3. Последовательности реакций, обеспечивающие синтез трех основных классов стероидных гормонов. Участвующие ферменты обведены рамкой; произошедшие на каждом этапе модификации выделены цветом. (Slightly modified and reproduced, with permission from Harding B. W. Page 1135 in *Endocrinology* v.2, Debroot L. Y. [editor]. Grune and Stratton, 1979.)

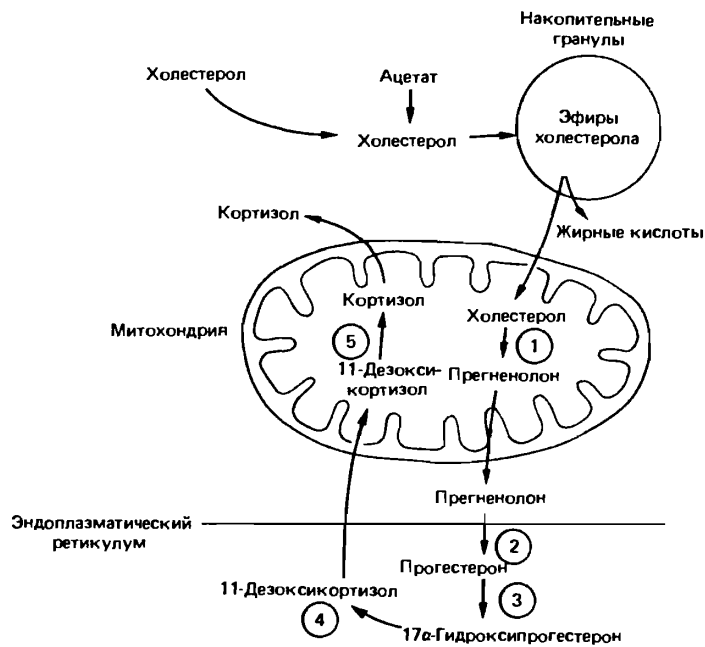


Рис. 48.4. Внутриклеточная локализация последовательных этапов биосинтеза глюкокортикоидов. В ходе стероидогенеза в клетках надпочечников происходит челночное движение предшественников гормонов между митохондриями и эндоплазматическим ретикулом. Участвующие ферменты: 1) C_{20-22} -лиаза, 2) 3β -гидроксистероид-дегидрогеназа и $\Delta^{5,4}$ -изомераза, 3) 17α -гидроксилаза, 4) 21 -гидроксилаза, 5) 11β -гидроксилаза. (Slightly modified and reproduced, with permission from Hardin B.W. Page 1135 in *Endocrinology* v.2, DeGroot L. Y [editor]. Crune and Stratton, 1979.)

ДЭА быстро модифицируется путем присоединения сульфата, причем примерно половина ДЭА сульфатируется в надпочечниках, а остальная часть в печени. Сульфатированный ДЭА биологически неактивен, но удаление сульфатной группы восстанавливает активность. ДЭА — это в сущности прогормон, поскольку под действием 3β -ОН-СД и $\Delta^{5,4}$ -изомеразы этот слабый андроген превращается в более активный андростендион. В небольшом количестве андростендион образуется в надпочечниках и при воздействии лиазы на 17α -гидроксипрогестерон. Восстановление андростендиона по положению C-17 приводит к образованию **тестостерона** — самого мощного андрогена надпочечников. Однако по этому механизму в надпочечниках синтезируется лишь малое количество тестостерона, а в основном это превращение протекает в других тканях.

Из венозной крови, оттекающей от надпочечников, можно выделить в небольших количествах и другие стероиды, в том числе 11 -дезоксикортикостерон, прогестерон, прегненолон, 17α -гидроксипрогестерон и очень немного эстрадиола, образованного путем ароматизации тестостерона. Продукция этих гормонов надпочечниками столь низка, что не играет существенной роли на фоне продукции других желез.

СЕКРЕЦИЯ, ТРАНСПОРТ И МЕТАБОЛИЗМ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Секреция

Стероидные гормоны практически не накапливаются (может быть, и совсем не накапливаются) в клетках надпочечников, а высвобождаются в плазму по мере образования. Выделение кортизола происходит с периодичностью, определяемой **суточным ритмом** высвобождения АКТГ.

Транспорт в крови

А. Глюкокортикоиды. Кортизол в плазме крови находится в связанной с белками и свободной формах. Основной связывающий белок плазмы — это α -глобулин, называемый **транскортином** (кортикостероид-связывающий белок). Транскортин вырабатывается в печени, и синтез этого белка, как и тироксин-связывающего глобулина (ТСГ), стимулируется эстрогенами. При содержании кортизола в плазме крови в пределах нормы большая часть гормона связана с транскортином и значительно меньшее количество — с альбумином. Степень прочности связывания определяет биологический период полужизни различных глюкокортикоидов. Так, кортизол прочно связывается с транскортином и его $t_{1/2}$ составляет 1,5—2 ч, тогда как кортикостерон, связывающийся слабее, имеет $t_{1/2}$ менее 1 ч. Транскортин связывает не только глюкокортикоиды; дезоксикортикостерон и прогестерон взаимодействуют с этим белком с достаточно высоким сродством, так что способны конкурировать с кортизолом. Несвязанный (свободный) кортизол составляет около 8% общего количества этого гормона в плазме крови и представляет собой биологически активную фракцию.

Б. Минералокортикоиды. Альдостерон — самый активный из природных минералокортикоидов — не имеет специфического транспортного белка в плазме, но образует слабые связи с альбумином. Кортикостерон и 11 -дезоксикортикостерон — стероиды, обладающие минералокортикоидным действием, — связываются с транскортином. Эти сведения важны для понимания механизма действия альдостерона (см. ниже).

Метаболизм и экскреция

А. Глюкокортикоиды. Кортизол и продукты его метаболизма составляют около 80% 17 -гидроксикортикоидов плазмы крови; остальные 20% приходятся на кортизон и 11 -дезоксикортизол. Около половины всего количества кортизола (а также кортизона и 11 -дезоксикортизола) присутствует

в крови в виде восстановленных дигидро- и тетрагидро-производных, которые образуются путем восстановления двойных связей в кольце А в ходе дегидрогеназной реакции, протекающей при участии NADPH, а также восстановления 3-кетогруппы в обратимой дегидрогеназной реакции. Значительные количества всех этих соединений подвергаются дополнительной модификации, образуя конъюгатные связи по положению С-3 с глюкуронидом и в меньшей степени с сульфатом. Благодаря этой модификации, которая протекает в первую очередь в печени, липофильные молекулы стероида становятся водорастворимыми и способными экскретироваться. У человека большая часть конъюгированных стероидов, попадающих в кишечник вместе с желчью, подвергается обратному всасыванию, поступая в кишечечно-печеночный кровоток. Около 70% конъюгированных стероидов экскретируется с мочой, 20% — с калом, остальное выделяется через кожу.

Б. Минералокортикоиды. Альдостерон очень быстро удаляется из крови печенью, что, несомненно, связано с отсутствием в плазме соответствующего белка-переносчика. В печени гормон превращается в тетрагидроальдостерон-3-глюкуронид, экскретируемый с мочой.

В. Андрогены. Андрогены выводятся из организма в виде 17-кетостероидов, включающих ДЭА (сульфат), а также андростендион и его метаболиты. Тестостерон, секретируемый надпочечниками в небольших количествах, не относится к 17-кетостероидам, но в печени около половины всего тестостерона превращается в андростерон и этиохоланолон, которые являются 17-кетостероидами.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Глюкокортикоидные гормоны

Секреция кортизола зависит от АКТГ, выделение которого в свою очередь регулируется кортикотропин-рилизинг-гормоном (КРГ; кортиколиберин). Эти гормоны связаны между собой классической петлей отрицательной обратной связи (рис. 48.5). Повышение уровня свободного кортизола тормозит секрецию КРГ. Падение уровня свободного кортизола ниже нормы активирует систему, стимулируя высвобождение КРГ гипоталамусом. Этот пептид, состоящий из 41 аминокислотного остатка, усиливает синтез и высвобождение АКТГ (из молекулы предшественника проопиомеланокортина [ПОМК], см. гл. 45). В коре надпочечников АКТГ повышает скорость отщепления боковой цепи от холестерина — реакции, лимитирующей скорость стероидогенеза в целом. Указанные процессы составляют одну сторону петли отрицательной обратной связи. По мере нормализации уровня свободного кортизола в крови происходит снижение секреции КРГ гипота-

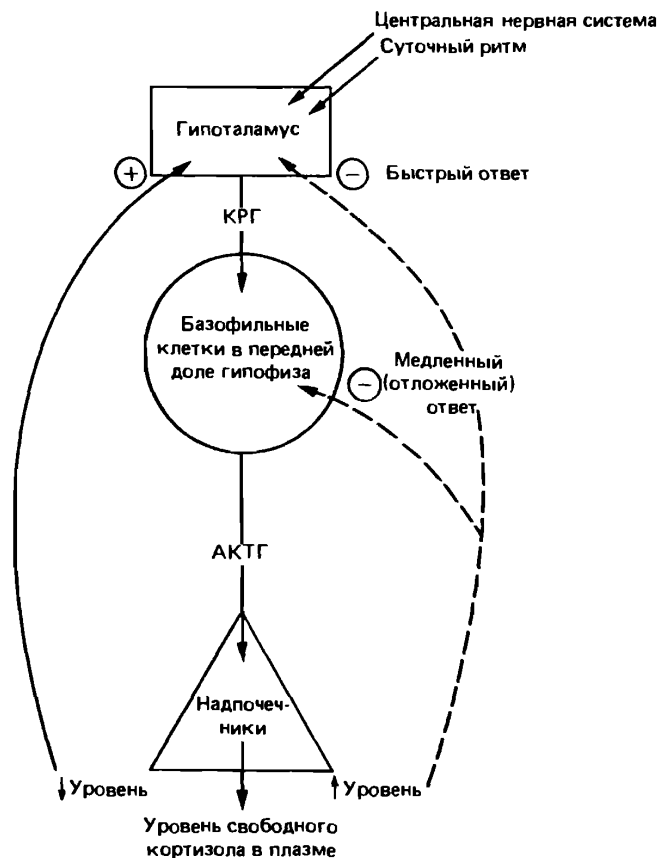


Рис. 48.5. Регуляция биосинтеза кортизола по механизму обратной связи. Сплошные линии — стимуляция; штриховые линии — ингибирование.

ламусом, что ведет к снижению выработки АКТГ гипофизом, а соответственно и кортизола — надпочечниками; таким образом выполняется вторая половина петли обратной связи. Этот сложный механизм обеспечивает быструю регуляцию уровня кортизола в крови.

Высвобождение АКТГ (и секреция кортизола) регулируется нервными импульсами, поступающими из различных отделов нервной системы. Существует эндогенный ритм, определяющий секрецию КРГ, а следовательно, и АКТГ. Этот циркадианный ритм в норме настроен так, чтобы обеспечивать увеличение кортизола в крови вскоре 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. Эта общая динамика возникает в результате последовательных эпизодов импульсного выброса кортизола, которым предшествует импульсная секреция АКТГ (см. гл. 45). Все вместе эти события составляют сложный цикл, зависящий от светового периода и циклов питания — голодания и сна — бодрствования. Исчезновение суточной периодичности секреции стероидов обычно связано с патологией гипофизарно-адреналовой системы, некоторыми видами депрессивных состоя-

ний, а также с дальними перелетами через несколько часовых поясов.

На секрецию кортизола влияют также физический и эмоциональные стрессы, состояние тревоги, страха, волнения и боль. Эти реакции могут нивелировать воздействия системы отрицательной обратной связи и суточного ритма.

Минералокортикоидные гормоны

Продукция альдостерона клетками клубочковой зоны регулируется совершенно иначе: основными регуляторами в этом случае служат система ренин—ангиотензин и калий, но участвуют в этом процессе также натрий, АКТГ и нейрональные механизмы.

А. Система ренин—ангиотензин. Эта система участвует в регуляции кровяного давления и электролитного обмена. Основным гормоном при этом является **ангиотензин II**—октапептид, образующийся из **ангиотензиногена** (рис. 48.6). Ангиотензиноген—это α_2 -глобулин, синтезируемый печенью; он служит субстратом для ренина—фермента, продуцируемого **юктагломерулярными клетками** почечных афферентных артериол. Локализация этих клеток делает их особенно чувствительными к изменениям кровяного давления; многие физиологические регуляторы высвобождения ренина (табл. 48.3) дей-

Таблица 48.3. Факторы, влияющие на высвобождение ренина

Стимулирующие	Ингибирующие
Пониженное кровяное давление	Повышенное кровяное давление
Перемена положения тела: от горизонтального к вертикальному	Перемена положения тела: от вертикального к горизонтальному
Потеря соли организмом	Солевая нагрузка
β -Аренергические агенты	β -Адренергические антагонисты
Простагландины	Ингибиторы простагландинов
	Калий
	Вазопрессин
	Ангиотензин II

ствуют через почечные **барорецепторы**. Юктагломерулярные клетки чувствительны также к изменениям концентрации Na^+ и K^+ в жидкости, протекающей через почечные каналцы; вследствие этого любая комбинация факторов, вызывающая снижение объема жидкости (обезвоживание, снижение кровяного давления, потеря жидкости или крови) либо снижение концентрации NaCl , стимулирует высвобождение ренина. На высвобождение ренина оказывают влияние центральная нервная система, а также изме-

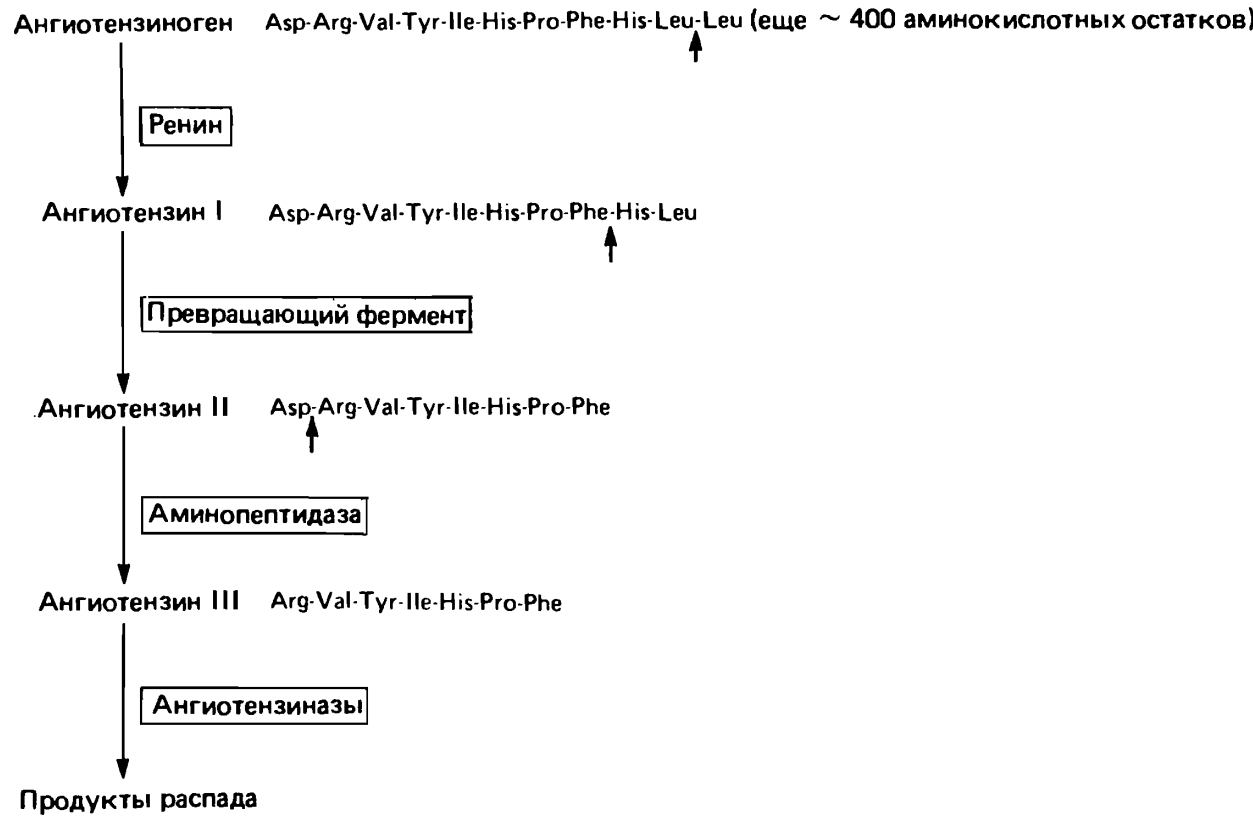


Рис. 48.6. Образование и метаболизм ангиотензинов Участки расщепления показаны маленькими стрелками

нения положения тела. Соответствующие сигналы передаются по симпатическим нервам к юкстагломерулярным клеткам, действуя по механизму, не зависящему от барорецепторов и солевого эффекта, а опосредованному β -адренергическим рецептором.

Ренин, воздействуя на свой субстрат—ангиотензиноген, превращает его в декапептид **ангиотензин I**. Глюкокортикоиды и эстрогены активируют синтез ангиотензиногена в печени. Вызываемая этими гормонами гипертензия может быть частично обусловлена повышением уровня ангиотензиногена в плазме крови. Поскольку концентрация этого белка в плазме близка к K_m , его воздействия с ренином, небольшие изменения этой концентрации могут сильно сказаться на образовании ангиотензина II.

Ангиотензин-превращающий фермент—гликопротеин, выявленный в легких, эндотелиальных клетках и в плазме крови, отщепляет от ангиотензина I два С-концевых аминокислотных остатка, превращая его в ангиотензин II. Эта реакция, видимо, не является скоростью-лимитирующей. Различные нонапептиды—аналоги ангиотензина I—способны ингибировать превращающий фермент и потому используются для лечения ренин-зависимой гипертензии. Превращающий фермент расщепляет также брадикинин, мощное сосудорасширяющее средство. Таким образом, этот фермент повышает кровяное давление двумя различными путями.

Ангиотензин II увеличивает кровяное давление, вызывая сужение артериол, и является самым сильнодействующим из известных вазоактивных агентов. Кроме того, он тормозит высвобождение ренина юкстагломерулярными клетками и оказывает сильное стимулирующее действие на выработку альдостерона. Несмотря на то что этот эффект на надпочечники является прямым, на продукцию кортизола ангиотензин II не влияет. У некоторых видов животных ангиотензин II превращается в гептапептид **ангиотензин III** (рис. 48.6) в результате отщепления остатка Asp^1 . Стимулирующее действие на продукцию альдостерона у обоих ангиотензинов примерно одинаково. У человека уровень ангиотензина II в плазме крови в 4 раза выше, чем ангиотензина III, так что именно октапептид оказывает основной эффект. Ангиотензины II и III быстро инактивируются под действием ангиотенгиназ.

Ангиотензин II связывается со специфическими рецепторами клубочковых клеток. Содержание этих рецепторов зависит от «повышающей регуляции» со стороны ионов калия и самого гормона, а также «понижающей регуляции» низкими концентрациями калия; таким образом, этот ион играет центральную роль в действии ангиотензина II на надпочечники. При данном гормон-рецепторном взаимодействии не происходит активации аденилатциклазы, так что сАМР, по-видимому, не участвует в механизме действия ангиотензина II.

Действие этого гормона, стимулирующего превращение холестерина в прегненолон и кортикостерона в 18-гидрокортикостерон и альдостерон, может быть опосредовано изменениями концентрации внутриклеточного кальция и метаболитов фосфолипидов по механизму, сходному с описанным в гл. 44. Определенную роль может играть и **биосинтез простагландинов**, судя по тому, что простагландины E_1 и E_2 стимулируют высвобождение альдостерона, а F_{1a} и F_{2a} —тормозят; в целом это типично для опосредованных простагландинами реакций. Ингибитор биосинтеза простагландинов индометацин тормозит как базальное, так и стимулированное ангиотензином II высвобождение альдостерона.

Б. Калий. Секреция альдостерона зависит от изменений уровня калия в плазме: увеличение калия всего лишь на 0,1 м-экв/л стимулирует секрецию, а снижение на ту же величину тормозит синтез и секрецию гормона. Эффект K^+ не зависит от уровней Na^+ и ангиотензина II в плазме крови. Продолжительная гиперкалиемия приводит к гипертрофии клубочковой зоны и повышению чувствительности ее клеток к ионам калия. K^+ воздействует на те же ферментативные этапы, что и ангиотензин II, но механизм его эффекта не известен. Подобно ангиотензину II, K^+ не влияет на биосинтез кортизола.

В. АКТГ. У человека быстрое, краткосрочное снижение уровня АКТГ (например, в результате гипопизэктомии или подавления секреции глюкокортикоидами) мало сказывается на продукции альдостерона, но хроническая недостаточность АКТГ может ослаблять действие других регуляторов (ангиотензина II, Na^+ , K^+) на содержание альдостерона в крови. У других видов (например, у крыс) АКТГ играет более важную роль в выработке альдостерона: на изолированных клетках клубочковой зоны показано, что он стимулирует синтез сАМР и начальные этапы стероидогенеза.

Г. Натрий. Недостаточность Na^+ усиливает продукцию альдостерона, а нагрузка ионами натрия снижает ее, однако эти эффекты большей частью опосредованы системой ренин—ангиотензин. Возможно и прямое воздействие Na^+ на синтез альдостерона, но этот эффект слаб, кратковременен и требует высоких концентраций Na^+ .

ВОЗДЕЙСТВИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ НА МЕТАБОЛИЗМ

Утрата кортикоидной функции надпочечников ведет (в отсутствие заместительной терапии) к летальному исходу. У человека лечение надпочечниковой недостаточности минералокортикоидами обычно не дает должного эффекта: критически важными в этом состоянии являются, очевидно, глюкокортикоиды. У крыс, напротив, замещение минералокортикоида-

ми оказывается вполне успешным. Избыточное либо недостаточное содержание в крови глюко- или минералокортикоидов (независимо от причины сдвига) вызывает целый ряд серьезных осложнений, непосредственно обусловленных влиянием этих гормонов на обмен веществ. Лишь некоторые из биохимических и физиологических эффектов указанных гормонов будут рассмотрены в данной главе.

Глюкокортикоидные гормоны

А. Промежуточный обмен веществ

1. Глюконеогенез. Само название «глюкокортикоидные гормоны» связано со способностью гормонов этой группы стимулировать образование глюкозы. Стимуляция обеспечивается координированным гормональным воздействием на разные ткани и разные метаболические последовательности и включает как катаболические, так и анаболические эффекты.

Глюкокортикоиды способствуют повышению выработки глюкозы в печени посредством 1) увеличения скорости глюконеогенеза; 2) стимуляции высвобождения аминокислот — субстратов глюконеогенеза — из периферических тканей (мышечной, лимфоидной) через активацию катаболических процессов; 3) «пермиссивного действия», позволяющего другим гормонам стимулировать ключевые метаболические процессы, в том числе глюконеогенез, с максимальной эффективностью. Эта активность глюкокортикоидов проявляется у голодных животных и животных с инсулиновой недостаточностью; у сытых животных глюкокортикоиды необходимы для проявления максимального эффекта других гормонов. Кроме того, глюкокортикоиды тормозят потребление и использование глюкозы во внепеченочных тканях. В итоге результат их действия состоит в повышении уровня глюкозы в плазме. У здоровых животных это влияние уравнивается инсулином, оказывающим противоположный эффект. Сбалансированность этих двух воздействий обеспечивает нормальный уровень глюкозы в крови; если же имеет место инсулиновая недостаточность, то введение глюкокортикоидов вызывает гипергликемию; в противоположном случае — при недостаточности глюкокортикоидов — снижается выработка глюкозы, уменьшаются запасы гликогена и резко возрастает чувствительность к инсулину.

Глюкокортикоидные гормоны усиливают глюконеогенез путем повышения количества (и активности) ряда ключевых ферментов в печени. Подробно изучена индукция отдельных ферментов (аланин-аминотрансферазы, триптофаноxygenазы и тирозин-аминотрансферазы), которые катализируют скорость-лимитирующие этапы деградации аминокислот. На этих примерах было показано, как глюкокортикоиды регулируют транскрипцию генов, одна-

ко в глюконеогенезе исследованные ферменты играют, видимо, скромную роль. Ферментом, лимитирующим скорость глюконеогенеза, является **фосфоенолпируват-карбоксикиназа (ФЕПКК)** (см. рис. 17.7). Синтез этого фермента усиливается глюкоконом (действующим через cAMP) и в меньшей степени глюкокортикоидами. Сочетание этих гормонов дает аддитивный эффект. Инсулин тормозит синтез ФЕПКК, оказывая более сильное действие, чем оба индуктора вместе взятые. Все эти эффекты проявляются на уровне транскрипции генов.

2. Синтез гликогена. Глюкокортикоиды увеличивают запасы гликогена в печени как голодных, так и сытых животных (на этой основе был разработан метод определения эффективности глюкокортикоидных гормонов). Это осуществляется посредством превращения неактивной формы гликогенсинтазы в активную («b» в «a»), вероятно, путем активации фосфатазы, которая способствует этому превращению.

3. Липидный обмен. Избыточные количества глюкокортикоидов стимулируют липолиз в одних частях тела (конечности) и липогенез — в других (лицо и туловище). Остается не ясным, обусловлен ли этот липогенетический эффект прямым воздействием стероидов или он связан с тем повышением уровня инсулина в крови, которое возникает в ответ на избыток глюкокортикоидов. Все же в этом отношении существует, очевидно, какая-то тканевая специфичность, поскольку стимуляция липолиза либо липогенеза в этих условиях наблюдается отнюдь не во всех частях тела.

У людей, получающих глюкокортикоиды, возрастает уровень свободных жирных кислот в плазме крови. Частично это можно объяснить прямой стимуляцией липолиза, поскольку в опытах на изолированных гепатоцитах эти гормоны действительно способствуют высвобождению жирных кислот. Кроме того, глюкокортикоиды снижают потребление и использование глюкозы жировой тканью и тем самым уменьшают образование глицерола; поскольку глицерол необходим для этерификации жирных кислот, снижение его содержания приводит к их высвобождению в плазму. В итоге повышение концентрации свободных жирных кислот в крови и сопряженное с этим усиление их превращения в кетоны способствуют развитию кетоза, особенно при инсулиновой недостаточности. Эти эффекты имеют большое значение, но самое важное действие глюкокортикоидов на липидный обмен вытекает из их способности усиливать липолитическое действие катехоламинов и гормона роста. Ниже мы обсудим этот «пермиссивный эффект» глюкокортикоидов.

4. Обмен белков и нуклеиновых кислот. Глюкокортикоиды в целом оказывают анаболическое действие на обмен белков и нуклеиновых кислот в печени и катаболическое — в других органах, включая

мышцы, лимфоидные ткани, жировую ткань, кожу и кости. Такой характер действия соответствует общему физиологическому эффекту этих гормонов, состоящему в том, чтобы обеспечить оптимальные условия для глюконеогенеза. Механизм анаболического действия описан довольно подробно; он включает стимуляцию синтеза специфических генных продуктов и соответствующее возрастание скорости синтеза специфических белков. Молекулярный механизм катаболических эффектов изучен недостаточно.

Б. Влияние глюкокортикоидов на организм-хозяин

Защитные механизмы

1. Иммунологический ответ. Глюкокортикоиды в высокой концентрации тормозят иммунологический ответ организма-хозяина. Они вызывают гибель лимфоцитов и инволюцию лимфоидной ткани, однако эти эффекты зависят от вида животного и типа клеток. Например, лимфоциты мыши намного более чувствительны к указанному действию глюкокортикоидов, чем лимфоциты человека, а клетки-предшественники у всех видов животных, по-видимому, устойчивы к действию этих гормонов. Глюкокортикоиды оказывают влияние на пролиферацию лимфоцитов в ответ на антигены и в меньшей степени — на митогены. Кроме того, они могут влиять и на некоторые другие этапы иммунного ответа, в том числе на процессинг антигена макрофагами, выработку антител В-лимфоцитами, супрессорную и хелперную функции Т-лимфоцитов и метаболизм антител. Большая часть этих эффектов наблюдается при высоких (превышающих физиологические) концентрациях глюкокортикоидов, т. е. при тех дозах стероидов, которые используются для лечения аутоиммунных заболеваний или для подавления реакции отторжения при пересадке тканей. Вопрос о роли физиологических концентраций этих гормонов в модуляции иммунологического ответа остается открытым.

2. Противовоспалительный ответ. Способность глюкокортикоидов подавлять воспалительную реакцию широко известна и именно на ней главным образом базируется применение этих гормонов в клинике. У грызунов глюкокортикоиды вызывают снижение числа циркулирующих лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов, вероятно, за счет лизиса клеток. У человека такие же изменения обусловлены не гибелью клеток, а их переходом из сосудистого русла в костный мозг, лимфоидную ткань или селезенку. В то же время эти гормоны повышают выход полиморфноядерных лейкоцитов из костного мозга и тем самым увеличивают число этих клеток в крови. Глюкокортикоиды тормозят также накопление лейкоцитов в участках воспаления, но стимулируют

высвобождение из лейкоцитов веществ, участвующих в воспалительной реакции (кининов, плазминоген-активирующего фактора, простагландинов и гистамина). Кроме того, в участках воспаления эти гормоны ингибируют пролиферацию фибробластов, а также некоторые функции этих клеток, например продукцию коллагена и фибронектина. Сочетание указанных эффектов ведет к плохому заживлению ран, повышенной чувствительности к инфекции и снижению воспалительного ответа, что обычно наблюдается у больных с избытком глюкокортикоидов.

В. Влияние глюкокортикоидов на другие функции

1. Функции сердечно-сосудистой системы. Глюкокортикоиды необходимы для поддержания нормального кровяного давления и минутного объема сердца. При этом они, видимо, не оказывают прямого физиологического действия, но требуются для проявления максимального эффекта катехоламинов (хороший пример «пермиссивного действия» глюкокортикоидов в отношении других гормонов).

2. Водно-электролитный обмен. У людей с недостаточностью глюкокортикоидов нарушается экскреция воды. Это может быть связано с изменением секреции АДГ. Действительно, было показано, что глюкокортикоиды тормозят секрецию АДГ; следовательно, в отсутствие глюкокортикоидов уровень АДГ может возрастать, что способствует задержке воды в организме. Кроме того, при глюкокортикоидной недостаточности падает скорость клубочковой фильтрации, что может повлечь за собой снижение клиренса несвязанной воды.

Подобно минералокортикоидам, глюкокортикоидные гормоны увеличивают выработку ангиотензиногена, а соответственно — и ангиотензина II; в итоге они способствуют повышению кровяного давления, усиливают задержку натрия и вызывают выведение калия. Вместе с тем некоторые эффекты глюкокортикоидов на электролитный обмен обусловлены собственной минералокортикоидной активностью этих соединений.

3. Рост и развитие соединительной ткани, мышц и костей. Глюкокортикоиды в высокой концентрации оказывают катаболический эффект. Они тормозят рост и деление фибробластов, а также продукцию коллагена и фибронектина. Это ведет к ослаблению структурной основы кожи и соответственно к типичным для избыточности глюкокортикоидов в организме явлениям, а именно истончению кожи, ее быстрой повреждаемости, плохому заживлению ран.

Мышцы служат основным источником субстратов глюконеогенеза — аминокислот, а потому являются первичной мишенью действия глюкокор-

тикоидов. Это действие состоит в торможении синтеза белков, РНК и ДНК и стимуляции распада РНК и белков. Тяжелая атрофия мышц и мышечная слабость характерны для больных, длительное время подвергавшихся воздействию избытка глюкокортикоидов.

В костной ткани глюкокортикоиды тормозят деление клеток и их функцию (отложение коллагена), а также усиливают действие ПТГ. Конечный результат продолжительного действия этих гормонов — уменьшение массы костей (остеопороз).

Г. Роль глюкокортикоидов в «стрессовых реакциях»

Реакция типа «борьба или бегство» обсуждается в гл. 49 в связи с мозговым веществом надпочечников, поскольку комплекс физиологических ответов, составляющий эту реакцию, опосредован в первую очередь катехоламиновыми гормонами. Однако глюкокортикоиды во многих случаях необходимы для проявления максимальной активности отдельных компонентов реакции.

Более непосредственным образом глюкокортикоиды участвуют в физиологическом ответе на острый стресс, связанный с хирургическим вмешательством, травмой или инфекцией. В этих обстоятельствах секреция кортизола возрастает в несколько раз, и если этот ответ ослаблен, то шансы на выживание значительно снижаются; в этих случаях помогает заместительная терапия минералокортикоидами, но введение глюкокортикоидов дает оптимальный результат.

Минералокортикоидные гормоны

Минералокортикоидные гормоны воздействуют на почки, стимулируя активный транспорт Na^+ в дистальных извитых канальцах и собирательных трубках, причем конечный результат состоит в задержке Na^+ в организме. Кроме того, эти гормоны способствуют выделению почками K^+ , H^+ и NH_4^+ и влияют на транспорт ионов в других эпителиальных тканях: потовых железах, слизистой кишечника и слюнных железах. Активность альдостерона превышает активность 11-дезоксикортикостерона (ДОК) в 30—50 раз, а активность кортизола и кортикостерона — в 1000 раз. Как самый мощный из природных минералокортикоидов именно альдостерон в основном обеспечивает минералокортикоидные эффекты в организме человека. Однако кортизол, хотя и гораздо менее активный, вырабатывается со значительно большей скоростью и потому вносит существенный вклад в задержку Na^+ и экскрецию K^+ . Что касается ДОК, то он секретруется в очень малом количестве и имеет намного меньшее значе-

ние в этих процессах. Воздействие альдостерона на транспорт катионов в почках не связано с какими-либо изменениями почечного кровотока или скорости клубочковой фильтрации; из этого следует, что регуляция осуществляется прямым путем. Для проявления эффекта необходим синтез РНК и белка, в том числе, по-видимому, образование специфических генных продуктов (см. ниже).

КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Глюкокортикоидные гормоны

А. Классы глюкокортикоидных гормонов. Начальный этап действия глюкокортикоидных гормонов — взаимодействие со специфическим рецептором. В результате этого взаимодействия рецептор «активируется», что, как предполагается, необходимо для связывания с ДНК. В целом существует высокая степень корреляции между связыванием стероида с рецептором и выраженностью определенного биологического ответа. Эта корреляция сохраняется в широком диапазоне активностей; так, если один стероид обладает в 10 раз меньшим сродством к рецептору по сравнению с другим, то и его биологический эффект будет соответственно ниже (при действии в одинаковых концентрациях). В действии стероидных гормонов «резервные рецепторы» не участвуют.

Биологический эффект стероида определяется как способностью связываться с рецептором, так и концентрацией свободного гормона в крови. Возьмем, например, кортизол, кортикостерон и альдостерон; все три гормона обладают высоким сродством к глюкокортикоидному рецептору, однако в физиологических условиях доминирует действие кортизола, поскольку в плазме крови он содержится в относительно высокой концентрации. Кортикостерон может играть важную роль при некоторых патологических условиях (недостаточность 17 α -гидроксилазы), но альдостерон никогда не достигает такой концентрации в плазме крови, чтобы мог проявиться его глюкокортикоидный эффект.

Если сравнить различные стероиды по их способности опосредовать хорошо известный глюкокортикоидный эффект — индукцию фермента тирозинаминотрансферазы в печени, — то выявляется, что эти гормоны можно разделить на четыре класса: **агонисты, частичные агонисты, антагонисты и неактивные стероиды** (табл. 48.4).

Б. Глюкокортикоидный рецептор. Ряд биохимических, иммунологических и генетических исследований позволил сформировать представление о глюкокортикоидном рецепторе (рис. 48.7). В его N-концевой половине содержатся большая часть антигенных участков, а также область, модулирующая

Таблица 48.4. Классификации стероидов по их глюкокортикоидному эффекту**Агонисты**

Дексаметазон
Кортизол
Кортикостерон
Альдостерон

Частичные агонисты

11 β -Гидроксипрогестерон
21-Дезоксикортизол
17 α -Гидроксипрогестерон
Прогестерон

Антагонисты

Тестостерон
17 β -Эстрадиол
19-Нортестостерон
Кортизон

Неактивные стероиды

11 α -Гидроксипрогестерон
Андростендион
11 α , 17 α -Метилтестостерон
Тетрагидрокортизол

функцию промотора. В С-концевой области содержатся ДНК-связывающие и гормон-связывающие сайты. Домен, связывающий ДНК, расположен ближе к середине молекулы, тогда как домен, связывающий гормон,— ближе к С-концу. Некоторые области в С-концевой половине рецептора гомологичны белку онкогена *v-erb-A*, а также ДНК-связывающего участка в TFIIIA и соответствующей области в рецепторах эстрогенов и прогестерона. Что касается аминокислотной последовательности рецептора, то она была установлена на основе анализа молекул кДНК. При этом в ДНК-связывающем участке были выявлены две области, богатые остатками Cys-Lys-Arg. Сравнение этих областей с другими известными белками, связывающими ДНК, например TFIIIA, показало, что здесь возможно образование складки в виде пальца (с цинком в середине); предполагается, что такая «пальцевая» структура внедряется в изгиб ДНК. Глюкокортикоидный рецептор человека существует в двух формах, α и β , состоящих соответственно из 777 и 742 аминокислотных остатков.

В. Общая характеристика механизма действия.

Схема механизма действия глюкокортикоидных гормонов описана в гл. 44 и изображена на рис. 44.1. Многочисленные примеры подтверждают концепцию о том, что эти гормоны влияют на специфические внутриклеточные процессы путем изменения содержания в клетке критически важных белков, как правило, ферментов. Последнее определяется тем, что глюкокортикоиды способны регулировать в клетках-мишенях скорость транскрипции специфических генов. Для этого требуется, чтобы стероид-рецепторный комплекс связался со специфическими областями ДНК вблизи сайта инициации транскрипции и далее чтобы эти области определили специфичность ответа. Каким именно образом это связывание стимулирует или тормозит транскрипцию, как обеспечивается тканевая специфичность, почему один и тот же ген может быть активирован в одной ткани и ингибирован в другой,— эти и многие другие принципиальные вопросы остаются открытыми.

Иллюстрацией современных представлений о механизме действия стероидных гормонов может служить краткое описание того, как глюкокортикоиды влияют на транскрипцию ДНК вируса рака молочной железы мыши. Система этого онкогенного вируса удобна тем, что эффект стероида проявляется на ней быстро и сильно, а молекулярная биология вируса подробно изучена. Комплекс глюкокортикоидный гормон-рецептор связывается с высокой избирательностью и специфичностью с областью ДНК вируса—глюкокортикоидным регуляторным элементом, расположенным на несколько сотен пар оснований выше сайта инициации транскрипции. В состав глюкокортикоидного регуляторного элемента входят последовательности, очень сходные с консенсусной последовательностью AGA⁺ CAG⁺, обнаруженной в регуляторных элементах целого ряда генов, регулируемых глюкокортикоидами. Нагруженный рецептором глюкокортикоидный регуляторный элемент стимулирует инициацию транскрипции вируса рака молочной железы мыши и, кроме того, активирует гетерологичные промоторы. Этот *цис*-действующий элемент работает при перемещении от одной области к другой по ходу или против хода



Рис. 48.7. Схематическое изображение глюкокортикоидного рецептора человека. Этот рецептор существует в двух формах, состоящих соответственно из 742 или 777 аминокислотных остатков и различающихся своими С-концами. На рисунке показана вторая форма. Рецептор можно разделить на функционально разные домены: антигенный, связывающийся с ДНК и гормон-связывающий. Показана область, обладающая высокой степенью гомологии с онкогеном *V-erb-A*.

транскрипции; кроме того, он работает независимо от своей ориентации вперед или назад. Такие свойства позволяют рассматривать глюкокортикоидный регуляторный элемент как энхансер транскрипции. Было показано, что ряд регулируемых глюкокортикоидами генов обладает теми же характеристиками.

Регуляция скорости транскрипции — это, по-видимому, важнейший элемент механизма действия глюкокортикоидных гормонов, но он не является единственным. Удалось выявить, что эти гормоны регулируют также процессинг и транспорт ядерных транскриптов (например, α -кислых глюкотеинов), скорость распада специфических мРНК (например, гормона роста и фосфоенолпируват-карбоксикиназы), наконец, посттрансляционный процессинг (различные белки вируса опухоли молочных желез). Создается впечатление, что этот и другие классы стероидных гормонов способны действовать на любом уровне переноса информации от ДНК к белку, причем относительное значение воздействия на каждом из уровней варьирует от системы к системе.

Минералокортикоидные гормоны

А. Общая характеристика механизма действия. Механизм действия альдостерона в основных чертах

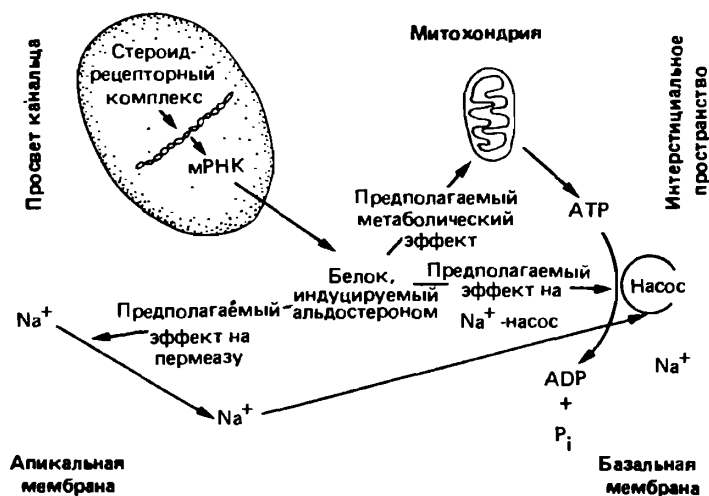


Рис. 48.8. Механизм действия альдостерона. Гормон индуцирует образование одного или более белков, которые в свою очередь увеличивают проницаемость апикальной (люминальной) мембраны по отношению к Na^+ , усиливают активный транспорт Na^+ из клетки через базальную и латеральные мембраны в интерстициальное пространство либо улучшают энергетическое обеспечение работы Na^+ -насоса. (Modified from Edelman S. Candidate mediators in the action of aldosterone on Na^+ -transport. In: Membrane Transport Processes, vol. 1. Hoffman J.F. [editor]. Raven Press, 1978.)

сходен с механизмом действия других стероидных гормонов (рис. 48.8). Клетки-мишени содержат специфические рецепторы, связывающие альдостерон. Образовавшийся гормон-рецепторный комплекс связывается с хроматином и регулирует скорость транскрипции специфических генов. Хотя специфические генные продукты не были выделены, однако известно, что для проявления эффекта альдостерона требуется синтез РНК и белка. Предполагают, что влияние альдостерона на транспорт ионов опосредовано определенными белками.

Б. Связывание альдостерона с рецепторами. В цитоплазме и ядре клеток-мишеней выявлены рецепторы, связывающие альдостерон с высоким сродством ($K_d \sim 1$ нмоль/л). Общее связывание (емкость рецепторов) в цитоплазме в 80—100 раз выше, чем в ядре; однако по специфичности и аффинности связывание в ядре намного превосходит общую связывающую активность цитозоля. Как обнаружилось в опытах *in vitro*, в цитозоле присутствуют три типа связывающих белков. Белки I и II типа связывают альдостерон с высоким сродством, белки типа III — с низким. Тип I — это минералокортикоидный рецептор, а тип II — видимо, глюкокортикоидный рецептор, одновременно связывающий альдостерон. Рецептор типа I жадно связывает альдостерон, но очень хорошо связывает также ДОК и кортикостерон. Исходя из того, что уровень каждого из этих двух стероидов в плазме намного выше, чем альдостерона, можно, казалось бы, предположить, что именно они будут предпочтительно связываться с рецептором типа I и, следовательно, эффект альдостерона будет слабым. Однако вспомним, что в плазме крови ДОК и кортикостерон связаны со стероид-транспортирующим белком транскортином, тогда как альдостерон не имеет специфического транспортного белка. Отсюда следует, что в плазме эффективная «свободная» концентрация альдостерона выше, чем кортикостерона или ДОК. Благодаря этому альдостерон беспрепятственно проникает в клетки, и *in vivo* это обеспечивает ему преимущество в конкурентном связывании с рецептором типа I.

В. Действие альдостерона на транспорт ионов. Молекулярный механизм действия альдостерона на транспорт Na^+ не выяснен, но целый ряд данных подтверждает модель, приведенную на рис. 48.8. Согласно этой схеме, Na^+ из жидкости, содержащейся в каналах 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^+ -зависимой АТФазой. Таким образом, на этот активный процесс расходуется энергия АТФ.

Альдостерон увеличивает число Na^+ -каналов на мембране на апикальной стороне клеток, что, очевидно, ведет к повышению уровня внутриклеточного

Na^+ . Кроме того, альдостерон увеличивает активность ряда митохондриальных ферментов, что должно способствовать выработке АТФ, необходимого для работы Na^+/K^+ -насоса мембраны на серозной стороне клетки. В результате действия альдостерона возрастают как соотношение $\text{NADH}:\text{NAD}$, так и активность некоторых митохондриальных ферментов, в том числе цитратсинтазы. Повышение цитратсинтазной активности обусловлено истинной индукцией фермента (вероятно, опосредованной влиянием на транскрипцию генов), причем транзитное возрастание количества этого белка тесно коррелирует с эффектом гормона на транспорт Na^+ . Исходя из того, что прямого эффекта альдостерона на Na^+ -насос не было выявлено, представляется вероятным, что гормон действует через увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ и создание источника энергии, необходимой для удаления этого иона. Воздействие альдостерона на транспорт K^+ и H^+ может осуществляться с помощью иных механизмов, в которых участвуют различные, регулируемые этим гормоном белки.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Нарушения, связанные с глюкокортикоидными гормонами

Первичная недостаточность надпочечников (аддисонова болезнь) ведет к гипогликемии, крайне высокой чувствительности к инсулину, непереносимости стресса, анорексии, потере веса, тошноте и резко выраженной слабости. У больных с аддисоновой болезнью отмечается низкое кровяное давление, а также уменьшение скорости клубочковой фильтрации и способности справиться с нагрузкой водой. Часто отмечается тяга к соленому. Уровень Na^+ в плазме этих больных снижен, а уровень K^+ повышен; увеличено также число лимфоцитов в крови. У этих больных часто усилена пигментация кожи и слизистых, что обусловлено компенсаторно повышенной секрецией АКТГ и соответствующих продуктов гена ПОМК. Вторичная недостаточность надпочечников вызывается дефицитом АКТГ, возникающим в свою очередь вследствие опухоли, инфаркта или инфекции. При этом наблюдаются те же метаболические синдромы, что и при первичной недостаточности надпочечников, но отсутствует гиперпигментация.

Состояние, связанное с избытком глюкокортикоидов, обычно называют синдромом Кушинга. Как правило, оно возникает в результате фармакологического использования стероидов, но может быть обусловлено секретирующей АКТГ аденомой гипо-

физа, аденомой или карциномой надпочечников либо эктопической секрецией АКТГ клетками опухоли. При синдроме Кушинга у больных исчезает характерный суточный ритм секреции АКТГ/кортизола. Кроме того, наблюдается гипергликемия и (или) интолерантность к глюкозе, обусловленные ускорением глюконеогенеза. В прямой связи с этим стоит также и резкое усиление катаболизма белков, приводящее к истончению кожи, уменьшению мышечной массы, остеопорозу, интенсивной инволюции лимфоидной ткани и в целом к отрицательному азотному балансу. Происходит также и своеобразное перераспределение отложений жира, а именно ожирение туловища. Ослабевают сопротивляемость к инфекциям и воспалительные реакции, ухудшается заживление ран. Целый ряд симптомов, включая гипернатриемию, гипокалиемию, алкалоз, отечность и гипертензию, обусловлен минералокортикоидными эффектами кортизола.

Расстройства, связанные с минералокортикоидными гормонами

Небольшие аденомы клубочкового слоя служат причиной первичного альдостеронизма (синдром Конна), к классическим проявлениям которого относятся гипертензия, гипернатриемия и алкалоз. У больных первичным альдостеронизмом не выявляется избытка глюкокортикоидных гормонов в крови и снижены уровни ренина и ангиотензина II.

При стенозе почечных артерий, сопровождающемся снижением перфузионного давления, может возникнуть гиперплазия и гиперфункция юкстагломерулярных клеток, что ведет к повышению выработки ренина и ангиотензина II. В конечном итоге при этом развивается вторичный альдостеронизм, который отличается от первичной формы лишь повышенным уровнем ренина и ангиотензина II.

Врожденная гиперплазия надпочечников

Недостаточность стероидогенных ферментов приводит к недостаточности конечных продуктов и накоплению промежуточных продуктов стероидогенеза, а также активации альтернативных путей синтеза стероидов. Общая характеристика большинства из этих синдромов, развивающихся в эмбриональном периоде,—это недостаточность продукции кортизола на фоне гиперпродукции АКТГ и гиперплазия надпочечников; отсюда и название этих синдромов — врожденная гиперплазия надпочечников. Вторая общая характеристика — гиперпродукция андрогенов. Избыток андрогенов ведет к усилению роста тела, вирилизации, нарушению формирования наружных половых органов; отсюда другое название этих состояний — «адреногенитальный синдром». Причина вирилизации, возникающей при врожден-

ной гиперплазии надпочечников, станет понятной из обсуждения половой дифференцировки в гл. 49. Другие симптомы определяются тем, повышена или снижена продукция альдостерона, что сопровождается соответственно гипертензией либо потерей организмом соли.

Более 90% случаев врожденной гиперплазии надпочечников обусловлено двумя типами недостаточности 21-гидроксилазы: частичной (простая вирилизация) или полной (потеря соли организмом); остальные случаи связаны в основном с недостаточностью 11 β -гидроксилазы. Описаны лишь единичные случаи недостаточности других ферментов: 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназы, 17 α -гидроксилазы, холестерол-десмолазы, 18-гидроксилазы и 18-дегидрогеназы. Дефицит 18-гидроксилазы и 18-дегидрогеназы влияет только на биосинтез альдостерона и не вызывает гиперплазии надпочечников. Недостаточность холестерол-десмолазы блокирует биосинтез всех стероидов и потому несовместима с жизнью ребенка после рождения.

ЛИТЕРАТУРА

- Baxter J. D., Forsham P. H. Tissue effects of glucocorticoids, *Am. J. Med.*, 1972, **53**, 573.
- Chandler V. L. et al. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter responsive in vitro, *Cell*, 1983, **33**, 489.
- Gill G. N. Mechanism of ACTH action, *Metabolism*, 1972, **21**, 571.
- Cranner D. K. The role of glucocorticoid hormones as biological amplifiers. In: *Glucocorticoid Hormone Action*, Baxter J. D., Rousseau G. G. (eds.), Springer-Verlag, 1979.
- Morris D. J. The metabolism and mechanism of action of aldosterone, *Endocr. Rev.*, 1981, **2**, 234.
- Samuels H. H., Tomkins G. M. Relation of steroid structure to enzyme induction in hepatoma tissue culture cells, *J. Mol. Biol.*, 1970, **52**, 57.
- Weinberger C. et al. Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product, *Nature*, 1985, **318**, 670.
- Yamamoto K. R., Alberts B. M. Steroid receptors; Elements for modulation of eukaryotic transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, 1976, **45**, 721.

Гормоны мозгового вещества надпочечников

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Вегетативная (автономная) нервная система включает в себя **парасимпатическую** систему с холинергическими пре- и постганглионарными нервами, **симпатическую** нервную систему с холинергическими преганглионарными и адренергическими постганглионарными нервами и **мозговой слой надпочечников**. Последний, по сути дела, служит продолжением симпатической нервной системы, поскольку преганглионарные волокна чревного нерва оканчиваются на хромаффинных клетках мозгового слоя надпочечников, продуцирующих катехоламины — **дофамин**, **норадреналин** и **адреналин**. Следовательно, мозговой слой надпочечников представляет собой специализированный ганглий, лишенный продолжения в виде аксона. Хромаффинные клетки этого слоя синтезируют, запасают и секретируют продукты, действие которых осуществляется вдали от места их синтеза. Таким образом, мозговой слой выполняет функцию и эндокринного органа — прекрасный пример взаимодействия нервной и эндокринной систем, о чем упоминалось в гл. 44.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гормоны симпатoadреналовой системы хотя и не являются жизненно необходимыми, их роль в организме чрезвычайно велика: именно они обеспечивают адаптацию к острым и хроническим стрессам. Адреналин, норадреналин и дофамин — основные элементы реакции «**борьбы или бегства**» (возникающей, например, при неожиданной встрече с медведем в зарослях черники). Ответ на испытываемый при этом испуг включает в себя быструю интегрированную перестройку многих сложных процессов в органах, непосредственно участвующих в данной реакции (мозг, мышцы, сердечно-легочная система и печень). Это происходит за счет органов, менее необходимых и более поздно включающихся в ответ (кожа, желудочно-кишечный тракт и лимфоидная ткань). Затрагиваемые при реакции процессы перечислены

в табл. 49.1. В этом интегрированном метаболическом ответе адреналин 1) быстро поставляет жирные кислоты, выполняющие роль главного первичного топлива для мышечной активности; 2) мобилизует глюкозу в качестве источника энергии для мозга — путем повышения гликогенолиза и глюконеогенеза в печени и понижения поглощения глюкозы в мышцах и других органах; 3) понижает высвобождение инсулина, что также предотвращает поглощение глюкозы периферическими тканями, сберегая ее, в результате для центральной нервной системы. Катехоламины сами по себе не стимулируют реакции «борьбы или бегства», но включаются в ответ вместе с глюкокортикоидами, вазопрессином, ангиотензином, глюкагоном и соматотропином (гормон роста, СТГ, соматотропный гормон).

Таблица 49.1. Физиологические сдвиги при реакции «борьбы или бегства»

Орган	Процесс или результат
Мозг	Усиление кровотока Повышение обмена глюкозы
Сердечно-сосудистая система	Увеличение частоты и силы сердечных сокращений Сужение периферических сосудов
Легочная система	Повышение снабжения кислородом Расширение бронхов Увеличение вентиляции
Мышца	Повышение гликогенолиза Повышение сократимости
Печень	Повышение продукции глюкозы ↑ Глюконеогенез ↑ Гликогенолиз ↓ Синтез гликогена
Жировая ткань	Повышение липолиза ↑ Жирные кислоты и глицерол
Кожа	Снижение кровотока
Скелет	Снижение поглощения и утилизации глюкозы
Желудочно-кишечный тракт и мочеполовая система	Снижение синтеза белка
Лимфоидная ткань	Повышение протеолиза

БИОСИНТЕЗ КАТЕХОЛАМИНОВ

Катехоламиновые гормоны — дофамин, норадреналин и адреналин — представляют собой 3,4-дигидроксипроизводные фенилэтиламина. Они синтезируются в хромоаффинных клетках мозгового слоя надпочечников. Свое название эти клетки получили потому, что содержат гранулы, окрашивающиеся под действием бихромата калия в красно-коричневый цвет. Скопления таких клеток обнаружены также в сердце, печени, почках, половых железах, адренергических нейронах постганглионарной симпатической системы и в центральной нервной системе.

Главный продукт мозгового слоя надпочечников — адреналин. На долю этого соединения приходится примерно 80% всех катехоламинов мозгового слоя. Вне мозгового вещества адреналин не образуется. В отличие от него норадреналин, обнаруживаемый в органах, иннервируемых симпатическими нервами, образуется преимущественно *in situ* (~80% общего количества); оставшая часть норадреналина также образуется главным образом в окончаниях нервов и достигает своих мишеней с кровью.

Превращение тирозина в адреналин включает четыре последовательных этапа: 1) гидроксилирование кольца, 2) декарбоксилирование, 3) гидроксилирование боковой цепи и 4) N-метилирование. Путь биосинтеза катехоламинов и участвующие в нем ферменты представлены на рис. 49.1 и 49.2.

Тирозин-гидроксилаза

Тирозин — непосредственный предшественник катехоламинов, а тирозин-гидроксилаза лимитирует скорость всего процесса биосинтеза катехоламинов. Этот фермент встречается как в свободном виде, так и в связанной с субклеточными частицами форме. С тетрагидроптеридином в качестве кофактора он выполняет оксидоредуктазную функцию, превращая L-тирозин в L-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА). Существуют различные пути регуляции тирозин-гидроксилазы как скорость-лимитирующего фермента. Наиболее важный из них заключается в ингибировании катехоламинами по принципу обратной связи: катехоламины конкурируют с ферментом за птеридиновый кофактор, образуя с последним шиффово основание. Тирозин-гидроксилаза, кроме того, конкурентно ингибируется рядом производных тирозина, в том числе α-метилтирозином. В некоторых случаях это соединение используют для блокады избыточной продукции катехоламинов при феохромоцитоме, однако существуют более эффективные средства, обладающие к тому же менее выраженным побочным действием. Соединения еще одной группы подавляют активность тирозин-гидроксилазы, образуя комплексы с железом и удаляя таким путем

имеющийся кофактор. В качестве примера такого соединения можно привести α, α'-дипиридил.

Катехоламины не проникают через гемато-энцефалический барьер, и, следовательно, их присутствие в мозге должно объясняться местным синтезом. При некоторых заболеваниях центральной нервной системы, например болезни Паркинсона, наблюдаются нарушения синтеза дофамина именно в мозге. Предшественник дофамина — L-ДО-

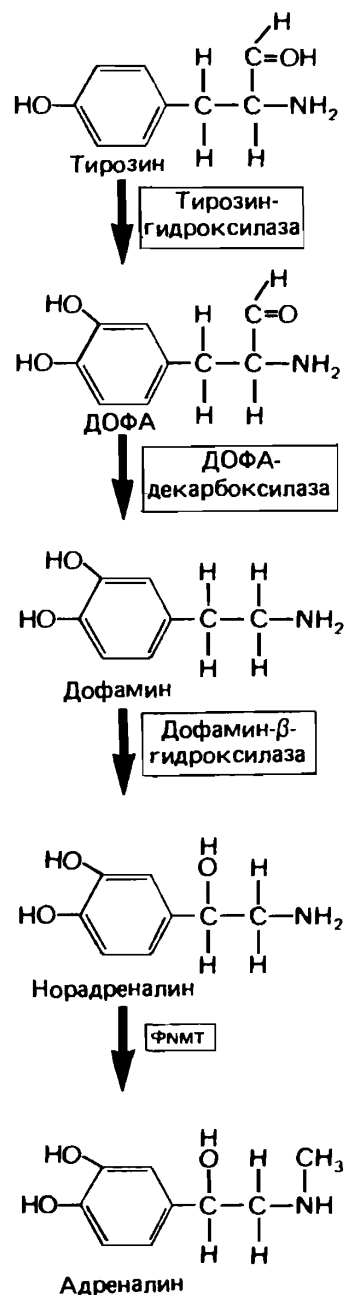


Рис. 49.1. Биосинтез катехоламинов. ФНМТ — фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза. (Modified and reproduced, with permission, from Goldfien A. The adrenal medulla. In: Basic and Clinical Endocrinology, 2nd ed. Greenspan FS, Forsham PH [editors]. Appleton and Lange, 1986.)

ФА — легко преодолевает гематоэнцефалический барьер и поэтому служит эффективным средством лечения болезни Паркинсона.

ДОФА-декарбоксилаза

В отличие от тирозин-гидроксилазы, обнаруживаемой лишь в тканях, способных синтезировать катехоламины, ДОФА-декарбоксилаза присутствует во всех тканях. Этому растворимому ферменту требуется пиридоксальфосфат для превращения L-ДОФА в 3,4-дигидроксифенилэтиламин (дофамин). Реакция конкурентно ингибируется соединениями, напоминающими L-ДОФА, например α -метил-ДОФА. Галоидзамещенные соединения образуют с L-ДОФА шиффово основание и также ингибируют реакцию декарбоксилирования.

α -Метил-ДОФА и другие родственные соединения, такие, как 3-гидрокситирамин (образующийся из тирамина), α -метириозин и метараминол, с успехом используются для лечения некоторых форм гипертонии. Антигипертензивное действие этих метаболитов обусловлено, по-видимому, их способностью стимулировать α -адренергические рецепторы (см. ниже) кортикобульбарной системы в центральной нервной системе, что приводит к уменьшению активности периферических симпатических нервов и снижению артериального давления.

Дофамин- β -гидроксилаза

Дофамин- β -гидроксилаза (ДБГ) — оксидаза со смешанной функцией, катализирующая превращение дофамина в норадреналин. ДБГ использует аскорбат в качестве донора электронов, а фумарат — в качестве модулятора; в активном центре фермента содержится медь. ДБГ клеток мозгового слоя надпочечников локализуется, вероятно, в секреторных гранулах. Таким образом, превращение дофамина в норадреналин происходит в этих органеллах. ДБГ высвобождается из клеток мозгового слоя надпочечников и нервных окончаний вместе с норадреналином, но (в отличие от последнего) не подвергается обратному захвату нервными окончаниями.

Фенилэтаноламин — N-метилтрансфераза

Растворимый фермент фенилэтаноламин — N-метилтрансфераза (ФНМТ) катализирует N-метилирование норадреналина с образованием адреналина в адреналин-продуцирующих клетках мозгового слоя надпочечников. Поскольку данный фермент растворим, можно предположить, что превращение норадреналина в адреналин происходит в цитоплазме. Синтез ФНМТ стимулируется глюкокортикоидными гормонами, проникающими в мозговой слой по внутринадпочечниковой портальной си-

стеме. Эта система обеспечивает в 100 раз большую концентрацию стероидов в мозговом слое, чем в системной артериальной крови. Столь высокая их концентрация в надпочечниках, по-видимому, необходима для индукции ФНМТ.

ЗАПАСАНИЕ И СЕКРЕЦИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Запасание

В мозговом слое надпочечников содержатся хромоаффинные гранулы — органеллы, способные к биосинтезу, поглощению, запасанию и секреции катехоламинов. Помимо катехоламинов в состав этих гранул входит ряд других веществ, в том числе АТР- Mg^{2+} , ДБГ, Ca^{+2} и белок хромогранин А. Катехоламины поступают в гранулы с помощью АТР-зависимого механизма транспорта и связываются с нуклеотидом в соотношении 4:1 (гормон: АТР). Норадреналин запасается в этих гранулах, но может выходить из них и метилироваться; образующийся в результате адреналин включается в новую популяцию гранул.

Секреция

Нервная стимуляция мозгового слоя надпочечников приводит к слиянию хромоаффинных гранул с плазматической мембраной, и таким образом обуславливает выброс норадреналина и адреналина путем экзоцитоза. Этот процесс зависит от кальция, и подобно другим процессам экзоцитоза стимулируется холинергическими и β -адренергическими агентами и ингибируется α -адренергическими агентами (рис. 49.2). Катехоламины и АТР высвобождаются в том же соотношении, в каком они присутствуют в гранулах. Это относится и к другим компонентам, включая ДБГ, кальций и хромогранин А.

Обратный захват катехоламинов нейронами — важный механизм, обеспечивающий, с одной стороны, сохранение гормонов, а с другой — быстрое прекращение гормональной или нейромедиаторной активности. В отличие от симпатических нервов мозговой слой надпочечников лишен механизма обратного захвата и запасания выделившихся катехоламинов. Секретируемый надпочечниками адреналин попадает в печень и скелетные мышцы, но затем быстро метаболизируется. Лишь очень небольшая часть норадреналина достигает отдаленных тканей. Катехоламины циркулируют в плазме в слабоассоциированном с альбумином виде. Они очень недолговечны: период их биологической полужизни составляет 10–30 с.

МЕТАБОЛИЗМ КАТЕХОЛАМИНОВ

Лишь очень небольшая часть адреналина (менее 5%) выделяется с мочой. Катехоламины быстро ме-

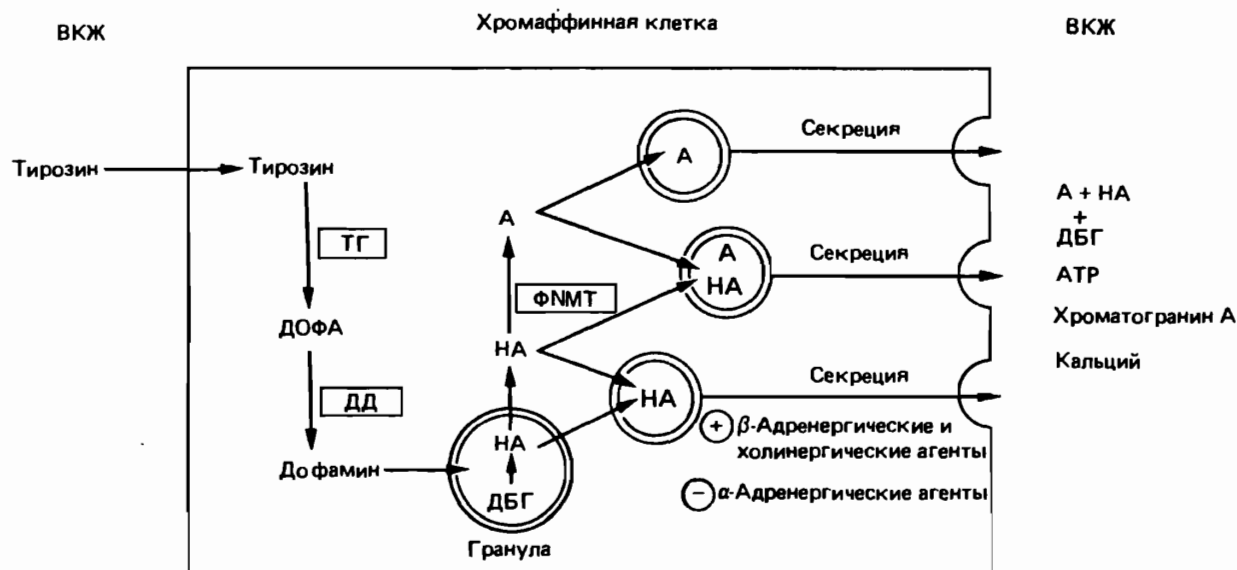


Рис. 49.2. Схема биосинтеза катехоламинов. ТГ — тирозингидроксилаза; ДД — ДОФА-декарбоксилаза; ФНМТ — фенилэтанол-амин-N-метилтрансфераза; ДБГ — дофамин-β-гидроксилаза; АТР — аденозинтрифосфат. Биосинтез катехоламинов происходит в цитоплазме и в различных гранулах клеток мозгового слоя надпочечников. В одних гранулах содержится адреналин (А), в других — норадреналин (НА), а в некоторых — оба гормона. При стимуляции все содержимое гранул высвобождается во внеклеточную жидкость (ВКЖ).

таболизируются под действием катехол-О-метилтрансферазы и моноаминоксидазы с образованием неактивных О-метилированных и дезаминированных продуктов (рис. 49.3). Большинство катехоламинов служат субстратами для обоих названных ферментов, причем реакции эти могут происходить в любой последовательности.

Катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) — цитозольный фермент, обнаруживаемый во многих тканях. Он катализирует присоединение метильной группы обычно по третьему положению (метоположение) бензольного кольца различных катехоламинов. Реакция требует присутствия двухвалентного катиона и S-аденозилметионина в качестве донора метильной группы. В результате этой реакции в зависимости от использованного субстрата образуются гомованилиновая кислота, норметанефрин и метанефрин.

Моноаминоксидаза (МАО) — оксидоредуктаза, дезаминирующая моноамины. Она обнаружена во многих тканях, но в наибольших концентрациях — в печени, желудке, почках и кишечнике. Описаны по крайней мере два изофермента МАО: МАО-А нервной ткани, дезаминирующая серотонин, адреналин и норадреналин, и МАО-В других (не нервных) тканей, наиболее активная в отношении 2-фенилэтиламина и бензиламина. Дофамин и тирамин метаболизируются обеими формами. Интенсивно исследуется вопрос о связи между аффективными расстройствами и повышением или понижением активности этих изоферментов. Ингибиторы МАО нашли применение при лечении гипертонии и депрессии, однако способность этих соединений вступать

в опасные для организма реакции с содержащимися в пище и лекарственных препаратах симпатомиметическими аминами снижает их ценность.

О-Метоксилированные производные подвергаются дальнейшей модификации путем образования конъюгатов с глюкуроновой или серной кислотой.

Катехоламины образуют множество метаболитов. Два класса таких метаболитов используются в диагностике, поскольку присутствуют в моче в легко измеримых количествах. **Метанефрины** представляют собой метоксипроизводные адреналина и норадреналина; О-метилированным дезаминированным продуктом адреналина и норадреналина является **3-метокси-4-гидроксиминдальная кислота** (называемая также **ванилиминдальной кислотой, ВМК**) (рис. 49.3). При феохромоцитоме концентрация метанефринов или ВМК в моче оказывается повышенной более чем у 95% больных. Диагностические тесты, основанные на определении этих метаболитов, отличаются высокой точностью, особенно когда их используют в сочетании с определением катехоламинов в моче или плазме

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА КАТЕХОЛАМИНОВ

Стимуляция чревного нерва, преганглионарные волокна которого иннервируют мозговой слой надпочечников, приводит к выделению (путем экзоцитоза) катехоламинов, содержащихся в гранулах белканосителя и ДБГ. Процесс стимуляции контролируется гипоталамусом и стволом мозга; происходит ли это по механизму обратной связи, точно не установлено.

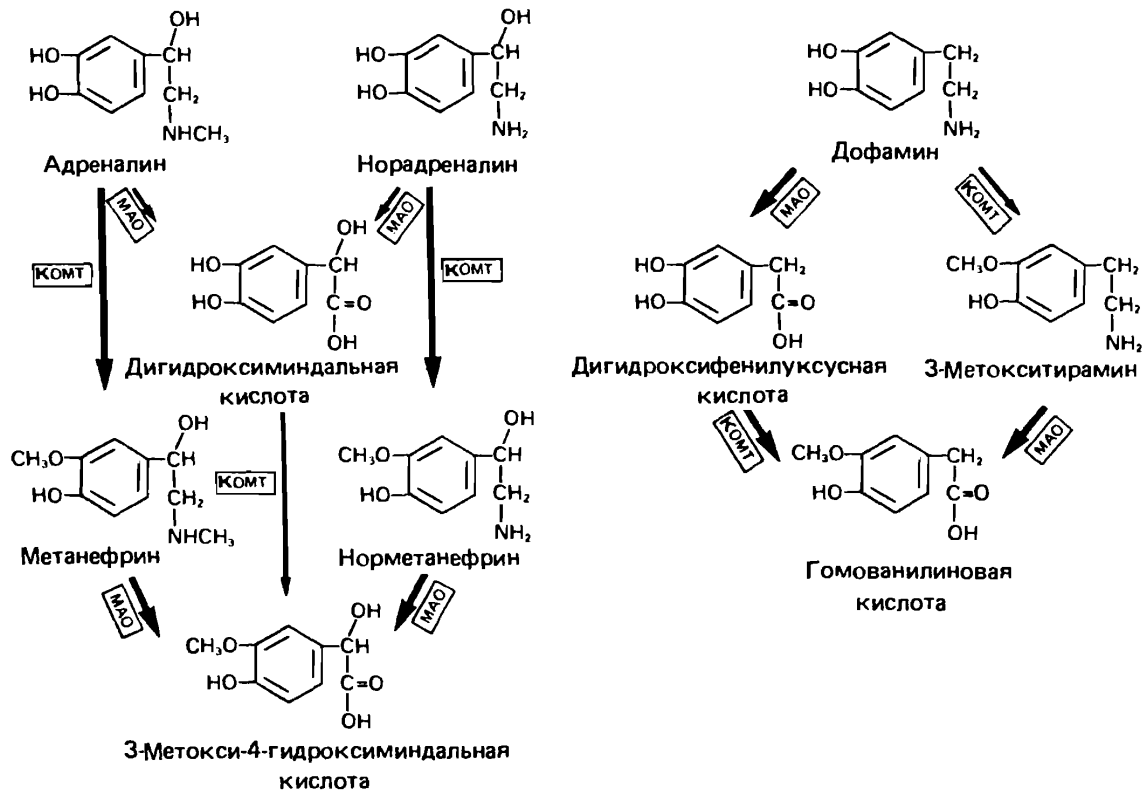


Рис. 49.3. Метаболические превращения катехоламинов под действием катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) и моноаминоксидазы (МАО). (Reproduced, with permission, from Goldfien A. The adrenal medulla. In: Basic and Clinical Endocrinology. 2nd ed. Greenspan FS, Forsham P. H. [editors]. Appleton and Lange, 1986.)

Стимуляция нерва приводит также к усилению синтеза катехоламинов. Уровень синтеза норадреналина повышается после острого стресса, но количество тирозин-гидроксилазы остается неизменным, хотя ее активность становится выше. Поскольку тирозин-гидроксилаза служит субстратом сАМР-зависимой протеинкиназы, вполне возможно, что такая активация сводится к фосфорилированию фермента. Длительный стресс, сопровождающийся хроническим повышением активности симпатических нервов, приводит к индукции (увеличению количества) тирозин-гидроксилазы. Имеются данные и об аналогичной индукции ДБГ. Индукция этих ферментов биосинтеза катехоламинов служит средством адаптации к физиологическому стрессу и зависит от нервных (при индукции тирозин-гидроксилазы и ДБГ) и эндокринных (при индукции ФНМТ) факторов.

КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Классификация

Механизм действия катехоламинов привлекает внимание исследователей почти целое столетие. Действительно, многие общие концепции рецепторной биологии и действия гормонов берут начало еще в самых ранних исследованиях.

Катехоламины действуют через два главных класса рецепторов: α -адренергические и β -адренергические. Каждый из них подразделяется на два подкласса: соответственно α_1 и α_2 , β_1 и β_2 . Данная классификация основана на относительном порядке связывания с различными агонистами и антагонистами. 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.

β -Адренергический рецептор

При молекулярном клонировании гена и кДНК β -адренергического рецептора млекопитающих выявились неожиданные особенности. Во-первых, оказалось, что в данном гене нет интронов и, следовательно, вместе с генами гистонов и интерферона он составляет единственную группу генов млекопитающих, лишенных этих структур. Во-вторых, удалось установить, что β -адренергический рецептор имеет близкую гомологию с родопсином (по крайней мере в трех пептидных участках)— белком, инициирующим зрительную реакцию на свет.

Таблица 49.2. Эффекты, опосредуемые различными адренергическими рецепторами

α_1	α_2	β_1	β_2
Повышение гликогенолиза Сокращение гладких мышц Кровеносные сосуды Мочеполовая система	Расслабление гладких мышц Желудочно-кишечный тракт Сокращение гладких мышц Некоторые сосуды Ингибирование липолиза секреции ренина агрегации тромбоцитов секреции инсулина	Стимуляция липолиза Сокращение миокарда Увеличение амплитуды Увеличение силы сокращений	Повышение глюконеогенеза в печени Повышение гликогенолиза в печени Повышение гликогенолиза в мышцах Повышение секреции инсулина глюкагона ренина Расслабление гладких мышц Бронхи Кровеносные сосуды Мочеполовая система Желудочно-кишечный тракт

Механизм действия

Рецепторы трех из этих подгрупп сопряжены с аденилатциклазной системой. Гормоны, связывающиеся с β_1 - и β_2 -рецепторами, активируют аденилатциклазу, тогда как гормоны, ассоциированные с α_2 -рецепторами, ингибируют ее (см. рис. 44.3 и табл. 44.3). Связывание катехоламинов индуцирует конденсирование рецептора с G-белком, связывающим затем GTP. Это либо стимулирует (G_s), либо ингибирует (G_i) аденилатциклазу, что в результате приводит к усилению или подавлению синтеза сАМР. Реакция выключается, когда GTPаза, связанная с α -субъединицей G-белка, гидролизует GTP (см. рис. 44.2). α_1 -Рецепторы участвуют в процессах, ведущих к изменению внутриклеточной концентрации кальция или к изменению метаболизма фосфатидилинозита (либо к тому и другому). Не исключено, что для этой реакции необходим особый G-белковый комплекс.

Между рецептором катехоламинов и системой зрительной реакции существует функциональное сходство. При световой стимуляции происходит сопряжение родопсина с трансдуцином — G-белковым комплексом, α -субъединица которого также связывает GTP. Активированный G-белок в свою очередь стимулирует фосфодиэстеразу, гидролизующую сGMP. В результате ионные каналы в мембране клеток колбочек сетчатки закрываются и возникает зрительная реакция. Она выключается, когда ассоциированная с α -субъединицей GTPаза гидролизует связанный GTP. Неполный перечень биохимических и физиологических эффектов, опосредованных различными адренергическими рецепторами, приведен в табл. 49.2.

Активация фосфопротеинов сАМР-зависимой протеинкиназой (см. рис. 44.4) обуславливает многие биохимические эффекты адреналина. В мышцах и в меньшей степени в печени адреналин стимули-

рует гликогенолиз путем активации протеинкиназы, которая в свою очередь активирует фосфорилазный каскад (см. рис. 19.7). Фосфорилирование гликогенсинтазы, напротив, ослабляет синтез гликогена. Действуя на сердце, адреналин увеличивает минутный объем в результате повышения силы (**инотропный эффект**) и частоты (**хронотропный эффект**) сокращений, что также связано с увеличением содержания сАМР. В жировой ткани адреналин повышает содержание сАМР, под действием которого чувствительная к гормонам липаза превращается в активную (фосфорилированную) форму. Этот фермент усиливает липолиз и высвобождение жирных кислот в кровь. Жирные кислоты используются в качестве источника энергии в мышцах и, кроме того, могут активировать глюконеогенез в печени.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Феохромоцитомы представляют собой опухоли мозгового слоя надпочечников, которые обычно не диагностируются до тех пор, пока не начнут продуцировать и секретировать адреналин и норадреналин в количествах, достаточных для появления тяжелого гипертонического синдрома. При феохромоцитоме часто бывает повышено отношение норадреналин: адреналин. Возможно, именно этим и объясняются различия в клинических проявлениях, поскольку норадреналину приписывают основную роль в патогенезе гипертонии, а адреналин считают ответственным за гиперметаболизм.

ЛИТЕРАТУРА

- Benovic J. L. et al. β -Adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, **83**, 2797.

- Cryer P. E.* Diseases of the adrenal medulla and sympathetic nervous system, Pages 511– 550. In: Endocrinology and Metabolism, Felig P. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1981.
- Dixon R. A. F. et al.* Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin, *Nature*, 1986, **321**, 75.
- Exton J. H.* Mechanism involved in α -adrenergic phenomena: Role of calcium ion in actions of catecholamines in liver and other tissues, *Am. J. Physiol.*, 1980, **238**, E3.
- Kaupp U. B.* Mechanism of photoreception in vertebrate vision, *Trends Biochem. Sci.*, 1986, **11**, 43.
- Perlman F. L., Chalfie M.* Catecholamine release from the adrenal medulla, *Clin. Endocrinol. Metab.*, 1977, **6**, 551.
- Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model, *Nature*, 1985, **317**, 124.
- Stiles G. L., Caron M. G., Lefkowitz R. K.* The β -adrenergic receptor: Biochemical mechanisms of physiological regulation, *Physiol. Rev.*, 1984, **64**, 661.
- Young J. B., Landsberg L.* Catecholamines and intermediary metabolism, *Clin. Endocrinol. Metab.*, 1977, **6**, 599.

Гормоны половых желез

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Половые железы (гонады)— бифункциональные органы, продуцирующие зародышевые клетки и половые гормоны. Эти две функции тесно взаимосвязаны, поскольку для развития зародышевых клеток требуется высокая концентрация половых гормонов. В яичниках образуются яйцеклетки и стероидные гормоны—эстрогены и прогестерон, в семенниках—сперматозоиды и тестостерон. Подобно надпочечникам, половые железы продуцируют довольно много стероидов, но лишь некоторые из них обладают гормональной активностью. Образование этих гормонов строго регулируется с помощью петли обратной связи, включающей в себя гипофиз и гипоталамус. Действие половых гормонов опосредовано ядерными механизмами, подобными тем, которые используются кортикостероидами.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Нормальное функционирование половых желез, связанное с их структурной и гормональной целостностью, совершенно необходимо для размножения, а следовательно, и для выживания видов. Знание физиологии и биохимии процесса репродукции служит основой при разработке новых подходов к контрацепции. Половые гормоны помимо своей основной функции влияния на размножение участвуют и в других важных процессах организма. Они, например, обладают анаболическим действием и поэтому необходимы для поддержания обмена веществ в коже, костях и мышцах.

ГОРМОНЫ СЕМЕННИКОВ

Семенники — бифункциональные органы, продуцирующие **тестостерон** (мужской половой гормон) и **сперматозоиды** (мужские половые клетки). Эти

функции выполняются специализированными клетками трех типов: 1) **сперматогониями** и более дифференцированными половыми клетками, локализованными в семенных канальцах; 2) **клетками Лейдига** (называемыми также интерстициальными клетками), которые разбросаны в соединительной ткани между извитыми семенными канальцами; эти клетки продуцируют тестостерон в ответ на ЛГ и 3) **клетками Сертоли**, образующими базальную мембрану семенных канальцев. Клетки Сертоли поставляют питательную среду, необходимую для дифференцировки и созревания половых клеток; в частности, под влиянием ФСГ они секретируют белок, связывающий андрогены (АСБ). Сперматогенез стимулируется пептидными гормонами ФСГ и ЛГ, выделяющимися из гипофиза. Для осуществления этого процесса необходимы среда, обеспечивающая дифференцировку половых клеток, и большая концентрация тестостерона, чем в системной крови. Эти условия выполняются с помощью локальной секреции АСБ и тестостерона клетками Сертоли и клетками Лейдига соответственно.

БИОСИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ ГОРМОНОВ СЕМЕННИКОВ

Синтез

Андрогены семенников синтезируются клетками Лейдига в интерстициальной ткани: в этих клетках содержится практически вся β -гидроксистероид-дегидрогеназа семенников— фермент, катализирующий ключевой этап биосинтеза тестостерона.

А. Биосинтетические пути.

1. **Тестостерон** служит непосредственным предшественником половых стероидов, подобно тому, как холестерол служит предшественником кортикостероидов надпочечников. Скорость-лимитирующим этапом, как и в надпочечниках, является отщепление

боковой цепи холестерина. Превращение холестерина в прегненолон в надпочечниках, яичниках и семенниках происходит идентично. Однако в двух последних тканях реакция стимулируется не АКТГ, а ЛГ.

Превращение прегненолона в тестостерон протекает с участием пяти ферментов: 1) 3β -гидроксистероид-дегидрогеназы (3β ОН-СД); 2) $\Delta^{5,4}$ -изомеразы; 3) 17α -гидроксилазы; 4) C_{17-20} -лиазы и 5) 17β -гидроксистероид-дегидрогеназы (17β -ОН-СД). Соответствующая последовательность реакций, получившая название прогестеронового (или Δ^4) пути, показана на рис. 50.1 справа. Превращение прегненолона в тестостерон может происходить также и по дегидроэпиандростероновому (или Δ^5) пути (рис. 50.1, слева). В семенниках человека, по-видимому, преобладает Δ^4 -путь. Важно помнить, однако, что семенники человека мало доступны для исследования и большинство работ по выявлению этих путей проводилось на животных. Возможны существенные видовые различия.

Перечисленные пять ферментов локализованы в микросомной фракции семенников крысы, причем обнаружена тесная функциональная связь между активностями 3β -ОН-СД и $\Delta^{5,4}$ -изомеразы и между активностями 17α -гидроксилазы и C_{17-20} -лиазы. Эти ферментные пары изображены в общей последовательности реакции на рис. 50.1 и в схеме путей биосинтеза андрогенов в микросомных мембранах тестикулов на рис. 50.2. На последнем рисунке отражено поступление различных субстратов биосинтеза тестостерона в микросомы, а также последовательность их включения в цепь реакций Δ^4 -пути. В силу наличия четырех потенциальных субстратов для единственной, по-видимому, 3β -ОН-СД существует множество альтернативных путей. Путь, избираемый в каждом конкретном случае зависит, вероятно, от концентрации субстратов вблизи различных ферментов. Изменения концентраций могут быть обусловлены разделением субстратов в микросомной мембране.

2. Другие гормоны семенников. Дигидротестостерон (ДГТ) образуется из тестостерона в результате восстановления кольца А под действием фермента **5 α -редуктазы**. Суточная секреция ДГТ семенниками человека составляет примерно 50—100 мкг, однако подавляющая часть ДГТ является продуктом периферического превращения (см. ниже).

В семенниках вырабатываются также небольшие, но все же существенные количества 17β -эстрадиола (E_2) — женского полового гормона. Большая часть образующегося у самцов E_2 — это результат периферической ароматизации тестостерона и андростендиона. Считается, что в синтезе E_2 участвуют клетки Лейдига, клетки Сертоли и семенные каналы. Роль E_2 у самцов не установлена. Возможно, он участвует в механизмах регуляции ФСГ. Чрезмерно высокое содержание E_2 в плазме и изменения соотношения

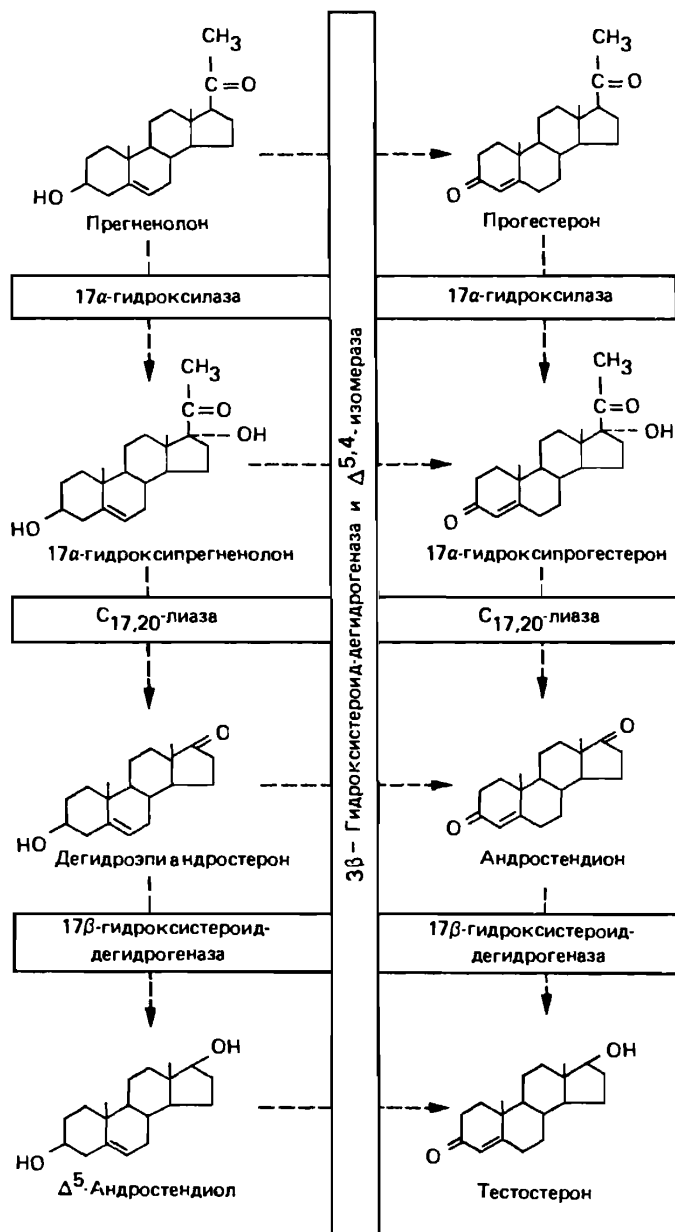


Рис. 50.1. Пути биосинтеза тестостерона. Слева — дегидроэпиандростероновый (или Δ^5) путь, справа — прогестероновый (или Δ^4) путь.

свободный E_2 : тестостерон характерны для пубертатной или постпубертатной гинекомастии, а также для хронических болезней печени или при гипертиреозе.

Б. Возрастные изменения продукции тестикулярных гормонов

У плодов и новорожденных крыс преобладает тестостерон. Однако вскоре после рождения семенники начинают производить только андростерон. Способность к образованию тестостерона восстанавливается в период полового созревания и сохраняется

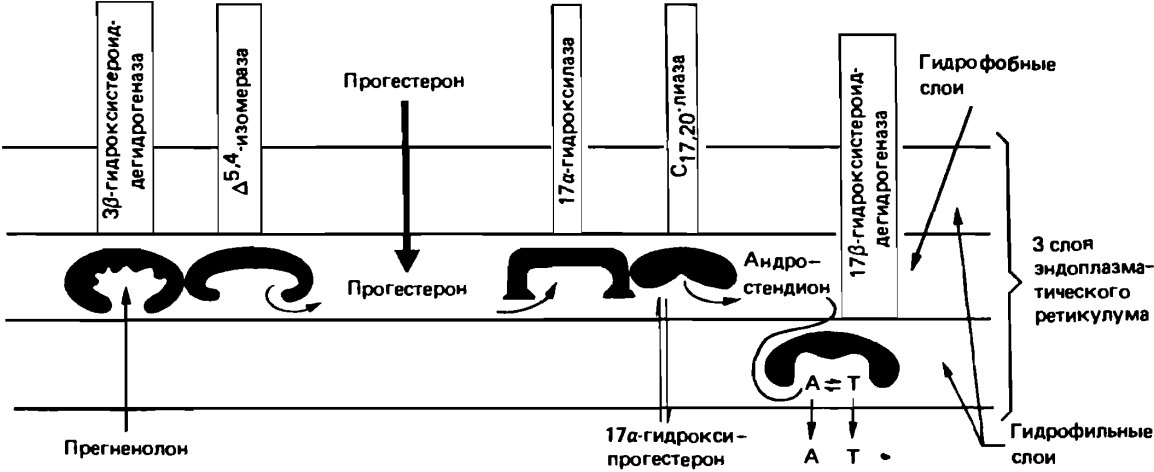


Рис. 50.2. Схема биосинтеза андрогенов в микросомной мембране семенников. Мембрана изображена в виде горизонтальной линии, что, возможно, соответствует ее виду в клетке. Однако в препаратах микросом она образует пузырьки (везикулы). A — андростендион, T — тестостерон. (Reproduced, with permission, from DeGroot L. J. Endocrinology, Vol. 3, Grune and Stratton, 1979.)

до конца жизни. Аналогичные результаты получены и в отношении других видов. Вполне возможно, что такие же возрастные изменения наблюдаются у человека.

Секреция и транспорт

В венозной крови семенников присутствует несколько стероидов, но **главный стероид, секретируемый семенниками взрослой особи,— это тестостерон.** У мужчин суточная секреция тестостерона составляет в норме 5 мг. Процесс секреции тестикулярных стероидов, по-видимому, не регулируется; как и другие стероидные гормоны, тестостерон, очевидно, секретируется по мере образования.

В плазме большинства млекопитающих, в том числе и человека, имеется β-глобулин, специфически связывающий тестостерон с относительно высоким сродством и ограниченной емкостью (табл. 50.1). Этот белок, называемый обычно **секс-гормон-связывающим глобулином (СГСГ)** или **тестостерон-эстроген-связывающим глобулином (ТЭСГ)**, образуется в печени. Его продукция усиливается под действием эстрогенов (у женщин концентрация СГСГ в сыворотке вдвое выше, чем у мужчин) при определенных болезнях печени и при гипертиреозе; под влиянием андрогенов с возрастом и при гипотиреозе образование данного белка уменьшается. Многие из этих факторов влияют также на синтез кортикостероид-связывающего глобулина (см. гл. 48) и тиреотропин-связывающего глобулина (см. гл. 46). Поскольку СГСГ и альбумин связывают до 97—99% циркулирующего в крови тестостерона, лишь небольшая его часть находится в крови в свободной (биологически активной) форме. Основная функция СГСГ состоит, вероятно, в том, чтобы ограничивать кон-

Таблица 50.1. Связывание гормонов с секс-гормон-связывающим глобулином (СГСГ)

Связываемые стероиды	Несвязываемые стероиды
Тестостерон	Конъюгированные андрогены
17-β-эстрадиол	17-α-тестостерон
Дигидротестостерон	Дегидроизоандростерон
Другие 17-β-гидроксистероиды	Кортизол
Эстрон	Прогестерон

центрацию свободного тестостерона в сыворотке. Тестостерон связывается с СГСГ с большим сродством, чем эстрадиол (табл. 50.2), поэтому при изменении концентрации СГСГ содержание свободного тестостерона меняется в большей степени, чем свободного эстрадиола. Увеличение концентрации СГСГ способствует росту соотношения свободный.

Таблица 50.2. Приблизительное сродство стероидов к связывающим белкам плазмы

Гормон	СГСГ ¹⁾	КСГ ¹⁾
Эстрадиол	5	> 10
Эстрон	> 10	> 100
Андростендион	...	...
Тестостерон	2	> 100
Дигидротестостерон	1	> 100
Прогестерон	> 100	2
Кортизол	> 100	3

¹⁾ Сродство выражается как K_d в молях × 10⁹. (Adapted from Siiteri R. K., Febres F. Ovarian hormone synthesis, circulation and mechanisms of action. Page 1401. In: Endocrinology, Vol. 3. DeCroot L. J. (editor). Grune and Stratton, 1979.)

эстрадиол:тестостерон. Этот феномен имеет место при старении, циррозе печени и гипертиреозе и, следовательно, вносит определенный вклад в признаки и симптомы «эстрогенизации», свойственной этим состояниям.

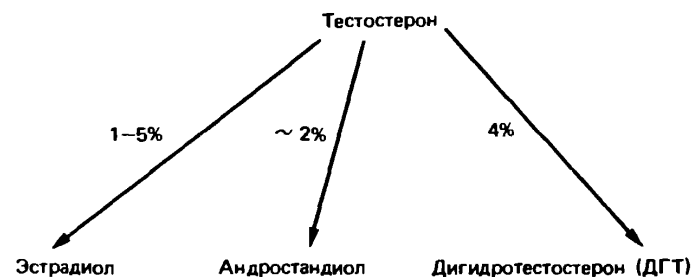
Периферический метаболизм и экскреция

А. Метаболические пути. Метаболические превращения тестостерона осуществляются двумя путями. Один путь включает в себя окисление в 17-м положении, другой — восстановление двойной связи кольца А и 3-кетогруппы¹. В результате первого пути, функционирующего во многих тканях, в том числе и в печени, образуются 17-кетостероиды, как правило, лишённые активности или обладающие более слабой активностью, чем исходное соединение. Второй путь, менее эффективный, протекает главным образом в тканях-мишенях и ведет к образованию активного метаболита — ДГТ, а также эстрадиола и андростандиола. Этиохоланолон и андростерон — это 5 β -восстановленные продукты андрогенов.

Б. Метаболиты тестостерона. Наиболее важный метаболит тестостерона — ДГТ — представляет собой активную форму гормона и обнаруживается во многих тканях, включая семенные пузырьки, предстательную железу, наружные половые органы и некоторые участки кожи. В плазме взрослых мужчин содержание ДГТ примерно в десять раз ниже содержания тестостерона: за сутки его образуется приблизительно 400 мкг (сравните с 5 мг тестостерона). Превращение тестостерона в ДГТ катализируется NADPH-зависимой 5 α -редуктазой.

Таким образом, тестостерон можно рассматривать как прогормон по двум причинам: во-первых, он превращается в более активное соединение дигидротестостерон и, во-вторых, превращение это происходит главным образом в тканях, расположенных вне семенников. Небольшая часть тестостерона ароматизируется, образуя эстрадиол, что особенно важно для мозга, где эти гормоны участвуют в формировании полового поведения животных. Андростан-

диол, еще один высоко активный андроген, также образуется из тестостерона.



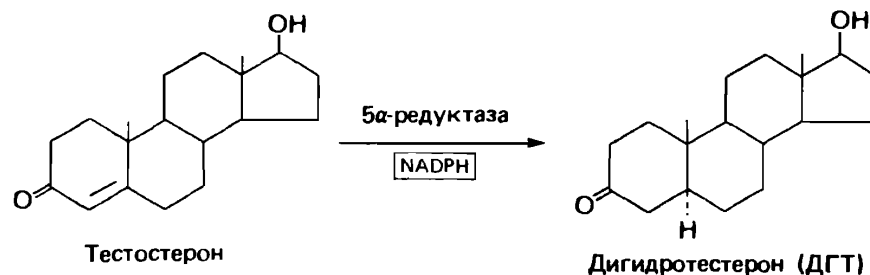
Главные 17-кетостероидные метаболиты тестостерона — андростерон и этиохоланолон — конъюгируют в печени с глюкуронидом и сульфатом с образованием водорастворимых экскретируемых соединений. Количественное определение 17-кетостероидов в моче использовалось ранее в качестве теста на андрогенную активность. Теперь, однако, установлено, что этот показатель слабо отражает гормональный статус *in vivo*.

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ СЕМЕННИКОВ

Регуляция стероидогенеза

Функция семенников регулируется ЛГ и ФСГ (рис. 50.3). ЛГ стимулирует стероидогенез и образование тестостерона, связываясь с рецепторами на плазматической мембране клеток Лейдига (аналогичные рецепторы ЛГ найдены на поверхности клеток желтого тела) и активируя аденилатциклазу, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации cAMP. В результате ускоряется процесс отщепления боковой цепи холестерина. Обусловлено ли это активацией или индукцией фермента или же усилением транспорта холестерина к ферменту, пока не установлено. Весьма возможно, что в данном случае имеет место индукция какого-то белка, ускоряющего этот процесс. Сходство между рассматриваемым эффектом ЛГ и действием АКТГ на надпочечники очевидно. Хотя ЛГ (или ХГЧ) по имеющимся данным индуцирует ферменты стероидогенеза, включая 3 β -ОН-СД, C₁₇₋₂₀-лиазу и 5 α -редуктазу, первичный эффект проявляется, по-видимому, на каком-то этапе превращения холестерина в прегненолон.

¹ По новой номенклатуре следует писать оксостероиды и т. д., но поскольку в медицинской литературе принят термин «кетостероиды», здесь мы будем придерживаться этого названия — *Прим. перев.*



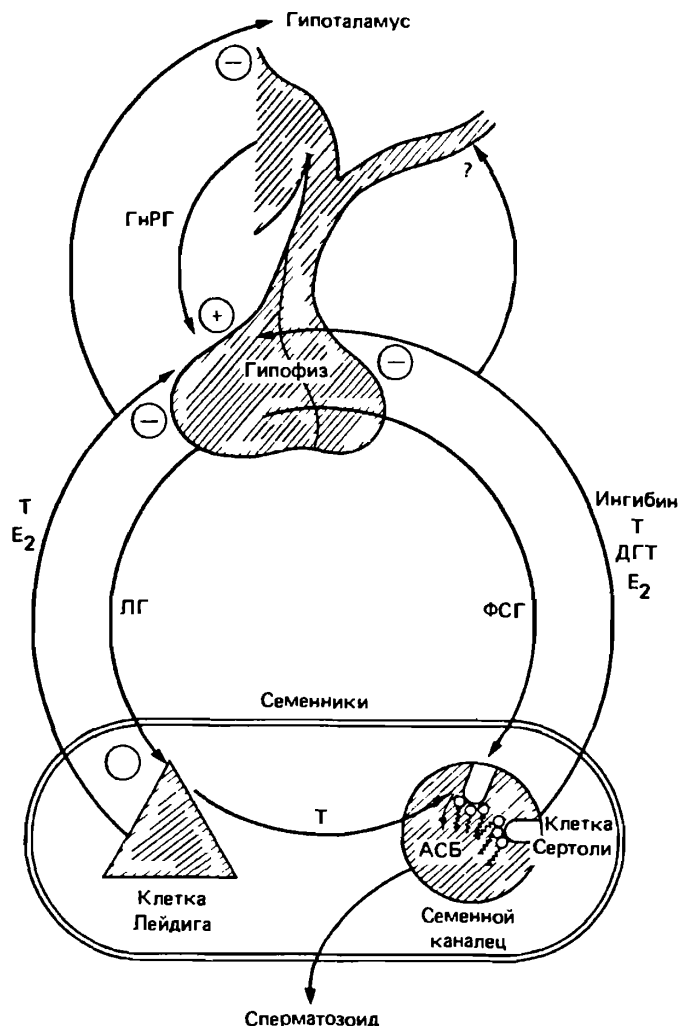


Рис. 50.3. Регуляция функции семенников по механизму обратной связи. ГнРГ — гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин), ЛГ — лютеинизирующий гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, Т — тестостерон, ДГТ — дигидротестостерон, АСБ — андроген-связывающий белок. E_2 — 17β -эстрадиол. Знаком «плюс» в кружочке обозначено положительное влияние, знаком «минус» — отрицательное. (Reproduced, with permission, from Braunstein G. D. The tests. In: Basic and Clinical Endocrinology, 2nd, ed., Greenspan F. G., Forsham P. H. [editors]. Appleton and Lange, 1986.)

Регуляция секреции гонадотропинов по принципу обратной связи, вероятно, обеспечивается связыванием тестостерона со своим рецептором (рис. 50.3 и 50.4). Обратная связь в этом случае реализуется в гипоталамусе через ингибирование высвобождения или продукции гонадолиберина, а возможно, путем подавления обеих функций. Не исключено также, что ингибируется действие гонадолиберина на ЛГ-продуцирующие клетки передней доли гипофиза.

В норме высвобождение гонадолиберина (ГнРГ) имеет пульсирующий характер; в экспериментальных системах максимальное образование гонадотропинов (ЛГ и ФСГ) наблюдается лишь при имита-

ции пульсирующего поступления ГнРГ. Длительное воздействие постоянно повышенной концентрации гонадолиберина приводит, по-видимому, к десенсибилизации клеток-мишеней и сильному подавлению секреции ЛГ и ФСГ; вот почему длительно действующие аналоги ГнРГ могут оказаться эффективными в качестве контрацептивных агентов.

До пубертатного периода в сыворотке крови содержится очень мало тестостерона. На ранних этапах полового созревания усиливаются связанные со сном импульсы секреции ЛГ и ФСГ. Когда уровень тестостерона в сыворотке повышается, появляются вторичные половые признаки. Сигнал запуска для этого процесса пока еще не расшифрован; согласно наиболее распространенной гипотезе, гипоталамические центры, ответственные за образование гонадолиберина, становятся менее чувствительными к ингибирующему действию половых стероидных гормонов по принципу обратной связи.

Регуляция сперматогенеза

В этой сложной проблеме мы рассмотрим лишь один вопрос — регуляцию секреции ФСГ по принципу обратной связи. **ФСГ взаимодействует с клетками Сертоли и стимулирует синтез андроген-связывающего белка (АСБ).** Этот белок представляет собой гликопротеин, связывающий тестостерон; он отличается от СГСГ и внутриклеточного рецептора андрогенов. АСБ секретируется в просвет семенного канальца, что сопровождается переносом тестостерона (в высокой концентрации) из клеток Лейдига, где он образуется, к месту, в котором происходит сперматогенез (рис. 50.3). Этот процесс, по-видимому, чрезвычайно важен, поскольку даже при нормальной концентрации тестостерона в общем кровотоке (что достигается, например, при заместительной терапии) сперматогенез не восстанавливается.

Хотя до сих пор идентифицирован лишь один гонадолиберин (ГнРГ), имеются данные о **независимой секреции ФСГ и ЛГ**. Так, при избирательном разрушении семенных канальцев или прекращении по каким-то причинам сперматогенеза у мужчин сохраняется нормальное содержание ЛГ и тестостерона, но концентрация ФСГ возрастает. Выделено образующееся в семенных канальцах или клетках Сертоли вещество «ингибин», регулирующее секрецию ФСГ. Частично этот эффект обратной связи может опосредоваться эстрадиолом, синтезирующимся в небольших количествах в клетках Лейдига и Сертоли. Образование эстрадиола в данных клетках стимулируется ФСГ, а сам эстрадиол в определенных экспериментальных условиях подавляет высвобождение ФСГ. Эти вероятные механизмы регуляции ФСГ показаны на рис. 50.3.

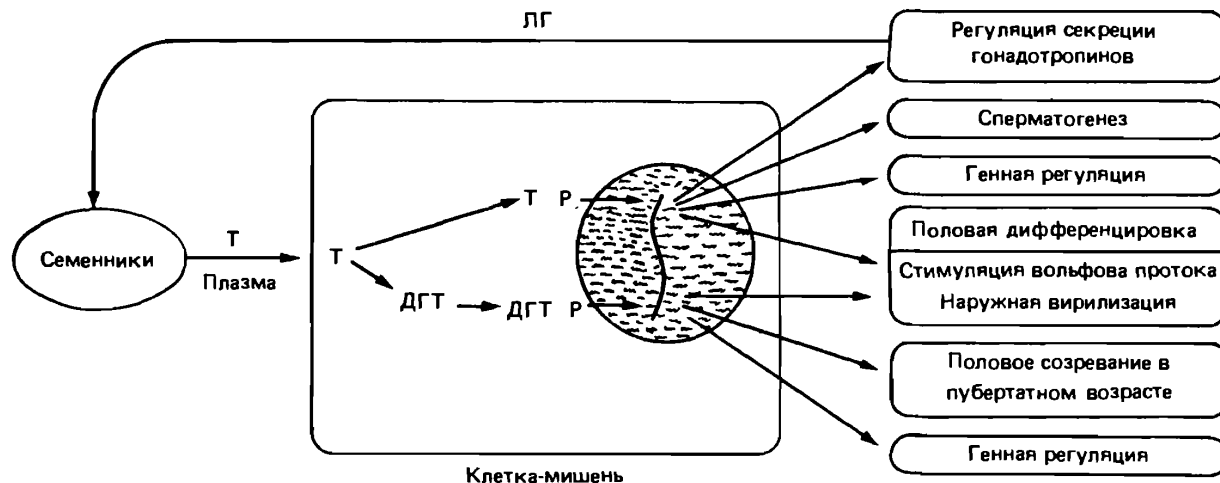


Рис. 50.4. Механизм действия андрогенов. ЛГ — лютеинизирующий гормон, Т — тестостерон, ДГТ — дигидротестостерон, Р — рецептор андрогенов. (Modified and reproduced, with permission, from Wilson J. D. et al. The endocrine control of male phenotypic development. Aust. J. Biol. Sci, 1983, 36, 101.)

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ СЕМЕННИКОВ

Андрогены, главным образом тестостерон и ДГТ, участвуют в 1) половой дифференцировке, 2) сперматогенезе, 3) развитии вторичных половых признаков и структур, 4) анаболических процессах и регуляции генов и 5) характерном для самцов половом поведении (рис. 50.4). Столь большое разнообразие процессов, зависящих от андрогенов, затрудняет подразделение тканей на мишени и немишени. В более узком смысле ткани-мишени можно классифицировать в зависимости от того, подвержены ли они действию тестостерона или ДГТ. К классическим клеткам-мишеням ДГТ (имеющим соответственно наиболее высокую активность 5 α -редуктазы) относятся предстательная железа, семенные пузырьки, наружные половые органы и кожа половых органов. Мишени для тестостерона включают эмбриональные вольфовы структуры, сперматогонии, мышцы, кости, почки и мозг. Специфический андроген, участвующий в регуляции многих других упоминавшихся выше процессов, не установлен.

Половая дифференцировка

Половая дифференцировка — главный эффект андрогенов. Поскольку она дает уникальную возможность познакомиться с тем, каким образом отдельные гормоны влияют на дифференцировку тканей, мы рассмотрим этот вопрос ниже в специальном разделе.

Сперматогенез

Зависимость сперматогенеза от тестостерона несомненна. Однако точная роль гормона в этом про-

цессе не установлена. Возможно, действие тестостерона проявляется на относительно поздних стадиях сперматогенеза, поскольку в незрелых семенниках этот гормон не индуцирует сперматогенеза и, кроме того, не восстанавливает способности к образованию спермы у гипопизэктомированных животных, у которых эта функция регрессирована.

Созревание добавочных половых тканей

Повышенное образование тестостерона в период половой зрелости обуславливает созревание добавочных половых тканей. Половой член, предстательная железа и семенные каналы увеличиваются в размерах. Изменяется и структура кожи и волос: характерные для детского возраста тонкие волосы делаются жестче, нежная кожа грубеет. Начинает расти борода, утолщаются голосовые связки, увеличиваются сальные железы.

Анаболические процессы

Наступление половой зрелости сопровождается быстрым ростом мышечно-скелетной системы. Хрящи эпифизарных пластинок роста увеличиваются в размерах и начинается образование новой костной ткани. Происходящее при этом удлинение костей сопровождается значительным увеличением массы скелетных мышц. Проанализировать эти эффекты на молекулярном уровне трудно, но определенная информация все же имеется. Судя по всему, андрогены индуцируют в тканях-мишенях синтез белка с помощью хорошо известного механизма, характерного для действия и других стероидных гормонов: гормон-рецепторный комплекс распознает специфические участки хроматина и избирательно активирует определенные гены (см. гл. 44). Именно так, по-

видимому, осуществляется запуск синтеза АСБ, альдолазы и ферментов, участвующих в образовании полиаминов. Аналогичные механизмы, вероятно, действуют в случае вызываемой андрогенами гипертрофии мышц, хотя ответственные за это специфические белки (гены) пока не обнаружены.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ СЕМЕННИКОВ

Современные представления о механизме действия андрогенов проиллюстрированы на рис. 50.4. Свободный тестостерон проникает в клетки через плазматическую мембрану путем пассивной или облегченной диффузии. Клетки-мишени удерживают тестостерон, что, по-видимому, обеспечивается связыванием гормона со специфическим внутриклеточным рецептором. Как ни велико различие между разными тканями, в большинстве из них удерживаемый гормон обнаруживается в клеточном ядре. В цитоплазме многих (но не всех) клеток-мишеней имеется фермент 5 α -редуктаза, под действием которого тестостерон превращается в ДГТ. Данные о существовании отдельных рецепторов для тестостерона и ДГТ противоречивы, однако все сходится на том, что даже при наличии единого класса рецепторов их сродство к ДГТ превышает сродство к тестостерону. У мышей мутация по единственному гену приводит к тому, что в различных тканях не связываются с рецептором ни тестостерон, ни ДГТ. Этот факт убедительно свидетельствует о наличии единого белкового рецептора для обоих гормонов. Какой из двух комплексов (тестостерон-рецептор или ДГТ-рецептор) будет активным, зависит, вероятно, от различия в сродстве рецептора к этим гормонам в сочетании со способностью тканей-мишеней образовывать из тестостерона ДГТ.

Для функционирования андрогенов необходимо, чтобы комплекс тестостерон/ДГТ-рецептор проник в ядро. Связыванию этого комплекса с хроматином, по-видимому, предшествует этап активации; хроматин при этом проявляет определенную специфичность или акцепторную функцию. Природа ядерного акцептора для рецептор-стероидного комплекса пока еще не установлена.

Аналогично другим стероидным (и некоторым пептидным) гормонам комплекс тестостерон/ДГТ-рецептор, по-видимому, активирует специфические гены, белковые продукты которых опосредуют многие (если не все) эффекты соответствующего гормона. Тестостерон стимулирует синтез белка в мужских половых органах. Этот эффект обычно сопряжен с накоплением общей клеточной РНК, включающей мРНК, тРНК и рРНК. Более специфичным примером служит влияние тестостерона на синтез АСБ. Гормон усиливает транскрипцию гена АСБ, повышая содержание мРНК, кодирующей данный белок.

Другим хорошо изученным примером является α_2 -глобулин—главный белок, выделяемый самцами крыс с мочой. Он синтезируется в печени половозрелых (старше 40 дней) самцов. У самок же и кастрированных самцов этот белок синтезируется лишь в том случае, если животное получает тестостерон. Эстрогены подавляют образование α_2 -глобулина, а для его максимального синтеза требуется совместное действие многих гормонов, включая гонадотропин, гормоны щитовидной железы, инсулин и глюкокортикоиды. Скорость синтеза α_2 -глобулина непосредственно связана с количеством мРНК этого белка, которое в свою очередь зависит от скорости транскрипции гена α_2 -глобулина.

Почки служат главной тканью-мишенью для андрогенов. Эти гормоны вызывают увеличение размеров почек и индуцируют синтез ряда ферментов у различных видов животных.

Вполне возможно, что такие сложные эффекты андрогенов, как их влияние на секреторную активность желез или гипертрофия мышц, реализуются с помощью иного механизма. Известно, кроме того, что андрогены стимулируют в некоторых тканях-мишенях размножение клеток—эффект, еще не нашедший объяснения. Тестостерон или ДГТ в сочетании с E_2 , по-видимому, участвуют в возникновении доброкачественной спухоли предстательной железы (состояние, характерное для 75% мужчин старше 60 лет).

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У МУЖЧИН

Снижение уровня синтеза тестостерона называют гипогонадизмом. При гипогонадизме у лиц, не достигших половой зрелости, вторичные половые признаки не развиваются. Если же гипогонадизм развивается у взрослых мужчин, эти признаки претерпевают обратное развитие. Первичный гипогонадизм обусловлен процессами, которые непосредственно влияют на семенники и вызывают их недостаточность. В основе вторичного гипогонадизма лежит нарушение секреции гонадотропинов. Изучение наследственных патологий способствует выяснению роли отдельных этапов биосинтеза и функционирования андрогенов. На рис. 50.5 представлен механизм действия этих гормонов, начиная от биосинтеза тестостерона и кончая пострецепторным действием тестостерона и ДГТ. В настоящее время известно не менее пяти разных генетических дефектов в биосинтезе тестостерона, описана недостаточность 5 α -редуктазы; во многих случаях либо совсем не обнаруживается рецептор тестостерона/ДГТ, либо этот рецептор так или иначе изменен; наконец, выявлены больные (всегда с мужским генотипом), у которых все определяемые компоненты, в том числе и рецептор, в норме и тем не менее характери-

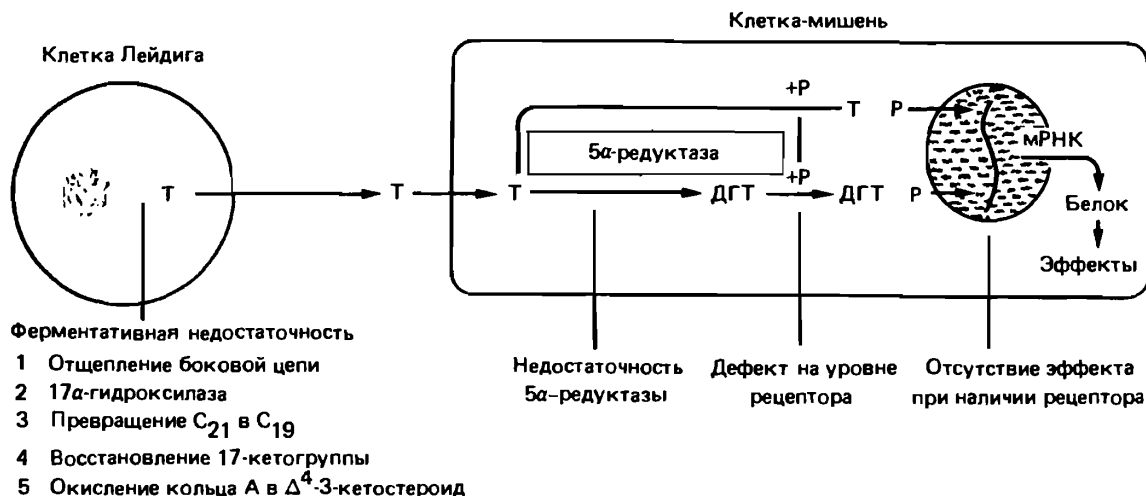


Рис. 50.5. Причины отсутствия андрогенного эффекта. Показаны четыре этапа, для каждого из которых идентифицированы мутации. Т — тестостерон, ДГТ — дигидротестостерон, Р — рецептор андрогенов. (Modified and reproduced, with permission, from Wilson J. D. et al. The endocrine control of male phenotypic development. Aust J. Biol. Sci. 1983, 36, 101.)

зующиеся феминизацией. Степень нарушения дифференцировки зависит от тяжести дефицита. Так, полное отсутствие одного из ферментов биосинтеза обуславливает женский фенотип при мужском (XY) генотипе, а при умеренной недостаточности фермента может наблюдаться лишь аномальная локализация мочеиспускательного канала в половом члене. У генетических мужчин, полностью лишенных функционирующих рецепторов, имеются семенники и образуется тестостерон, но при этом у них наблюдается полная феминизация наружных половых органов (так называемый **синдром тестикулярной феминизации**). Любопытно, что аналогичная недостаточность синтеза или активности эстрогенов не обнаружена.

ГОРМОНЫ ЯИЧНИКОВ

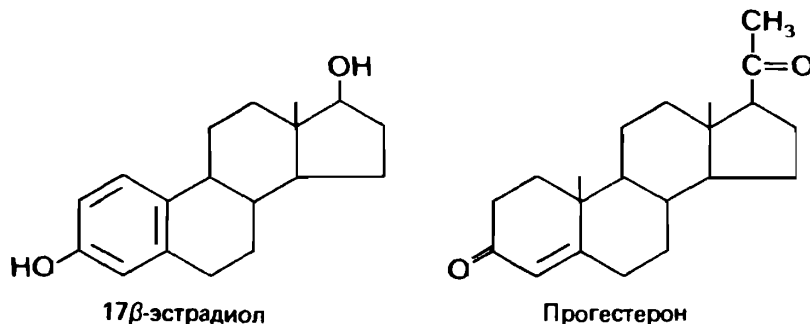
Яичники — бифункциональные органы, продуцирующие женские половые гормоны — **эстрогены** и **прогестины**, а также **яйцеклетки** (женские половые клетки). Наиболее активные гормоны, вырабатываемые в яичниках, — 17β -эстрадиол (E_2) и прогестерон.

БИОСИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ ГОРМОНОВ ЯИЧНИКОВ

Синтез

Эстрогены — семейство гормонов, синтезируемых в яичниках и других тканях. 17β -Эстрадиол — основной гормон яичников. У представителей некоторых видов преобладает эстрон, однако он синтезируется вне яичников. При беременности образуется относительно больше эстриола, но и этот гормон синтезируется вне яичников. Основной путь и субклеточная локализация ферментов первых этапов биосинтеза эстрадиола такие же, как в надпочечниках и семенниках. Превращения, протекающие только в яичниках, показаны на рис. 50.6.

Эстрогены образуются путем **ароматизации андрогенов** в результате сложного процесса, включающего три этапа гидроксилирования, каждый из которых требует O_2 и NADPH. В состав ароматазного ферментного комплекса по имеющимся данным входит цитохром *P-450*-оксидаза со смешанной функцией. Если субстратом данного комплекса служит тестостерон, образуется эстрадиол; ароматизация андростендиона приводит к образованию эстрона (этот процесс, как правило, протекает вне яичников).



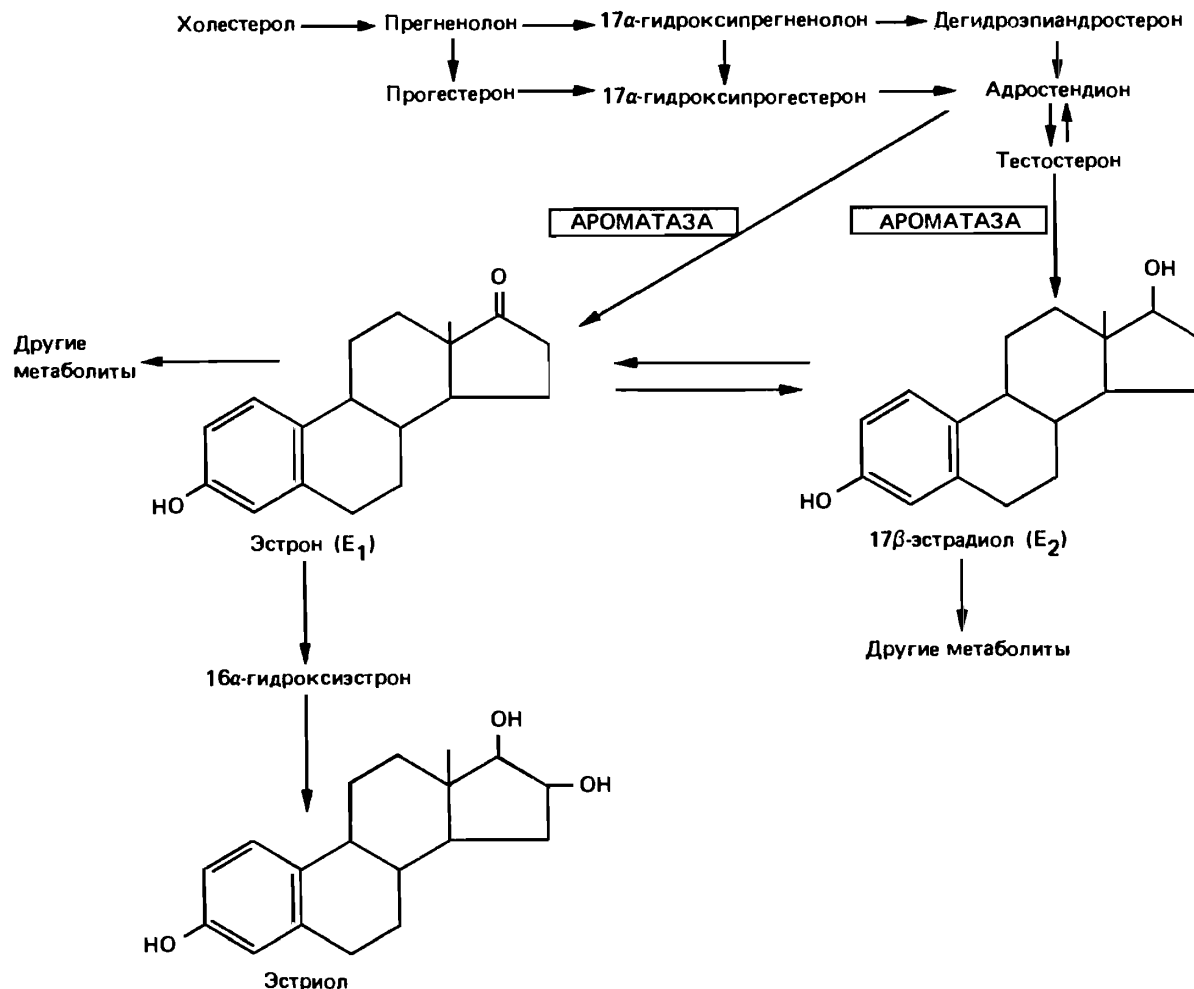


Рис. 50.6. Биосинтез эстрогенов. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Gannong W. F. Review of Medical Physiology, 13th ed. Appleton and Lange, 1987.)

В каких именно клетках образуются гормоны яичников, установить трудно. Согласно современным представлениям, в этом процессе участвуют клетки двух типов: 17α-гидроксипрогестерон и андростендион (основной андроген, продуцируемый яичниками) вырабатываются главным образом в клетках теки, а эстрадиол — в клетках гранулы. Прогестерон продуцируется и секретируется желтым телом, в котором синтезируется также и некоторое количество эстрадиола.

Значительная часть эстрогенов образуется путем периферической ароматизации андрогенов. У мужчин в результате ароматизации гестостерона образуется до 80% всего эстрадиола (E₂). У женщин важным источником эстрогенов служат андрогены надпочечников: до 50% E₂, вырабатывающегося во время беременности, образуется в результате ароматизации ДГЭА-сульфата, а превращение андростендиона в эстрон служит главным источником эстрогенов в постменопаузе. Ароматазная активность обнаружена в жировых клетках, а также в печени, коже и других тканях. Повышенная активность этого фер-

мента, по-видимому, играет важную роль в «эстрогенизации», наблюдаемой при таких состояниях, как цирроз печени, гипертиреоз, старение и ожирение.

Катехол-эстрогены — основные метаболиты эстрогенов у всех млекопитающих. Они образуются в результате гидроксилирования ароматического кольца по С-2. Катехол-эстрогены обладают слабой эстрогенной активностью, но высокоактивны в центральной нервной системе, где они также обнаружены.

Секреция и транспорт

Уровень секреции образующихся в яичниках стероидов резко меняется в различные фазы менструального (или эстрального) цикла и непосредственно зависит от скорости их образования в яичниках. Эти гормоны не накапливаются; они секретируются по мере синтеза.

Эстрогены и прогестины, подобно другим стерои-

дам, связываются в различной степени с транспортными белками плазмы. Эстрогены связываются с СГСГ, а прогестины — с КСГ. Сродство СГСГ к эстрадиолу в пять раз ниже, чем к тестостерону и ДГТ; прогестерон и кортизол имеют очень низкое сродство к данному белку (табл. 50.2). В отличие от этого прогестерон и кортизол почти с равным сродством связываются с КСГ, который в свою очередь характеризуется низким сродством к эстрадиолу и еще более низким к тестостерону, ДГТ и эстрону.

Эти транспортные белки плазмы, по-видимому, не играют никакой роли в механизме действия данных гормонов на клеточном уровне. Аналогично другим стероидам биологической активностью обладает, вероятно, только свободная форма гормона. Связывающие белки обеспечивают определенный резерв гормона в крови и, обладая относительно высокой способностью к связыванию, выполняют роль буферов, противостоящих резким изменениям уровня гормона в плазме. Скорость метаболического клиренса этих гормонов находится в обратной зависимости от их сродства к СГСГ. Следовательно, клиренс эстрона выше клиренса эстрадиола, который в свою очередь выше клиренса тестостерона или ДГТ. Следует иметь в виду, что конъюгированные производные этих гормонов (см. ниже) не связываются ни с СГСГ, ни с КСГ. СГСГ несет еще одну функцию: обладая неодинаковым сродством к эстрадиолу и тестостерону (или ДГТ), он может влиять на количество этих половых гормонов, вступающих во взаимодействие с тканями-мишенями. Факторы, регулирующие образование СГСГ, рассматриваются выше.

Метаболизм и выделение

А. Эстрогены. В печени эстрадиол и эстрон в результате реакций, показанных на рис. 50.6, превращаются в эстриол. Эстрадиол, эстрон и эстриол служат субстратами печеночных ферментов, присоединяющих глюкуронидную или сульфатную группу. Активность этих конъюгирующих ферментов у разных видов различна. У грызунов активность ферментных систем метаболизма (особенно гидроксилирующих) столь высока, что эстрогены почти полностью разрушаются в печени и при пероральном введении практически не оказывают никакого действия. У приматов ферменты данной группы менее активны и, следовательно, пероральное введение эстрогенов у них более эффективно. Конъюгированные стероиды водорастворимы и не способны связываться с транспортными белками. Поэтому они легко выделяются с желчью, калом и в меньшей степени с мочой.

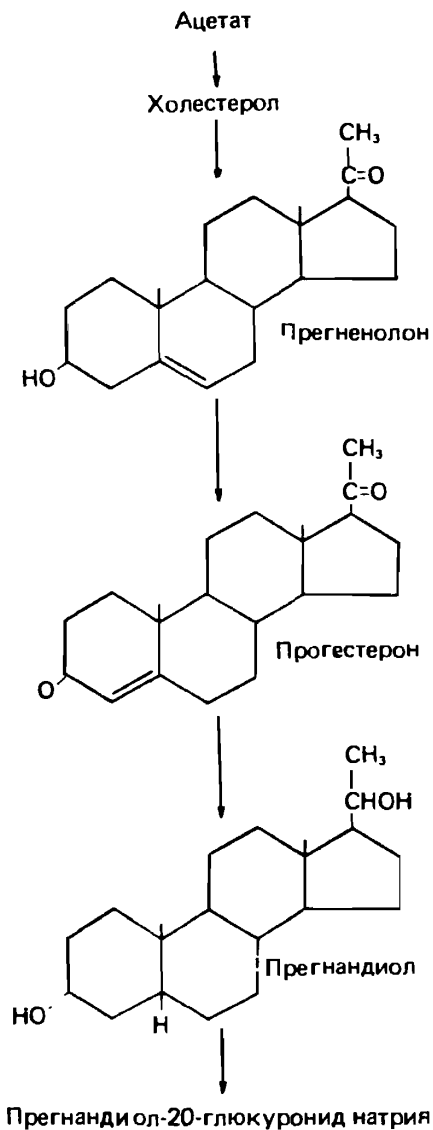


Рис. 50.7. Биосинтез прогестерона и основной путь его метаболизма. Обнаружены и другие метаболиты. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Ganong W. F. Review of Medical Physiology, 13th ed. Appleton and Lange, 1987.)

Б. Прогестины. Прогестерон при пероральном введении неэффективен, поскольку в печени он быстро метаболизируется, образуя ряд соединений. Прегнандиол-20-глюкуронид натрия — основной метаболит прогестинов, обнаруженный в моче человека (рис. 50.7). Некоторые синтетические стероиды, например 17 α -гидроксипрогестерон и 17 α -алкиламещенные соединения 19-нортестостерона, обладают активностью прогестинов и при этом не подвергаются в печени никаким превращениям. Поэтому они широко используются в качестве пероральных контрацептивов.

РЕГУЛЯЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ ЯИЧНИКОВ

Созревание и поддержание функции женской репродуктивной системы

Основная функция яичниковых гормонов — подготовка структурных компонентов женской половой системы (см. ниже) к размножению. Эта подготовка включает 1) созревание примордиальных зародышевых клеток; 2) развитие тканей, необходимых для имплантации бластоцисты; 3) обеспечение гормонального контроля времени овуляции; 4) установление с помощью плацентарных гормонов среды, необходимой для поддержания беременности и 5) обеспечение гормональной регуляции родов и лактации.

Эстрогены стимулируют развитие тканей, участвующих в размножении. Как правило, под влиянием этих гормонов повышается скорость синтеза белка, рРНК, тРНК, мРНК и ДНК, что приводит к увеличению размеров и числа клеток соответствующих тканей. Эстрогенная стимуляция обуславливает пролиферацию и дифференцировку влагалищного эпителия, пролиферацию эндометрия, а также гипертрофию с увеличением длины его желез; появление собственной ритмической подвижности миометрия; пролиферацию протоков грудных желез. Эстрадиол оказывает также анаболическое действие на кости и хрящи, способствуя таким образом росту. Воздействуя на периферические кровеносные сосуды, эстрогены обычно вызывают их расширение и усиливают теплоотдачу.

Для проявления активности прогестиннов обычно требуется предшествующее или одновременное действие эстрогенов. Таким образом, гормоны двух этих классов часто функционируют синергично, хотя могут быть и антагонистами. Прогестины уменьшают стимулирующее действие эстрогенов на пролиферацию эпителия влагалища и способствуют переходу эпителия матки из пролиферативной фазы в секреторную (увеличение размеров и функции секреторных желез и повышение содержания гликогена), подготавливая его к имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Эти гормоны усиливают развитие ацинарной части грудных желез после эстрогенной стимуляции развития протоков. Прогестины снижают периферический кровоток, уменьшая тем самым теплопотерю. В результате в лютеиновой фазе менструального цикла, на которую приходится образование данного гормона, температура тела повышается. Такие температурные скачки, составляющие обычно около $0,5^{\circ}\text{C}$, используются в качестве показателя овуляции.

Максимальное число оогониев в яичниках плода человека достигает 6—7 млн. примерно к пятому ме-

сяцу эмбрионального развития. К моменту рождения оно понижается примерно до 2 млн., а после наступления менархе составляет 100 000—200 000. Примерно 400—500 из них развиваются в зрелые ооциты. Остальные постепенно исчезают в результате какого-то пока еще не раскрытого процесса. Известно лишь, что в этом процессе участвуют яичниковые андрогены. Созревание фолликулов начинается в младенческие годы; на протяжении всего препубертатного периода яичники увеличиваются в размерах в результате увеличения объема фолликулов, обусловленного ростом клеток гранулезы, накопления ткани атрезированных фолликулов и увеличения массы медуллярной стромальной ткани с клетками интерстициальной ткани и теки, способными продуцировать стероидные гормоны.

В детстве концентрация половых гормонов низка, хотя экзогенные гонадотропины увеличивают их продукцию. Следовательно, незрелые яичники обладают способностью синтезировать эстроген. Существует предположение, что у неполовозрелых девочек имеющиеся у них в небольшом количестве половые стероиды подавляют образование гонадотропинов, а в пубертатном возрасте гипоталамогипофизарная система становится менее чувствительной к ингибирующему действию этих гормонов. В период полового созревания начинается импульсная секреция ГнРГ (гонадолиберина); под влиянием ЛГ резко повышается уровень образования яичниковых гормонов, а под влиянием ФСГ, главного стимулятора секреции эстрогенов, происходит созревание фолликулов и наступает овуляция.

Менструальный цикл

Частота овуляции и готовность к половому акту определяются гормонами. У видов с моноэстральным циклом овуляция и спаривание происходят раз в году, у видов с полиэстральным циклом овуляция повторяется несколько раз в году. У приматов, для которых характерны менструальные циклы с отторжением эндометрия в конце каждого цикла, половое поведение не имеет тесной связи с овуляцией. У человека менструальный цикл обуславливается сложным взаимодействием между гипоталамусом, гипофизом и яичниками. В норме продолжительность менструального цикла варьирует от 25 до 35 дней (в среднем 28 дней). Его можно подразделить на фолликулярную фазу, лютеиновую фазу и менструацию (рис. 50.8).

А. Фолликулярная фаза. По каким-то невыясненным причинам под влиянием ФСГ начинает увеличиваться лишь один из фолликулов. В первую неделю фолликулярной фазы содержание E_2 остается низким, но затем по мере увеличения фолликула начинает прогрессивно повышаться. За 24 ч до пика ЛГ (ФСГ) уровень E_2 достигает максимума и сенситизирует гипофиз к действию гонадолиберина (ГнРГ).

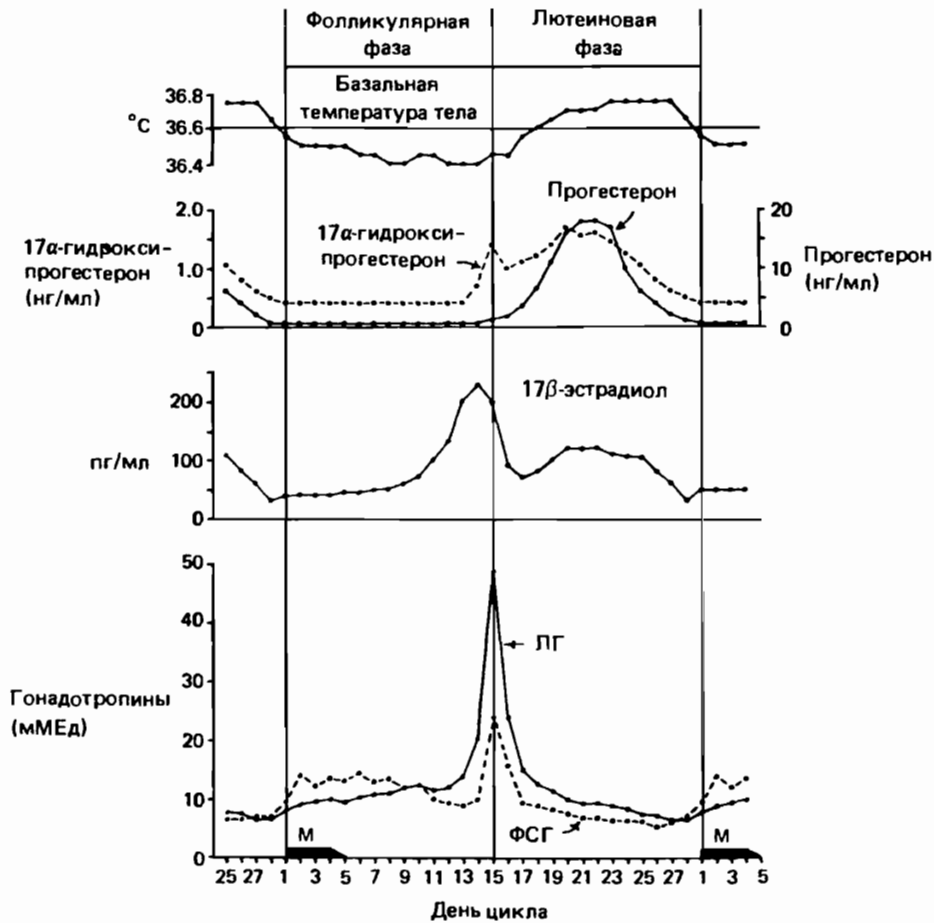


Рис. 50.8. Гормональные и физиологические изменения во время типичного менструального цикла у человека. М — менструация, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон. (Reproduced, with permission, from Midgley A. R. In: Human Reproduction, Hafez ESE, Evans TN [editors]. Harper and Row, 1973.)

Выброс ЛГ обуславливается либо этим высоким уровнем E_2 по механизму «положительной обратной связи», либо резким падением его уровня. Продолжительное введение высоких доз эстрогенов (в качестве пероральных контрацептивов) снижает как секрецию ЛГ и ФСГ, так и действие ГнРГ на гипофиз. Содержание прогестерона в фолликулярной фазе очень мало.

Б. Лютеиновая фаза. После овуляции клетки гранулезы лопнувшего фолликула лютеинизируются и образуют желтое тело — структуру, которая вскоре начинает вырабатывать прогестерон и некоторое количество эстрадиола. Уровень эстрадиола достигает максимума примерно к середине лютеиновой фазы, а затем резко снижается. **Основной гормон лютеиновой фазы цикла — прогестерон.** Он необходим для формирования секреторного эндометрия, обеспечивающего нужные условия для развития имплантировавшейся бластоцисты. На первых этапах сохранение желтого тела требует присутствия ЛГ, и гипофиз в течение примерно десяти дней выделяет этот гормон. Если имплантация произошла (22—

24-й день цикла), функцию ЛГ берет на себя хорионический гонадотропин (ХГЧ) — плацентарный гормон, очень близкий к ЛГ, вырабатываемый цитотрофобластными клетками имплантированного эмбриона на ранних стадиях развития (см. гл. 45). ХГЧ поддерживает синтез прогестерона желтым телом до тех пор, пока плацента не начнет продуцировать большие количества этого стероида. В отсутствие имплантации (и ХГЧ) желтое тело деградирует и наступает менструация. После отторжения эндометрия начинается новый цикл. Лютеиновая фаза всегда длится 14 ± 2 дней. Колебания продолжительности цикла почти во всех случаях обусловлены различиями в фолликулярной фазе.

Беременность и плацентарные гормоны

Имплантированная бластоциста образует трофобласт, который впоследствии организуется в плаценту. Именно плацента обеспечивает связь между системами кровообращения зародыша и матери и вырабатывает ряд гормонов.

А. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Главная функция этого гликопротеинового гормона состоит в том, чтобы поддерживать существование желтого тела до тех пор, пока плацента не начнет продуцировать прогестерон в количествах, достаточных для нормального течения беременности. ХГЧ обнаруживается уже через несколько дней после имплантации, что используется для ранней диагностики беременности. Содержание этого гормона достигает максимума к середине первого триместра, постепенно снижаясь на протяжении остальной беременности. Уровень ХГЧ и других гормонов при беременности показан на рис. 50.9.

Б. Прогестины. В первые 6—8 нед беременности главным источником прогестерона служит желтое тело, затем эту функцию берет на себя плацента. Желтое тело при этом продолжает функционировать, однако на поздних стадиях беременности плацента вырабатывает в 30–40 раз больше прогестерона, чем желтое тело. Поскольку плацента не способна синтезировать холестерин, она должна получать его из материнского организма.

В. Эстрогены. При беременности концентрация эстрадиола, эстрона и эстриола в плазме постепенно повышается. В наибольшем количестве образуется эстриол; его образование отражает ряд фетоплацентарных функций. Надпочечники плода продуцируют дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и ДГЭА-сульфат, превращающиеся в печени плода в 16 α -гидроксипроизводные, которые в свою очередь преобразуются в плаценте в эстриол. Образующийся эстриол поступает с кровью в печень матери, где конъюгирует с глюкуропидами и в таком виде выделяется с мочой (рис. 50.10). Содержание в моче эстриола используется в качестве показателя для оценки течения ряда процессов у плода и матери.

Не менее интересен обмен субстратами, необходимыми для образования у плода кортизола и ДГЭА. Из-за отсутствия в эмбриональных надпочечниках комплекса 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназы/ $\Delta^5,4$ -изомеразы синтез кортизола у плода осуществляется за счет плацентарного прогестерона. Прегненолон, необходимый для синтеза дегидроэпиандростерона, также поступает из плаценты (рис. 50.10).

Г. Плацентарные лактогены. Плацента вырабатывает плацентарный лактоген (ПЛ) — гормон, называемый также хорионическим соматоматотропином или плацентарным гормоном роста, так как он обладает биологическими свойствами пролактина и гормона роста. Генетическая взаимосвязь этих гормонов рассматривается в гл. 45. Физиологическая роль плацентарного лактогена точно не установлена, поскольку у женщин, лишенных этого гормона, беременность протекает нормально и рождаются здоровые дети.

Роды

Беременность продолжается строго определенное число дней, специфичное для каждого вида. Однако фактор, отвечающий за окончание беременности, не установлен. Предполагают, что важную роль в этом играют гормоны, возможно эстрогены и прогестины, поскольку они влияют на сокращение матки. Имеются данные и об участии катехоламинов в индукции родов. Окситоцин стимулирует сокращение матки, и в клинике его используют для облегчения родов. Однако этот гормон не инициирует роды до окончания беременности. Содержание окситоциновых рецепторов в матке к концу беременности резко увеличивается, превышая в 100 раз их содержание в начале беременности. Это увеличение коррелирует с увеличением к концу беременности количества эстрогенов, под влиянием которых повышается количество окситоциновых рецепторов (гл. 45). При наступлении родов шейка матки растягивается, вызывая рефлекторную стимуляцию высвобождения

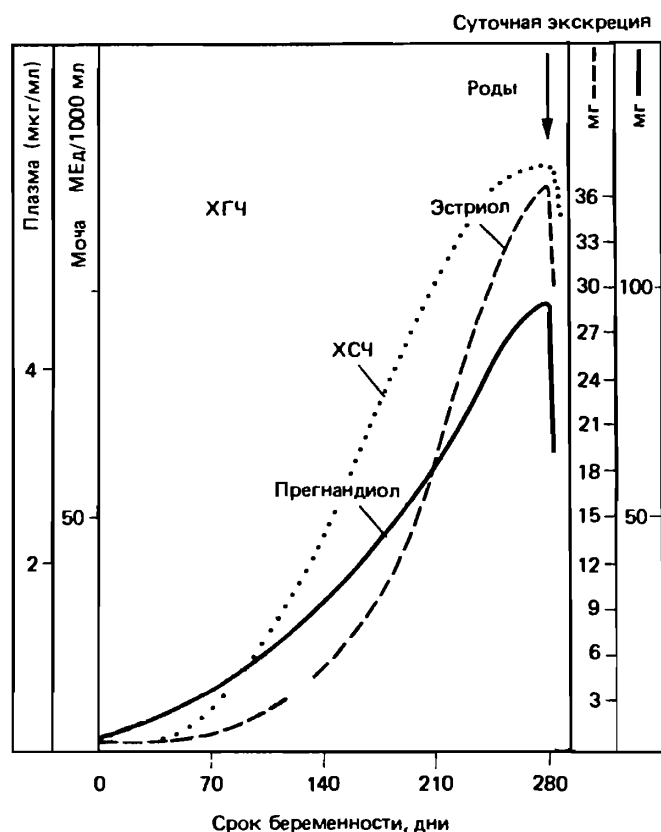


Рис. 50.9. Содержание гормонов во время нормальной беременности. ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ХСЧ — хорионический соматотропин человека (использованы данные различных авторов). (Reproduced, with permission, from Ganong W.F. Review of Medical Physiology, 13th ed. Appleton and Lange, 1987.)

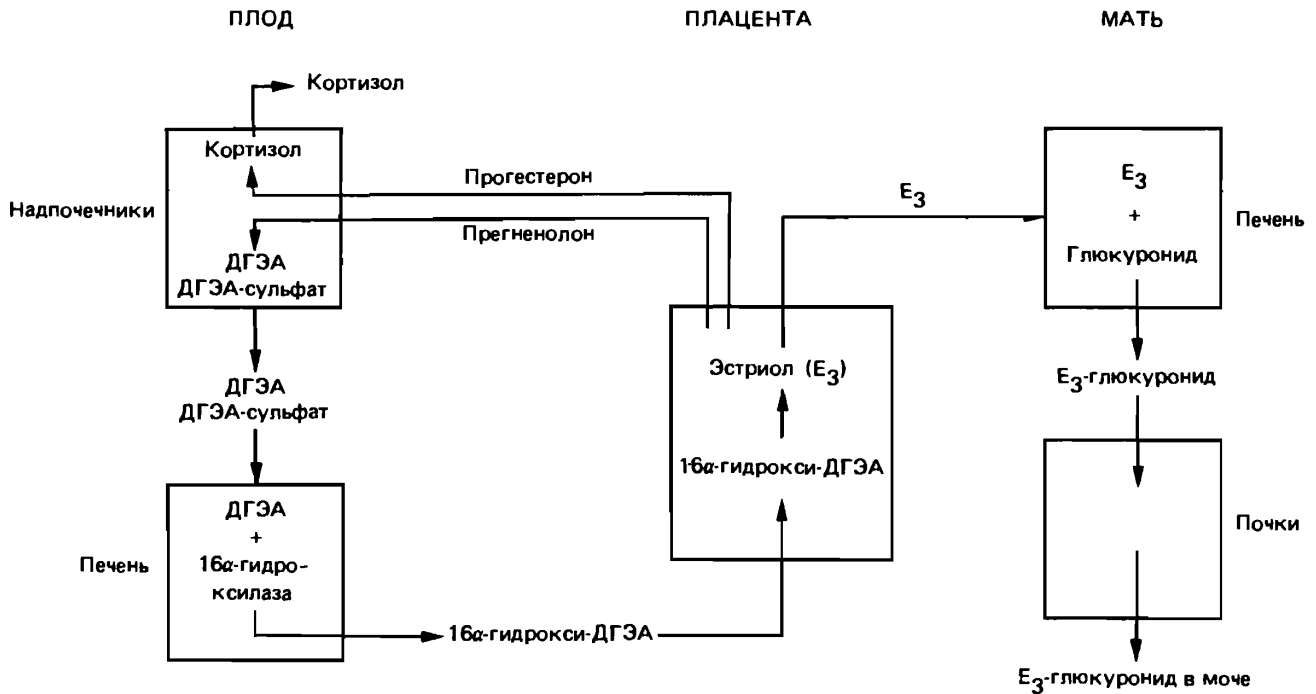


Рис. 50.10. Метаболизм стероидов в системе мать — плод. ДГЭА — дегидроэпиандростерон.

окситоцина, а следовательно, и дальнейшее сокращение матки. Важную роль в этом процессе могут играть механические факторы, такие, как растяжение или давление на мышцу. При родах у матери и новорожденного резко изменяется гормональная среда, и после отторжения плаценты содержание в плазме прогестерона (определяемого в виде прегнандиола) и эстриола быстро уменьшается (рис. 50.9).

Развитие молочной железы и лактация

Дифференцировка и функция молочной железы регулируются согласованным действием нескольких гормонов. Иницируют этот процесс женские половые гормоны: эстрогены отвечают за рост протоков, а прогестины стимулируют пролиферацию альвеол. Некоторое разрастание железистой ткани, сопровождающееся отложением жировой ткани, происходит при половом созревании, однако наибольшего развития железа достигает при беременности, когда железистая ткань подвергается воздействию высоких концентраций эстрадиола и прогестерона. Как показали исследования, проведенные главным образом на эксплантатах молочных желез крысы, для полной дифференцировки требуется также действие пролактина, глюкокортикоидов, инсулина или фактора роста и какого-то неидентифицированного фактора сыворотки. Из этих гормонов только концентрация пролактина претерпевает при беременности резкие изменения: на поздних сроках беременности она увеличивается от менее 2 нг% до более 200 нг%. Под-

робно изучено влияние гормонов на синтез различных белков молока, включая лактальбумин, лактоглобулин и казеин. Эти гормоны повышают скорость синтеза перечисленных белков путем увеличения количества специфических мРНК, что, по крайней мере в случае казеина, обусловлено усилением транскрипции гена. Заслуживает внимания тот факт, что усиление транскрипции гена наблюдалось лишь в том случае, если к культуре эксплантата добавляли одновременно кортизол, пролактин и инсулин.

На поздних стадиях беременности образование и секреция молока подавляются под действием прогестерона, необходимого для дифференцировки альвеол. Лактация начинается только после окончания родов, когда содержание этого гормона резко уменьшается. Содержание пролактина после родов также быстро уменьшается, но возрастает при каждом акте кормления (гл. 45), поддерживая таким образом непрерывную лактацию. Если ребенка по каким-либо причинам перестают прикладывать к груди, лактация постепенно прекращается. Парентеральным введением больших доз андрогенов до начала вскармливания можно вызвать быстрое прекращение лактации.

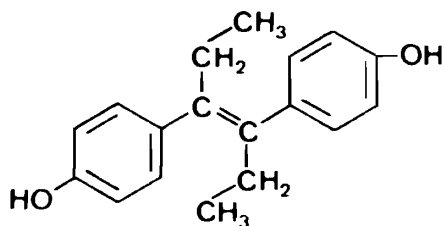
Кормление грудью индуцирует также секрецию окситоцина задней долей гипофиза. Окситоцин стимулирует сокращение миоэпителиальных клеток, окружающих альвеолярные протоки, способствуя таким образом выбросу молока из железы. Механизм регуляции синтеза и секреции окситоцина рассматривается в гл. 45.

Менопауза

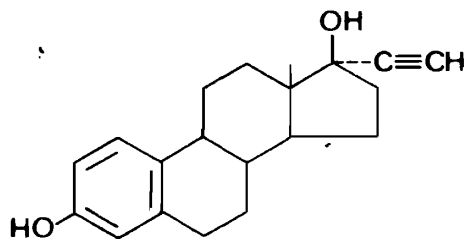
У женщин западного полушария в возрасте примерно 53 лет менструальные циклы становятся все более нерегулярными; одновременно из яичников исчезают фолликулы и прекращается их функция. Других источников прогестерона в организме нет, но в результате ароматизации надпочечникового стероида андростендиона образуются значительные количества эстрона, обладающего слабой эстрогенной активностью (рис. 50.6). Количество образующегося эстрона не столь велико, чтобы снизить содержание гипофизарных гонадотропинов, и для постменопаузального периода характерно резкое повышение уровней ЛГ и ФСГ. У женщин в постменопаузе особенно часто возникают две проблемы, связанные с тканевым метаболизмом. Первая из них состоит в том, что эстрон не всегда способен предотвратить **атрофию вторичных половых тканей**, особенно эпителия нижнего отдела мочеполового тракта и влагалища. Вторая проблема, с которой сталкиваются пожилые женщины, — это **остеопороз**. У женщин с особенно сильным уменьшением костной массы содержание эстрона оказывается ниже нормы.

Синтетические агонисты и антагонисты

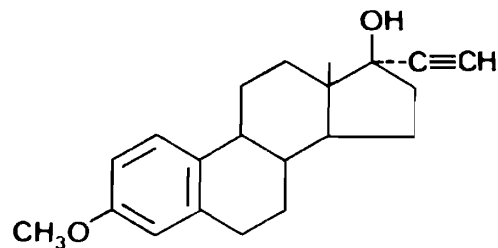
А. Эстрогены. Некоторые синтетические соединения обладают эстрогенной активностью и при этом имеют фармакологические преимущества. Большинство модификаций направлено на ослабление метаболизма в печени, чтобы препараты можно было принимать перорально. Одним из первых синте-



Диэтилстильбестрол



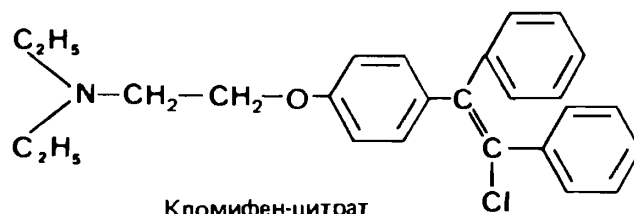
17α-этинилэстрадиол



Местранол

тических эстрогенов был диэтилстильбестрол. В качестве примеров модифицированных стероидов можно привести также 17α-этинилэстрадиол и местранол, используемые в качестве пероральных контрацептивов.

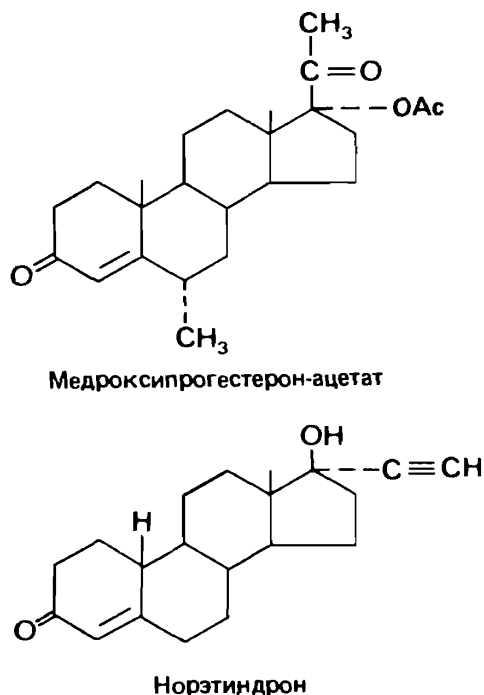
Синтезированы также многочисленные соединения с антиэстрогенной активностью. Некоторые из них нашли клиническое применение. Большинство таких антагонистов действуют, конкурируя с эстрадиолом за его внутриклеточные рецепторы (см. ниже). Кломифен-цитрат (кломид) отличается особенно высоким сродством к рецепторам эстрогенов в гипоталамусе. Кломифен вначале предполагали использовать как противозачаточное средство, но оказалось, что он обладает противоположным действием. Поскольку кломифен конкурирует с эстрадиолом за гипоталамические рецепторы, выделение гонадолиберина перестает ограничиваться и высвобождаются большие количества ЛГ и ФСГ. Под действием кломифена часто наблюдается одновременное созревание многих фолликулов, что может приводить к многоплодной беременности. Нафоксидин (нестероидное соединение) и тамоксифен взаимодействуют с рецепторами эстрогенов, образуя с хроматином очень стабильный комплекс. Поскольку связанные таким образом рецепторы не могут вступать в новый цикл, эти соединения надолго ингибируют действие эстрадиола. Такие антагонисты используют для лечения эстроген-зависимого рака молочной железы.



Кломифен-цитрат

Б. Прогестины. Синтез соединений, которые, обладая прогестиновой активностью, не оказывали бы при этом эстрогенного или андрогенного действия, оказался делом нелегким. 17α-Алкилзамещенные 19-нортестостерона (например, норэтиндрон) характеризуются минимальной андрогенной активностью у большинства женщин и используются в качестве пероральных контрацеп-

тивов. Другой активный прогестин—медрокси-прогестерон-ацетат. Внутримышечное введение медроксипрогестерона пролонгированного действия приводит к подавлению овуляции на несколько месяцев. Однако гораздо чаще этот препарат используется для лечения дифференцированного рака эндометрия. Считают, что он блокирует деление нормальных и злокачественных клеток эндометрия путем образования стабильных комплексов с рецепторами прогестерона (что препятствует действию природного гормона).



МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ ЯИЧНИКОВ

Основные эффекты эстрогенов и прогестинов 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. Большинство данных по этому вопросу было получено при изучении механизма, с помощью которого эстрадиол и прогестерон стимулируют транскрипцию генов яичного белка птиц (в частности, генов овальбумина и кональбумина). Точный механизм гормональной активации транскрипции генов интенсивно изучается.

Рецепторы эстрогенов

Аминокислотная последовательность рецепторных белков, связывающих эстрогены, у человека и кур была установлена путем анализа нуклеотидной

последовательности полных молекул кДНК. В каждой из этих молекул были обнаружены три высококонсервативные области; вторая и третья из них соответствовали ДНК- и гормон-связывающим доменам рецепторов. Гормон-связывающий домен обладает сильными гидрофобными свойствами, ДНК-связывающий домен богат остатками цистеина и основных аминокислот. Эти два домена эстрогеновых рецепторов сохраняются в рецепторах глюкокортикоидов, прогестерона и кальцитриола, а также в продукте гена *v-erb-A*. Все ДНК-связывающие белки могут кодироваться общим геном-предшественником.

Некоторые особенности

Следует обратить внимание на следующие особенности, которые могут иметь отношение к механизму действия других гормонов: 1) рецепторы половых гормонов способны к перекрестному связыванию. Прогестерон, например, связывается с рецепторами андрогенов и, следовательно, является слабым андрогеном. Некоторые андрогены связываются с рецепторами эстрогенов и имитируют действие последних в матке; 2) под действием эстрогенов повышается концентрация как эстрогеновых, так и прогестероновых рецепторов; 3) прогестерон, по-видимому, увеличивает скорость кругооборота своих рецепторов; 4) так называемые слабые эстрогены, например эстриол, при частом введении ведут себя как сильные эстрогены.

Действие половых гормонов, независимое от рецепторов

Во всех ли случаях действие стероидных гормонов опосредовано рецепторами? Этот вопрос дебатировался с давних пор. Данные, полученные в последнее время, дают основание полагать, что некоторые эффекты могут не зависеть от рецепторов и, вероятно, не опосредуются ядерными процессами.

А. Эстрогены. Эстрогены могут действовать независимо от своих рецепторов. Относительная стимуляция кровотока в матке под влиянием разных эстрогенов не коррелирует с их способностью связываться с рецепторами; этот эффект не требует и синтеза РНК. Возможно, в данном случае мы имеем дело с прямым влиянием гормона на высвобождение гистамина и образование простагландинов. Хотя это доказано и не столь четко, как мембранный эффект прогестерона, прямое влияние может быть важным компонентом физиологического действия эстрогенов.

Б. Прогестины. Взаимодействие прогестерона с мембраной ооцитов земноводных приводит к зависимости от гормона и времени повышению внутриклеточной концентрации кальция, что в свою очередь стимулирует синтез специфических цитоплазм-

матических белков, участвующих, по-видимому, в созревании ооцитов; при переносе этих белков в другие незрелые ооциты они стимулируют созревание. Данный эффект наблюдается и в ооцитах с удаленным ядром (следовательно, транскрипция гена в этом не участвует). При введении же прогестерона непосредственно в яйцо эффекта не наблюдается. Вероятно, этот пример не единственный.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Описание всех нарушений женской репродуктивной системы не входит в задачу данной главы, мы рассмотрим лишь несколько примеров. **Первичный гипогонадизм** обусловлен процессами, которые непосредственно поражают яичники и тем самым приводят к их недостаточности (ослабленная овуляция, понижение образования гормона или и то и другое вместе). В основе **вторичного гипогонадизма** лежит выпадение гонадотропной функции гипофиза. **Дисгенезия гонад (синдром Тернера)** — относительно распространенное наследственное заболевание, характеризующееся кариотипом XO, наличием женских внутренних и наружных половых органов, некоторыми аномалиями развития и задержкой полового созревания.

Ряд синдромов связан с изменением количества гормонов. Наиболее распространенный из них — **синдром поликистозных яичников (синдром Штейна — Левенталя)**, при котором гиперпродукция андрогенов приводит к гирсутизму, ожирению, нерегулярности менструаций и понижению фертильности. Редкие опухоли из клеток Лейдига и арренобластомы вырабатывают тестостерон; опухоли из клеток гранулезы и теки продуцируют эстрогены, а интраовариальные остатки надпочечниковой ткани образуют кортизол. Остаточная трофобластная ткань может обуславливать доброкачественный **пузырный занос** или при его злокачественном перерождении — хориокарциному; в обоих случаях продуцируются огромные количества ХГЧ. Для диагностики этих опасных заболеваний, а также для контроля эффективности проводимой терапии используют радиоиммунологическое определение ХГЧ.

ГОРМОНЫ ПОЛОВЫХ ЖЕЛЕЗ И ПОЛОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Половая дифференцировка включает в себя ряд последовательных процессов, которые можно представить в виде схемы: хромосомный пол → гонадный пол → фенотипический пол.

Анализ событий, вовлеченных в фенотипическое

становление пола, свидетельствует о важной роли гормонов в процессах половой дифференцировки.

ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛ

Хромосомный пол, первая фаза половой дифференцировки, устанавливается уже при оплодотворении. Это единственный неизменный параметр приведенной выше цепочки. У человека набор половых хромосом XY детерминирует мужской пол, а сочетание двух X-хромосом (генотип XX) предопределяет женский пол. При отсутствии четких половых особенностей наружных гениталий или при подозрении на расхождение фенотипического и генотипического пола производят анализ клеток слизистой рта, фибробластов или лейкоцитов на присутствие телец Барра. Тельца Барра представляют собой участки конденсированного хроматина, соответствующего инактивированной X-хромосоме. Число телец Барра в клетке на единицу меньше числа X-хромосом в ней: при генотипе XY оно равно 0, при XX — 1, при XXY — 1, при XXX — 2. Каких-либо данных о способности гормонов влиять на хромосомное определение пола не имеется.

ГОНАДНЫЙ ПОЛ

На первых стадиях беременности мужские и женские эмбрионы не различаются. У человека зародышевые клетки начинают мигрировать от желточного мешка к половым складкам между 35- и 50-м днями беременности. Этот процесс заканчивается образованием **первичной гонады**. Первичные гонады не имеют еще половых различий и состоят из первичных зародышевых клеток, соединительной или интерстициальной ткани и покрывающего эпителиального слоя. Примерно к 56-му дню в процесс включаются гормоны и начинается дифференцировка гонад. Точный механизм запуска дифференцировки не ясен, но один факт сомнений не вызывает. **При отсутствии положительной динамики, т.е. дифференцировки первичной гонады в семенник, все эмбрионы развиваются в фенотипических женщин.** Дифференцировка первичной гонады в семенник связана со специфическим мужским антигеном клеточной поверхности, так называемым H-Y-антигеном (рис. 50.11).

Если генетический пол оказывается мужским, в соединительной ткани появляются клетки Лейдига, начинается синтез тестостерона и развитие мужского полового тракта. **В отсутствие эффекта Y-хромосомы развивается женская половая система.** Развитие женских половых органов происходит с небольшой задержкой во времени и практически завершается к 90-му дню беременности. Эта последовательность событий, при которой структурное и функциональное развитие семенников предшествует развитию мужского фенотипа, а развитие яичников

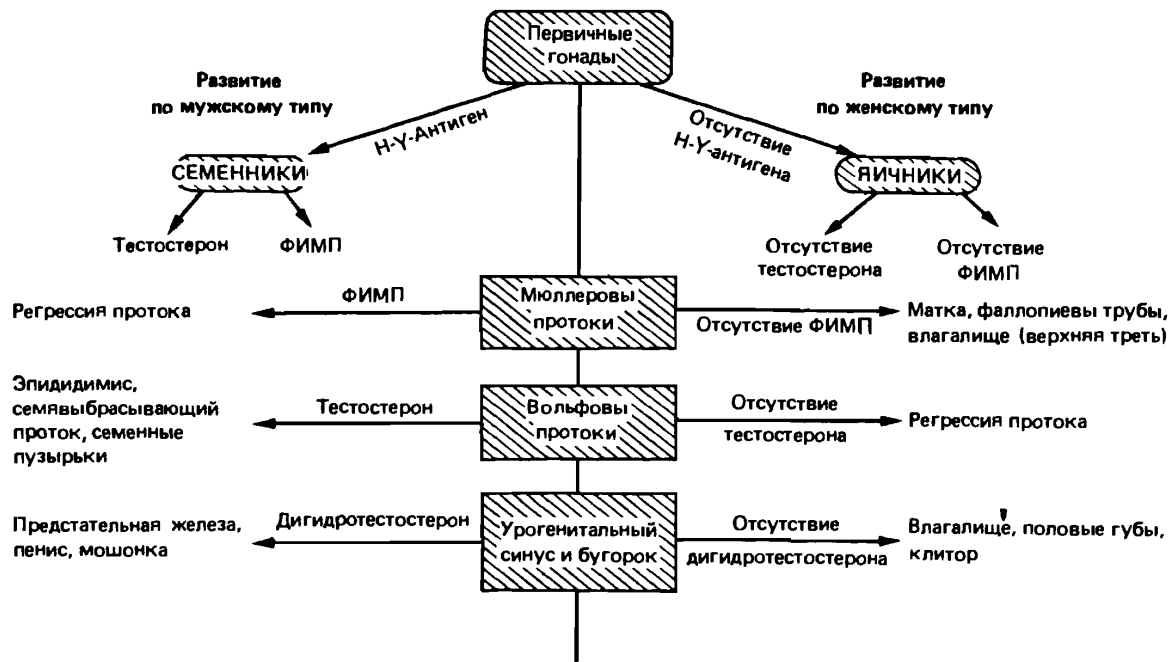


Рис. 50.11. Роль гормонов в половой дифференцировке. ФИМП — фактор, ингибирующий мюллеровы протоки (Modified and reproduced, with permission, from Fox Sl. Page 631. In: Human Physiology, William C. Brown, 1984.)

и становление женского фенотипа происходят лишь в отсутствие дифференцировки в семенники, характерна для всех млекопитающих. Схематически она показана на рис. 50.11. Впервые эта схема была построена на основе данных, полученных на кроликах, но в дальнейшем была доказана возможность их экстраполяции на человека и другие виды.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПОЛ

Внутренние половые структуры

Мужские половые гормоны непосредственно участвуют в дифференцировке **системы первичных половых протоков** (вольфовых и мюллеровых) и зачатка наружных половых органов. Мужские внутренние половые органы развиваются из системы первичных **вольфовых протоков**, женские — из системы **мюллеровых протоков** (рис. 50.11).

Будут ли у зародыша развиваться вольфовы или мюллеровы протоки, зависит от образования особого тестикулярного фактора, получившего название **фактора ингибирования мюллеровых протоков** (ФИМП). Этот фактор представляет собой гликопротеин с мол. массой 70 000. Он образуется в сперматогенных канальцах и отражает первую эндокринную функцию семенников. Механизм, с помощью которого ФИМП подавляет развитие мюллерового протока, не ясен, но очевидно, что это активный процесс, не связанный с последующим действием тестостерона.

Наружные половые органы

Тип наружных половых органов, развивающихся из общей закладки, определяется присутствием или отсутствием другого тестикулярного гормона — тестостерона и его производного, дигидротестостерона (ДГТ).

Синтез тестостерона — процесс, непосредственно предшествующий маскулинизации плода. У мужских эмбрионов кролика синтез тестостерона начинается в возрасте 17—17,5 дней; он ассоциируется с резким повышением уровня фермента, отщепляющего боковую цепь холестерина, а также ферментного комплекса 3β -гидроксистероид-дегидрогеназа/ $\Delta^{5,4}$ -изомераза (ключевых ферментов биосинтеза тестостерона). Другие ферменты стероидогенеза всегда имеются в первичных гонадах. Синтез эстрогенов в яичниках начинается в то же самое время, что и синтез тестостерона. Такое совпадение, по-видимому, свидетельствует о том, что дифференцировка по женскому типу — не совсем пассивный процесс, поскольку синтез эстрогенов незрелыми гонадами мог бы играть роль в стимуляции деления первичных зародышевых клеток или их дифференцировки в оогонии. Сигнал, включающий стероидогенез, не установлен. Не известно также, регулируется ли этот процесс на ранних стадиях другими гормонами. На более поздних стадиях эмбриогенеза, как и в постнатальной жизни, стероидогенез регулируется ЛГ, который влияет на скорость отщепления боковой цепи холестерина.

До открытия ДГТ считалось, что развитие муж-

ского полового тракта зависит лишь от тестостерона. Тот факт, что для этого процесса требуется еще и ДГТ, был установлен в опытах с эмбриональными тканями. Удалось показать, что непосредственно перед началом маскулинизации активность 5 α -редуктазы в закладке предстательной железы и наружных половых органов наиболее высока, тогда как в вольфовых протоках в это время данный фермент определить не удастся. Эти результаты нашли подтверждение в генетических исследованиях, выявивших наличие людей, лишенных 5 α -редуктазной активности. Такие индивиды, будучи генетическими мужчинами с нормальными вольфовыми структурами, имеют женский фенотип, за одним лишь исключением: влагалище у них развито не полностью.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Huggins C. Two principles in endocrine therapy of cancer. Hormone deprivation and hormone interference, *Cancer Res.*, 1965, **25**, 1163.
- Ohno S., Geller L. N., Lai E. V. Y. Tfm mutation and masculinization versus feminization on the mouse central nervous system, *Cell*, 1974, **3**, 235.
- O'Malley B. W. Steroid hormone action in eukaryotic cells, *J. Clin. Invest.*, 1984, **74**, 307.

Гормоны семенников

- Hall P. F. Gonadotropic regulation of testicular function, Pages 1511—1519. In: *The Androgens of the Testis*, Eiknes K. B. (ed.), Dekker, 1970.
- Hall P. F. Testicular hormones: Synthesis and control, Pages 1511—1520. In: *Endocrinology*, Vol. 3, DeGroot L. J. (ed), Grune and Stratton, 1979.
- Longcope C., Kato T., Horton R. Conversion of blood androgens to estrogen in normal men and women, *J. Clin. Invest.*, 1969, **48**, 2191.
- Mainwaring W. I. P. *The Mechanism of Action of Androgens*, Springer, 1977.

Samuels L. T., Matsumoto K. Localization of enzymes involved in testosterone biosynthesis by the mouse testis, *Endocrinology*, 1974, **94**, 55.

Wilson J. Metabolism of testicular androgens, Chap. 25, pp. 491-508. In: *Handbook of Endocrinology*, Section 7; *Endocrinology*, Vol. 5: Male Reproductive System. Hamilton D. W., Greep R. O. (ed.). American Physiological Society, Washington DC, 1975.

Гормоны яичников

- Channing C. P., Coudert S. P. The role of granulosa cells and follicular fluid in estrogen secretion by the monkey ovary in vivo, *Endocrinology*, 1976, **98**, 590.
- Channing C. P., Tsafirri A. Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the ovary in vitro, *Metabolism*, 1977, **26**, 413.
- Green S. et al. Human estrogen receptor DNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A, *Nature*, 1986, **320**, 134.
- Jensen E. V., Jacobson H. I. Basic guides to the mechanism of estrogen action, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1962, **18**, 387.
- Siiteri P. K., Febres F. Ovarian hormone synthesis, circulation and mechanisms of action, Pages 1401-1417. In: *Endocrinology*, Vol. 3, DeGroot L. J. (ed.), Grune and Stratton, 1979.
- Toft D., Gorski J. A receptor molecule for estrogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, **55**, 1574.

Половая дифференцировка

- Bullock L. P., Barden C. W., Ohno S. The androgen insensitive mouse: Absence of intranuclear androgen retention in the kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, **44**, 1537.
- Jost A. et al. Studies in sex differentiation in mammals, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1973, **29**, 1.
- Ohno S. Major regulatory genes for mammalian sexual development, *Cell*, 1976, **7**, 315.
- Ohno S. The role of H-Y antigen in primary sex determination, *JAMA*, 1978, **239**, 217.
- Wilson J. D., Walker J. D. The conversion of testosterone to 5 α -androstene-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man, *J. Clin. Invest.*, 1969, **48**, 371.
- Wilson J. D. et al. The endocrine control of male phenotypic development, *Aust. J. Biol. Sci.*, 1983, **36**, 101.

Гормоны поджелудочной железы

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Поджелудочная железа, по сути дела, представляет собой два разных органа, объединенных в единую морфологическую структуру. Ее ацинарная часть выполняет экзокринную функцию, секретируя в просвет двенадцатиперстной кишки ферменты и ионы, необходимые для процессов пищеварения. Эндокринная часть железы состоит из 1-2 млн. островков Лангерганса, на долю которых приходится 1—2% всей массы поджелудочной железы. Островки состоят из клеток разных типов (табл. 51.1).

Островковый аппарат поджелудочной железы секретирует по крайней мере четыре гормона: инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид. Эти гормоны высвобождаются в панкреатическую вену, впадающую в воротную вену, что имеет очень важное значение, поскольку для инсулина и глюкагона печень служит главной мишенью. Основная роль этих двух гормонов сводится к регуляции углеводного обмена, однако они оказывают влияние и на многие другие процессы. Соматостатин впервые идентифицирован в гипоталамусе как гормон, подавляющий секрецию гормона роста. Однако в поджелудочной железе его концентрация выше, чем в гипоталамусе. Этот гормон участвует в локальной регуляции секреции инсулина и глюкагона. Панкреатический полипептид влияет на желудочно-кишечную секрецию.

Таблица 51.1. Типы клеток в островках Лангерганса

Тип клетки	Относительное содержание, %	Образующийся гормон
A (или α)	~ 25	Глюкагон
B (или β)	~ 70	Инсулин
D (или δ)	< 5	Соматостатин
F	Следовые количества	Панкреатический полипептид

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Инсулин во многих отношениях может служить моделью пептидных гормонов. Он первым из гормонов этой группы был получен в очищенном виде, кристаллизован и синтезирован химическим путем и методами генной инженерии. Исследование путей его биосинтеза привело к созданию концепции пропептидов. Инсулин имеет важное значение как медикаментозное средство, поскольку пять процентов населения развитых стран страдают сахарным диабетом и примерно столько же людей предрасположены к этой болезни. В основе сахарного диабета лежит недостаточность инсулина, связанная либо с его отсутствием, либо с устойчивостью к его эффектам. Глюкагон, действие которого в этой ситуации ничто не препятствует, усиливает проявление болезни.

ИНСУЛИН

История вопроса

Островки в поджелудочной железе были обнаружены в 1860 г. Лангерганс, которому принадлежит это открытие, не представлял себе, какова их функция; не знали этого ни Мering, ни Минковский, установившие в 1889 г., что удаление поджелудочной железы приводит к сахарному диабету. Предположение о наличии тесной связи между островками и диабетом высказали де Мейер в 1909 г. и Шарпей-Шаффер в 1917 г., но только в 1921 г. Бантинг и Бест доказали это. Экстрагировав подкисленным этанолом ткань поджелудочной железы, они выделили некий фактор, обладающий мощным гипогликемизирующим действием. Этот фактор был назван инсулином. Вскоре было установлено, что инсулин, содержащийся в островках поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней, активен и у человека. Не прошло и года, как этот препарат стал широко и успешно применяться для лечения диабета.

Бычий и свиной инсулин можно легко получать в больших количествах, что является важнейшим условием для успешного биохимического исследования. Именно инсулин оказался первым белком с доказанной гормональной активностью, первым белком, полученным в кристаллическом виде (Abel, 1926), первым белком, у которого была установлена аминокислотная последовательность (Sanger et al., 1955), первым белком, синтезированным химическими методами (Du et al.; Zahn; Katsoyanis, 1964). Именно для инсулина впервые было показано, что молекула может синтезироваться в виде более крупного предшественника (Steiner et al., 1967). Кроме того, инсулин оказался первым белком, полученным для коммерческих целей с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Но, несмотря на эти впечатляющие «первенства», механизм действия инсулина на молекулярном уровне изучен хуже, чем для большинства других гормонов.

Химические свойства

Молекула инсулина — полипептид, состоящий из двух цепей, А и В, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками, соединяющими остаток А7 с остатком В7 и остаток А20 с остатком В19. Третий дисульфидный мостик связывает между собой остатки 6 и 11 А-цепи. Локализация всех трех дисульфидных мостиков постоянна, а А- и В-цепи у представителей большинства видов имеют по 21 и 30 аминокислот соответственно. Ковалентная структура человеческого инсулина (мол. масса 5734) показана на рис. 51.1, сведения об аминокислотных заменах в инсулинах различных видов содержатся в табл. 51.2. В обеих цепях во многих положениях встречаются замены, не оказывающие влияния на биологическую активность гормона, однако наиболее часты замены по положениям 8, 9 и 10 А-цепи. Из этого следует, что данный участок молекулы не имеет критического значения для биологической активности инсулина. Однако некоторые участки и области молекулы инсулина обладают высокой консервативностью.

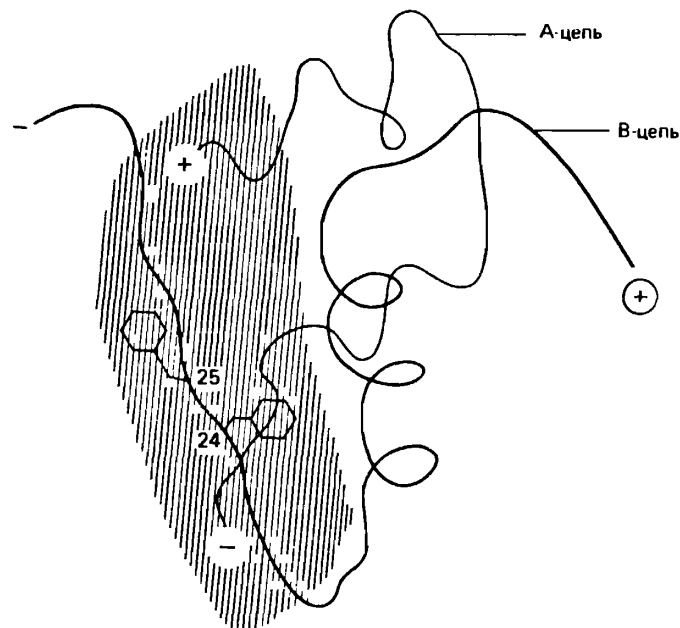


Рис. 51.2. Участок молекулы инсулина, отвечающий за его биологическую активность. Данная схема молекулы инсулина построена по результатам рентгеноструктурной кристаллографии. Заштрихованная область соответствует той части инсулина, которой отводят главную роль в реализации биологической активности гормона. Остатки Phe в положениях В24 и В25 — это те сайты, мутации в которых влияют на биологическую активность инсулина. N-концы А- и В-цепей инсулина показаны знаком «+», тогда как С-концы — знаком «-». (Redrawn and reproduced, with permission, from Tager H. S. Abnormal products of the human insulin gene, *Diabetes*, 1984, 33, 693.)

К ним относятся 1) положения трех дисульфидных мостиков, 2) гидрофобные остатки в С-концевом участке В-цепи и 3) С- и N-концевые участки А-цепи. Использование химических модификаций и замен отдельных аминокислот шести этих участков помогли идентифицировать сложный активный центр (рис. 51.2). Расположенный на С-конце В-цепи гидрофобный участок участвует также в димеризации инсулина.

Как явствует из табл. 51.2, между инсулином чело-

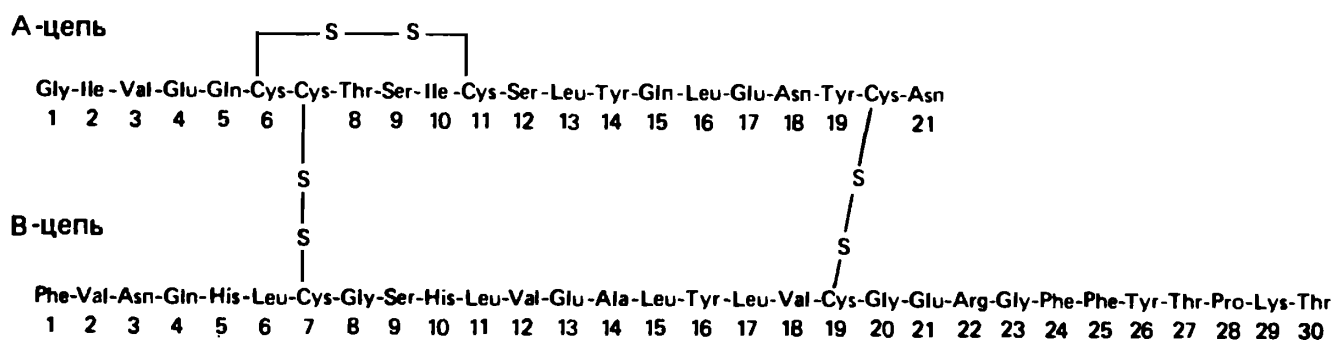


Рис. 51.1. Ковалентная структура инсулина человека. (Reproduced, with permission, from Ganong W. F. *Review of Medical Physiology*, 13th ed., Appleton and Lange, 1987.)

Таблица 51.2. Различия в структуре инсулина у представителей разных видов млекопитающих. (Modified and reproduced, with permission, from Banong W. F.: Review of Medical Physiology. 13th ed., Appleton and Lange, 1987.)

Вид	Аминокислотные замены относительно инсулина человека		
	Положение в А-цепи		
	8	9	10
Человек	Thr-	Ser-	Ile
Свинья, собака, каналот	Thr-	Ser-	Ile
Кролик	Thr-	Ser-	Ile
Крупный рогатый скот, коза	Ala-	Ser-	Val
Овца	Ala-	Gly-	Val
Лошадь	Thr-	Gly-	Ile
Сейвал	Ala-	Ser-	Thr

века, свиньи и быка существует большое сходство. Инсулин свиньи отличается от человеческого инсулина одной-единственной аминокислотной заменой: вместо треонина в положении 30 В-цепи находится аланин. В бычьем инсулине помимо этого треонин А8 заменен на аланин, а изолейцин А10 — на валин. Эти замены практически не влияют на биологическую активность гормона и очень слабо влияют на его антигенные свойства. Хотя у большинства больных, получавших гетерологичный инсулин, обнаруживаются циркулирующие в небольшом титре антитела против введенного гормона, некоторые пациенты демонстрируют титр антител клинически значимой величины. До тех пор пока человеческий инсулин не научились получать с помощью методов генной инженерии, для терапевтических целей использовали обычно бычий и свиной инсулины. Несмотря на значительные различия в первичной структуре, все три инсулина имеют сходную биологическую активность (25—30 МЕд/мг сухого веса).

Инсулин образует очень интересные сложные структуры. Цинк, концентрация которого в В-клетках достигает высоких значений, формирует комплексы с инсулином и проинсулином. Инсулины всех позвоночных образуют изологичные димеры с помощью водородных связей между пептидными группами остатков В24 и В26 двух мономеров, которые при высоких концентрациях в свою очередь реорганизуются в гексамеры, содержащие по два атома цинка каждый. Наличие такой высоко упорядоченной структуры облегчило изучение кристаллической структуры инсулина. При физиологических концентрациях инсулин находится, вероятно, в мономерной форме.

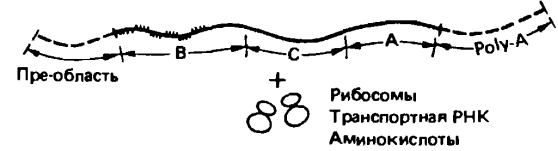
Биосинтез

А. Предшественники инсулина. Инсулин синтезируется в виде **препрогормона** (мол. масса 11 500). Он

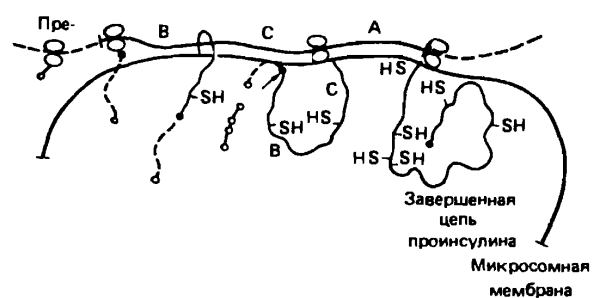
ХРОМОСОМНАЯ ДНК (ЯДРО)



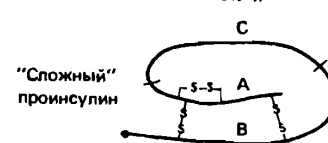
ИНФОРМАЦИОННАЯ РНК (ЦИТОПЛАЗМА)



ПОЛИСОМЫ (СИНТЕЗ БЕЛКОВ)



ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ



Аппарат Гольджи —————> Превращающие ферменты

СЕКРЕТОРНАЯ ГРАНУЛА

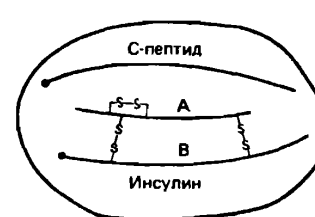


Рис. 51.3. Биосинтез инсулина с образованием короткоживущего предшественника. Буквами А, В и С обозначены А- и В-цепи инсулина и связующий (С) пептид. Лидерная последовательность из 23 аминокислот, закодированная в сегменте мРНК, расположенном рядом с тем сегментом, который детерминирует В-цепь (прерывистая линия), после образования отщепляется, вероятно, еще до завершения синтеза остальной части молекулы проинсулина. (Reproduced, with permission, from Steiner D. F.: Errors in insulin biosynthesis, N. Engl. J. Med., 1976, 294, 952.)

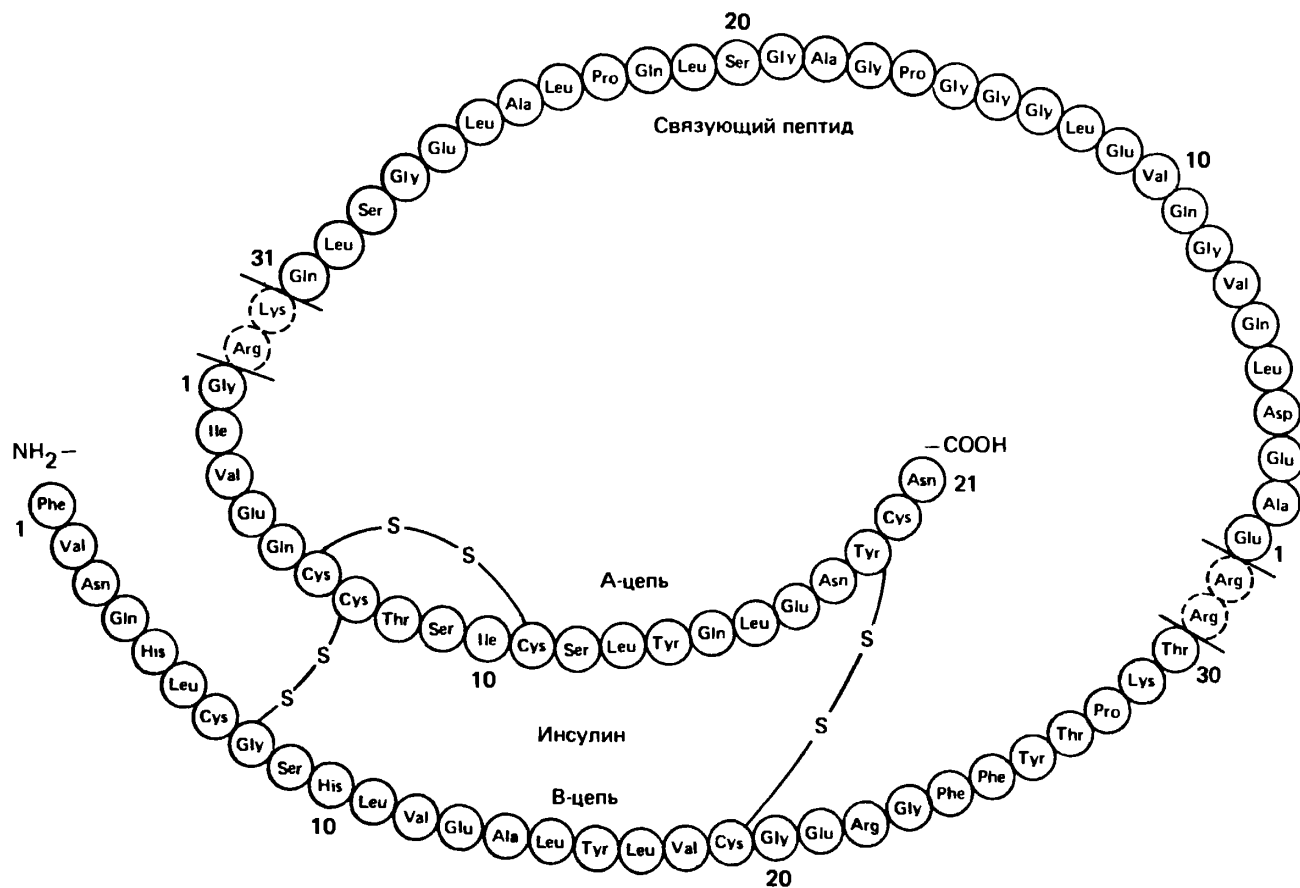


Рис. 51.4. Структура проинсулина человека. Молекулы инсулина и С-пептида связаны между собой с помощью двух дипептидных линкеров, расположенных по обе стороны от С-пептида. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Karam J. H., Sabler P. R., Forsham P. H. *Pancreatic hormones and diabetes mellitus*. In: *Basic and Clinical Endocrinology*, 2nd ed., Greenspan F. S., Forsham P. H. (eds.), Appleton and Lange, 1986.)

может служить примером пептида, образующегося в результате различных преобразований из более крупной молекулы предшественника. Последовательность и субклеточная локализация соответствующих биохимических превращений показаны на рис. 51.3. Состоящая из 23 аминокислот гидрофобная лидерная последовательность (пре-фрагмент) направляет молекулу-предшественник в цистерну эндоплазматического ретикула и там отделяется. В результате образуется молекула проинсулина (мол. масса 9000), принимающая конформацию, необходимую для образования нужных дисульфидных мостиков. Как показано на рис. 51.4, молекула проинсулина имеет следующее строение, считая от аминоконца:

В-цепь — С-пептид¹ — А-цепь.

Молекула проинсулина расщепляется в нескольких специфических участках с образованием эквимольных количеств зрелого инсулина и С-пептида. Эти

ферментативные превращения, показанные схематически на рис. 51.5, начинаются с протеиназы, обладающей трипсиноподобной активностью — ферментом, отщепляющим с каждой из сторон С-пептида по две основные аминокислоты: дипептид Arg31-Arg32 на N-конце С-пептида и дипептид Lys64-Arg65 — на С-конце С-пептида².

Б. Предшественники других гормонов островковых клеток. Синтез других гормонов островковых клеток также требует ферментативного превращения молекул-предшественников с большей молекулярной массой. Строение молекул панкреатического полипептида, глюкагона и соматостатина в сравнении со строением инсулина схематически показано на рис. 51.6. В образовании этих гормонов участвуют различные комбинации эндопротеолитических (трипсиноподобных) и экзопротеолитических (подобных карбоксипептидазе-В) ферментов, поскольку обладающие гормональной активностью по-

¹ С-пептид от англ. connecting — связующий. — *Прим. перев.*

² Указанное положение дипептидов соответствует их положению в полной молекуле проинсулина при отсчете с N-конца. — *Прим. перев.*

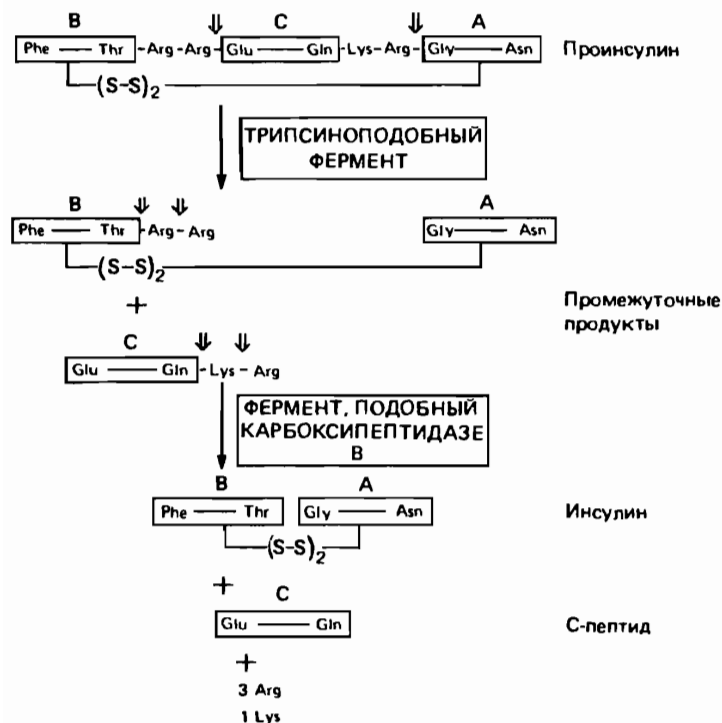


Рис. 51.5. Стадии расщепления проинсулина человека при совместном действии протеиназ, подобных трипсину, и карбоксипептидазе В. Стрелками показано, в каких местах происходит расщепление молекулы. (Redrawn and reproduced, with permission, from Steiner D. F., Tager H. S. p. 927. In: Endocrinology, Vol. 2., DeGroot L. J. (ed.), Grune and Stratton, 1979.)

следовательности могут обнаруживаться в различных участках молекулы-предшественника: соматостатин — на карбоксильном конце молекулы, панкреатический полипептид — на аминоконце, инсулин — на обоих концах и глюкагон — в средней части.

В. Субклеточная локализация синтеза инсулина и формирование гранул. Синтез инсулина и его упаковка в гранулы происходит в определенном порядке (рис. 51.7). Проинсулин синтезируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула. Затем в цистернах этой органеллы происходит ферментативное отщепление лидерной последовательности (пре-сегмента), образование дисульфидных мостиков и складывание молекулы (рис. 51.3). После этого молекула проинсулина переносится в аппарат Гольджи, где начинаются протеолиз и упаковка в секреторные гранулы. Созревание гранул продолжается по мере продвижения по цитоплазме в направлении плазматической мембраны. Как проинсулин, так и инсулин соединяются с цинком, образуя гексамеры, но поскольку около 95% проинсулина превращается в инсулин, то именно кристаллы последнего придают гранулам их морфологические особенности. Наряду с инсулином в гранулах содержатся также эквимоллярные количества С-пептида, однако эти

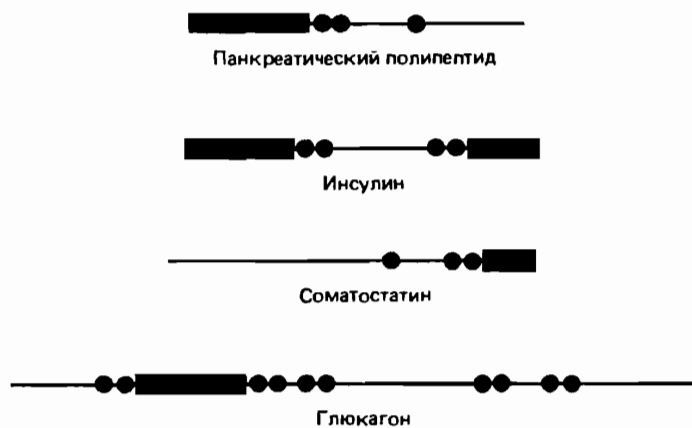


Рис. 51.6. Схема строения четырех основных продуктов эндокринных клеток поджелудочной железы. Черными полосками показана часть молекулы предшественника, соответствующая указанному в надписи гормону, тонкой линией обозначены остальные участки пептидной цепи молекулы-предшественника. Места расположения двухосновных аминокислот (аргинина или лизина), где происходит расщепление молекулы-предшественника, обозначены черными кружками. Молекула проинсулина изображена в виде линейной структуры, в которой дисульфидные связи не показаны. В действительности молекула проинсулина имеет последовательность: В-цепь — С-пептид — А-цепь. (Redrawn and reproduced, with permission, from Tager H. S. Abnormal products of the human insulin gene. Diabetes, 1984, 33, 693.)

молекулы не образуют кристаллических структур. При соответствующей стимуляции зрелые гранулы сливаются с плазматической мембраной, выбрасывая свое содержимое во внеклеточную жидкость путем эмиоцитоза.

Г. Свойства проинсулина и С-пептида. Длина проинсулинов колеблется от 78 до 86 аминокислот, причем эти различия обусловлены длиной С-пептида. Проинсулин имеет ту же растворимость и изоэлектрическую точку, что и инсулин. Он также образует гексамеры с кристаллами цинка и реагирует с антисывороткой к инсулину. Биологическая активность проинсулина составляет менее 5% биологической активности инсулина. Отсюда следует, что большая часть активного центра инсулина в молекуле предшественника замаскирована. Некоторая часть проинсулина секретируется вместе с инсулином, а в определенных ситуациях (опухоль из островковых клеток) он высвобождается в больших количествах, чем в норме. Поскольку период полужизни проинсулина в плазме значительно выше, чем у инсулина, и при этом проинсулин дает сильную перекрестную реакцию с антисывороткой к инсулину, уровень «инсулина», определяемый радиоиммунологическим методом, в некоторых случаях может превышать содержание биологически активного гормона.

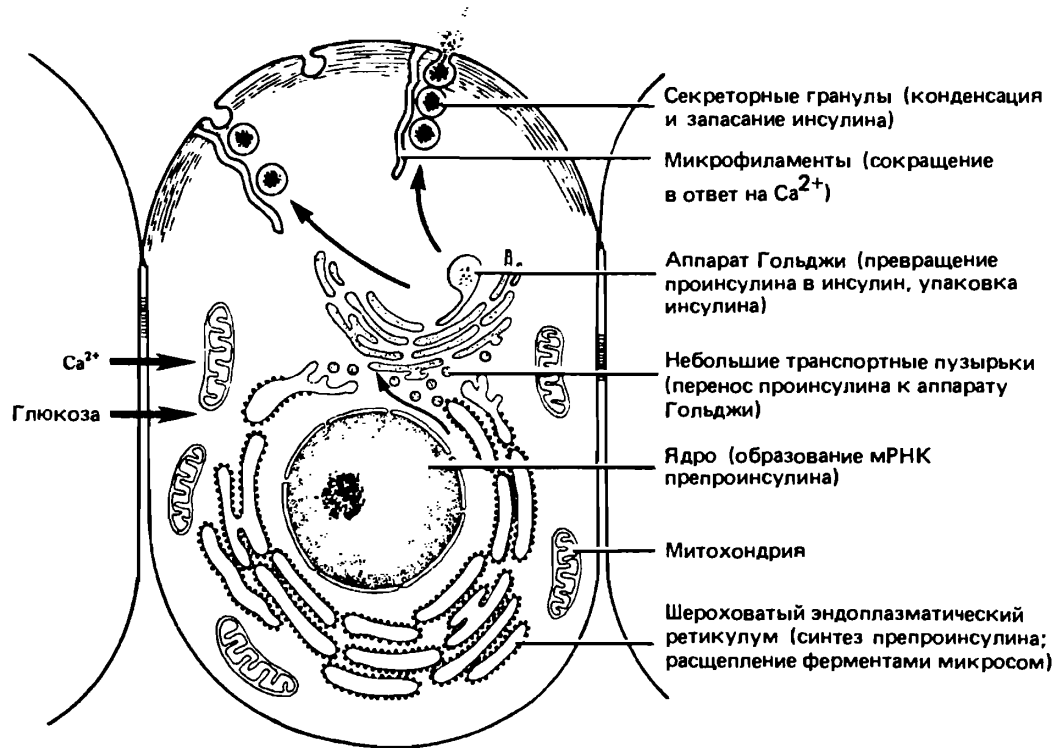


Рис. 51.7. Структурные компоненты В-клетки поджелудочной железы, участвующие в индуцированных глюкозой биосинтезе и секреции гормона. На схеме секреторные гранулы прилегают к микрофиламентам, которые сокращаются под влиянием кальция. (Based on data presented by Orci L. A portrait of the pancreatic B cell, *Diabetologia*, 1974, **10**, 163.) (Modified and reproduced, with permission, from Junqueira L. C., Carneiro J., Long J. A., *Basic Histology*, 5th ed., Appleton and Lange, 1986.)

Какой-либо биологической активности С-пептида не обнаружено. Эта молекула обладает иными антигенными свойствами, чем инсулин и проинсулин, поэтому иммунологическое определение С-пептида позволяет отличить эндогенносекретируемый инсулин от вводимого гормона и дает возможность судить о количестве эндогенного инсулина в тех случаях, когда его прямое определение оказывается невозможным из-за наличия инсулиновых антител. С-пептиды представителей различных видов характеризуются высокой частотой аминокислотных замен, что подтверждает положение о вероятном отсутствии биологической активности у этого фрагмента.

Д. Предшественники пептидов, родственных инсулину. Структурная организация молекулы прогормона неспецифична для предшественника инсулина. Предшественники близкородственных инсулину пептидных гормонов (релаксина и инсулиноподобных факторов роста) имеют такую же организацию (рис. 51.8). У всех этих гормонов последовательности А- и В-цепей в молекуле предшественника имеют на карбоксильных и аминоконцах высокогомологичные участки, соединяющиеся между собой связующим пептидом. В пептидных предшественниках инсулина и релаксина по обе стороны от связующего пептида расположены по две основные аминокислоты, соединяющие его с А- и В-цепями. После возникновения

между А- и В-цепями дисульфидных мостиков связующий пептид вырезается в результате эндопротеолиза, и молекула превращается в пептидный гормон, состоящий из двух (А и В) цепей. Инсулиноподобные факторы роста, будучи высокогомологичными инсулину и релаксину по своей первичной структуре, тем не менее имеют одно важное отличие: в молекуле их предшественника отсутствуют участки, по которым происходит отщепление связующего пептида, и поэтому активные гормоны сохраняют структуру единой полипептидной цепи.

Е. Ген инсулина человека. Ген человеческого инсулина (рис. 51.9) локализован в коротком плече хромосомы 11. У большинства млекопитающих экспрессируется один ген инсулина, организованный подобно человеческому гену, но у крыс и мышей имеются два неаллельных гена. В каждом из них закодирован особый проинсулин, дающий начало двум различным активным молекулам инсулина. В настоящее время разработан метод получения человеческого инсулина в бактериальных экспрессирующих системах с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Таким образом, проблему получения этого гормона в количествах, необходимых для больных диабетом, можно считать решенной.

Ж. Аномальные продукты гена инсулина человека. Знание структуры инсулинового гена и инсулиновой

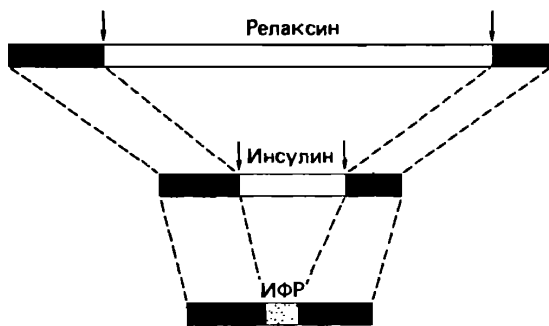


Рис. 51.8. Схематическое изображение структуры предшественников родственных инсулину пептидов. Гомологичные участки релаксина, инсулина и инсулиноподобного фактора роста изображены в виде черных полос. Аминокислотные последовательности, соединяющие В- и А-цепи в молекуле предшественников релаксина и инсулина, обозначены светлыми полосами. В ходе процессинга предшественников с образованием соответствующих продуктов, состоящих из двух цепей, эти связующие последовательности удаляются (вертикальные стрелки). Аминокислотная последовательность инсулиноподобного фактора роста, соответствующая таким связующим пептидам, но не удаляемая в ходе процессинга, изображена участком с точками. Инсулиноподобный фактор роста состоит лишь из одной пептидной цепи. (Redrawn and reproduced, with permission, from Tager H. S. Abnormal products of the human insulin gene, *Diabetes*, 1984, 33, 693.)

молекулы позволяет выявлять аномальные продукты гена, что в свою очередь дает дополнительную информацию о функции данного гормона. Выявлены три мутации этого гена, причем для каждой из них идентифицирована молекулярная основа дефекта. В одном случае в результате мутации единичного основания на месте фенилаланина-В24 оказался серин, в другом (опять-таки в результате единичной мутации) произошла замена фенилаланина-В25 на лейцин. В третьем случае изменился процессинг проинсулина в активный гормон: мутация нарушила отщепление 3'-конца С-пептида на границе с А-цепью. В основе этого дефекта лежит замена дипептида Lys-Arg в этом месте полипептидной цепи на Lys-X, в ре-



Рис. 51.9. Схематическое изображение структуры гена человеческого инсулина. Области, заштрихованные диагональными линиями, соответствуют нетранслируемым областям мРНК. Светлые участки соответствуют вставочным последовательностям, участки, выделенные пунктиром, — кодирующим последовательностям. Буквами L, B, C и A обозначены последовательности, кодирующие лидерный (сигнальный) пептид, В-цепь инсулина, С-пептид и А-цепь инсулина соответственно. Следует обратить внимание на то, что кодирующая последовательность для С-пептида разделена вставочной последовательностью. Масштаб в схеме выдержан. (Redrawn and reproduced, with permission, from Tager H. S. Abnormal products of the human insulin gene, *Diabetes*, 1984, 33, 639.)

зультате которой трипсиноподобное расщепление оказалось невозможным. Выявлению описанных мутаций способствовала их локализация в активном центре молекулы инсулина, в результате чего у соответствующих носителей 1) имеет место гиперинсулинемия, 2) отсутствуют признаки инсулинорезистентности, 3) снижена биологическая активность циркулирующего в крови инсулина и 4) отмечается нормальная реакция на экзогенный инсулин. По крайней мере еще четыре нуклеотидные замены были идентифицированы у «здоровых» людей. Эти мутации локализованы во вставочных (т. е. некодирующих) последовательностях, и на функциональную активность молекулы инсулина они не повлияли.

Регуляция секреции инсулина

Поджелудочная железа человека секретирует до 40—50 ед. инсулина в сутки, что соответствует 15—20% общего количества гормона в железе. Секреция инсулина — энергозависимый процесс, происходящий с участием системы микротрубочек и микрофиламентов островковых В-клеток и ряда медиаторов.

А. Глюкоза. Повышение концентрации глюкозы в крови — главный физиологический стимул секреции инсулина. Пороговой для секреции инсулина является концентрация глюкозы натощак 80—100 мг%, а максимальная реакция достигается при концентрации глюкозы 300—500 мг%. **Секреция инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы носит двухфазный характер** (рис. 51.10). Немедленный ответ, или первая фаза реакции, начинается в пределах 1 мин после повышения концентрации глюкозы и продолжается в течение 5—10 мин. Затем наступает более медленная и продолжительная вторая фаза, обрывающаяся сразу после удаления глюкозного стимула. Согласно существующим представлениям, наличие двух фаз ответной реакции инсулина отражает существование двух различных внутриклеточных компартментов, или пулов, инсулина. Абсолютная концентрация глюкозы в плазме — не единствен-

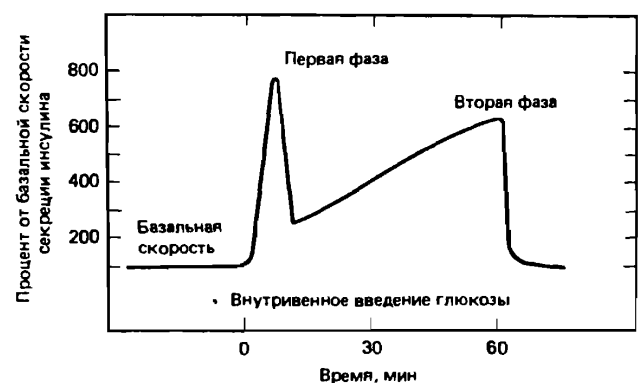


Рис. 51.10. Двухфазный характер секреции инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы в плазме крови.

ная детерминанта секреции инсулина. В-клетки реагируют и на **скорость изменения** концентрации глюкозы в плазме.

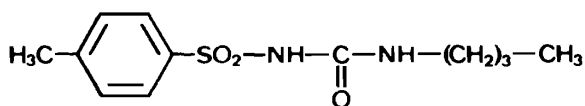
При пероральном введении глюкозы происходит гораздо более сильная стимуляция секреции инсулина, чем при ее внутривенном введении. Отсюда следует, что на секрецию инсулина помимо глюкозы влияют также и различные гормоны желудочно-кишечного тракта, такие, как секретин, холецистокинин, гастрин и энтероглюкагон. Однако наибольшая роль в этом процессе принадлежит желудочному ингибиторному полипептиду (ЖИП).

Предполагаются два разных механизма регуляции глюкозой секреции инсулина. Согласно одной гипотезе, глюкоза взаимодействует с рецептором, локализованным, вероятно, на поверхностной мембране В-клетки, что и приводит к активации механизма секреции. Вторая гипотеза исходит из того, что в стимуляции секреции инсулина участвуют внутриклеточные метаболиты или скорость таких метаболических путей, как пентозофосфатный шунт, цикл лимонной кислоты или гликолиз. Обе гипотезы нашли экспериментальные подтверждения.

Б. Гормональные факторы. На высвобождение инсулина влияет множество гормонов. α -Адренергические агонисты, особенно адреналин, подавляют секрецию инсулина даже при стимуляции этого процесса глюкозой. β -Адренергические агонисты стимулируют секрецию инсулина, вероятно, путем повышения концентрации внутриклеточного сАМР (см. ниже). Именно этот механизм, по-видимому, лежит в основе действия желудочного ингибиторного пептида, который повышает секрецию инсулина, а также в основе эффектов высоких концентраций ТТГ, АКТГ, гастрина, секретина, холецистокинина и энтероглюкагона.

При хроническом воздействии избыточных количеств гормона роста, кортизола, плацентарного лактогена, эстрогенов и прогестинов секреция инсулина также повышается. Поэтому и неудивительно, что на поздних сроках беременности секреция инсулина значительно возрастает.

В. Фармакологические агенты. Секрецию инсулина стимулируют многие лекарственные препараты, однако в терапевтических целях чаще всего используются **производные сульфонилмочевины**. Для лечения диабета типа II (инсулиннезависимого) широко применяют такие средства, как толбутамид, который стимулирует секрецию инсулина иным способом, чем глюкоза.



Толбутамид

Г. Внутриклеточные медиаторы секреции. При стимуляции секреции инсулина глюкозой возрастает

потребление O_2 и использование АТР. Это сопряжено с индуцированной K^+ деполяризацией мембраны, что приводит к быстрому проникновению в клетку Ca^{2+} по потенциал-зависимому каналу. Слияние инсулин-содержащих секреторных гранул с плазматической мембраной и происходящая в результате секреция инсулина — процесс, зависящий от кальция. Стимуляция секреции инсулина глюкозой происходит и с участием метаболитов фосфатидилинозитола (гл. 44).

В процессе секреции инсулина участвует и сАМР, который потенцирует эффекты глюкозы и аминокислот. Этот нуклеотид может стимулировать высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных органелл или активировать киназу, фосфорилирующую какой-то компонент системы микрофиламенты — микротрубочки (что обуславливает ее чувствительность к Ca^{2+} и способность к сокращению). Замена внеклеточного Na^+ на какой-либо другой одновалентный катион ослабляет эффекты глюкозы и других стимуляторов секреции инсулина; Na^+ , возможно, регулирует внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} через систему совместного транспорта.

Метаболизм инсулина

В отличие от инсулиноподобных факторов роста **инсулин не имеет белка-носителя** в плазме. Поэтому в норме период его полужизни не достигает и 3—5 мин. Метаболические превращения инсулина происходят в основном в печени, почках и плаценте. Около 50% этого гормона исчезает из плазмы за один пассаж через печень. **В метаболизме инсулина участвуют две ферментные системы.** Первая представляет собой инсулин-специфическую протеиназу, обнаруживаемую во многих тканях, но в наибольшей концентрации — в органах, перечисленных выше. Эта протеиназа была выделена из скелетных мышц и очищена. Установлено, что ее активность зависит от сульфгидрильных групп и проявляется при физиологических значениях pH. Вторая система — **глутатион-инсулин-трансгидрогеназа**. Этот фермент восстанавливает дисульфидные мостики, после чего отделенные друг от друга А- и В-цепи быстро расщепляются. Какой из двух механизмов наиболее активен в физиологических условиях, не ясно; не ясно также, является ли каждый из них регулируемым.

Физиологические эффекты инсулина

О том, сколь велика роль инсулина в углеводном, белковом и липидном обмене, яснее всего свидетельствуют последствия инсулиновой недостаточности у человека. Основным признаком **сахарного диабета** является **гипергликемия**, развивающаяся в результате 1) пониженного проникновения глюкозы в клетки, 2) снижения утилизации глюкозы различными тка-

нями и 3) повышения образования глюкозы (глюконеогенеза) в печени. Ниже мы рассмотрим все эти процессы более подробно.

Полиурия, полидипсия и потеря веса, несмотря на адекватное потребление калорий,—таковы главные симптомы инсулиновой недостаточности. Чем они объясняются? Если в норме уровень глюкозы в плазме у человека редко превышает 120 мг%, то у больных с инсулиновой недостаточностью он, как правило, бывает значительно выше. Когда содержание глюкозы в плазме достигает определенных значений (у человека это обычно выше 180 мг%), максимальная способность реабсорбции глюкозы в почечных канальцах оказывается превышенной и сахар выделяется с мочой (глюкозурия). Объем мочи при этом увеличивается из-за осмотического диуреза, что обязательно сопровождается вначале потерей жидкости (полиурия), затем обезвоживанием организма, жаждой и чрезмерным потреблением воды (полидипсия). Глюкозурия вызывает значительную потерю калорий (4,1 ккал на каждый грамм экскретируемой глюкозы), что в сочетании с потерей мышечной и жировой ткани приводит к резкому похуданию, несмотря на повышенный аппетит (полифагия) и нормальное или увеличенное потребление калорий.

В отсутствие инсулина снижается биосинтез белка, что отчасти объясняется уменьшением транспорта аминокислот в мышцы (аминокислоты служат субстратами для глюконеогенеза). Таким образом, инсулиновая недостаточность у человека сопровождается отрицательным азотным балансом. Характерное для этой ситуации отсутствие антилиполитического действия инсулина, равно как и его липогенного действия, приводит к тому, что содержание жирных кислот в плазме возрастает. Когда оно достигает уровня, превышающего способность печени окислять жирные кислоты до CO_2 , в крови накапливаются β -гидроксимасляная и ацетоуксусная кислоты (кетоз). Вначале организм компенсирует накопление этих органических кислот увеличением количества выдыхаемого CO_2 . Однако если развитие кетоза не сдерживается введением инсулина, то развивается тяжелый метаболический ацидоз и больной погибает от диабетической комы. Механизм инсулиновой недостаточности схематически представлен на рис. 51.11.

А. Влияние на транспорт глюкозы через мембрану. Внутриклеточная концентрация свободной глюкозы значительно ниже ее внеклеточной концентрации. Большинство имеющихся данных свидетельствует о том, что скорость транспорта глюкозы через плазматическую мембрану мышечных и жировых клеток определяет интенсивность фосфорилирования глюкозы и ее дальнейший метаболизм. D-глюкоза и другие сахара с аналогичной конфигурацией по C_1 - C_3 (галактоза, D-ксилоза и L-арабиноза) проникают в клетки путем облегченной диффузии, опосредован-

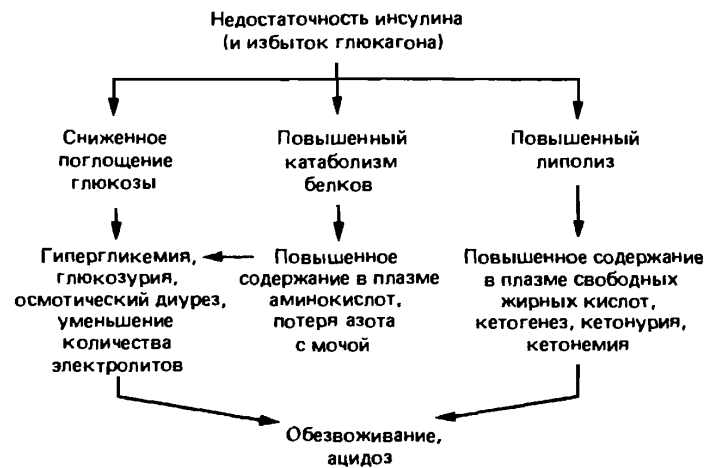


Рис. 51.11. Патофизиология инсулиновой недостаточности. (Courtesy of R. J. Havel.)

ной переносчиком. Во многих клетках инсулин усиливает этот процесс (рис. 51.12), что обусловливается увеличением числа переносчиков (V_{max} -эффект), а не повышением сродства связывания (K_M -эффект). Согласно имеющимся данным, в жировых клетках это происходит путем мобилизации переносчиков глюкозы из неактивного их пула в аппарате Гольджи с дальнейшим направлением их к активному участку плазматической мембраны. Такая транслокация переносчиков — процесс, зависящий от температуры и энергии и независимый от синтеза белков (рис. 51.13).

Печеночные клетки представляют собой важное исключение из этой схемы. Инсулин не стимулирует облегченной диффузии глюкозы в гепатоциты, но усиливает ее приток косвенным путем, индуцируя глюкокиназу — фермент, превращающий глюкозу в глюкозо-6-фосфат. В результате быстрого протекающего фосфорилирования концентрация свободной глюкозы в гепатоцитах поддерживается на очень низком уровне, что способствует проникновению глюкозы в клетки путем простой диффузии по градиенту концентрации.



Рис. 51.12. Проникновение глюкозы в мышечные клетки

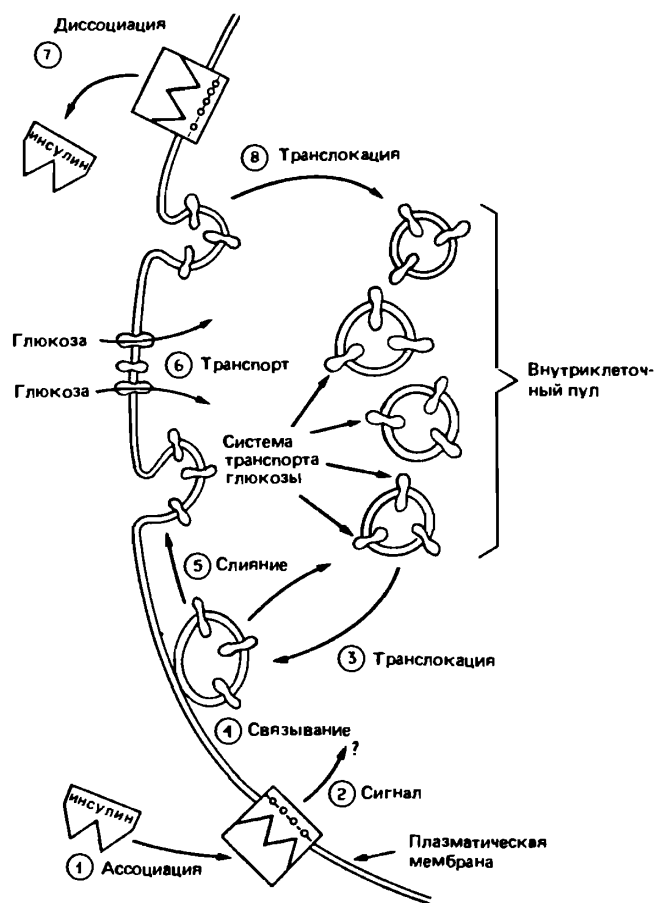
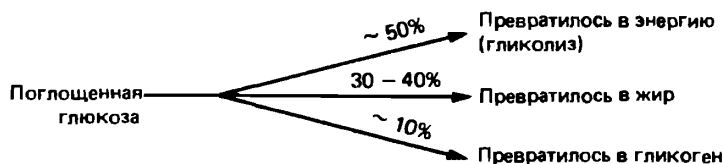


Рис. 51.13. Транслокация переносчиков глюкозы под влиянием инсулина. (Reproduced, with permission, from Karnieli E. et al. Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell, J. Biol. Chem., 1981, 256, 4772, Courtesy of S. Cushman.)

Инсулин способствует также проникновению в клетки аминокислот (особенно в мышечные клетки) и стимулирует перемещение K^+ , Ca^{2+} , нуклеозидов и органического фосфата. Эти эффекты не зависят от влияния инсулина на поступление в клетку глюкозы.

Б. Влияние на утилизацию глюкозы. Как показано ниже, инсулин оказывает влияние на внутриклеточную утилизацию глюкозы различными путями.



В норме примерно половина поглощенной глюкозы вступает на путь гликолиза и превращается в энергию, другая половина запасается в виде жиров или гликогена. В отсутствие инсулина ослабевают интенсивность гликолиза и замедляются анаболические процессы гликогенеза и липогенеза. Действительно,

при инсулинодефицитном диабете всего лишь 5% поглощенной глюкозы превращается в жир.

Инсулин усиливает интенсивность гликолиза в печени, повышая активность и концентрацию ряда ключевых ферментов, таких, как глюкокиназа, фосфофруктокиназа и пируваткиназа. Более интенсивный гликолиз сопровождается более активной утилизацией глюкозы и, следовательно, косвенно способствует снижению выхода глюкозы в плазму. Инсулин, кроме того, подавляет активность глюкозо-6-фосфатазы — фермента, обнаруживаемого в печени, но не в мышцах. В результате глюкоза удерживается в печени, так как для глюкозо-6-фосфата плазматическая мембрана непроницаема.

В жировой ткани инсулин стимулирует липогенез путем 1) притока ацетил-СoA и NADPH, необходимых для синтеза жирных кислот, 2) поддержания нормального уровня фермента ацетил-СoA-карбоксилазы, катализирующего превращение ацетил-СoA в малонил-СoA, и 3) притока глицерола, участвующего в синтезе триацилглицеролов. При инсулиновой недостаточности все эти процессы ослабевают и в результате интенсивность липогенеза снижается. Другой причиной снижения липогенеза при инсулиновой недостаточности служит тот факт, что жирные кислоты, высвобождающиеся в больших количествах под действием некоторых гормонов, не встречаясь противодействия со стороны инсулина, подавляют собственный синтез, ингибируя ацетил-СoA-карбоксилазу. Из всего сказанного следует, что суммарный эффект влияния инсулина на жир — анаболический.

Механизм влияния инсулина на утилизацию глюкозы включает в себя и другой анаболический процесс. В печени и в мышцах инсулин стимулирует превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат, который затем подвергается изомеризации в глюкозо-1-фосфат и в таком виде включается в гликоген под действием фермента гликогенсинтазы (ее активность также стимулируется инсулином). Это действие имеет двойственный и непрямой характер. Инсулин снижает внутриклеточный уровень сАМР, активируя фосфодиэстеразу. Поскольку сАМР-зависимое фосфорилирование инактивирует гликогенсинтазу, при низком уровне этого нуклеотида фермент находится в активной форме. Инсулин активирует и фосфатазу, катализирующую дефосфорилирование гликогенсинтазы, тем самым активируя этот фермент. И наконец, инсулин ингибирует фосфорилазу с помощью механизма, работающего с участием сАМР и фосфатазы, как описано выше. В результате высвобождение глюкозы из гликогена снижается. Таким образом, влияние инсулина на метаболизм гликогена также является анаболическим.

В. Влияние на образование глюкозы (глюконеогенез). Влияние инсулина на транспорт глюкозы, гликолиз и гликогенез проявляется за считанные секун-

ды или минуты, поскольку первичные реакции этого влияния сводятся к активации или инактивации ферментов путем их фосфорилирования или дефосфорилирования. Более продолжительное влияние инсулина на содержание глюкозы в плазме крови связано с **ингибированием глюконеогенеза**. Образование глюкозы из предшественников неуглеводной природы осуществляется в результате ряда ферментативных реакций, многие из которых стимулируются глюкагоном (действие которого опосредовано cAMP), глюкокортикоидными гормонами и в меньшей степени α - и β -адренергическими агентами — ангиотензином II и вазопрессином. Инсулин же подавляет эти ферментативные реакции. Роль ключевого фермента глюконеогенеза в печени принадлежит фосфоенолпируват-карбоксикиназе (ФЕПМК), катализирующей превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват. Недавние исследования (см. ниже) показывают, что под действием инсулина количество этого фермента снижается в результате избирательного ингибирования транскрипции гена, кодирующего мРНК для фосфоенолпируват-карбоксикиназы.

Г. Влияние на метаболизм глюкозы. Результирующее действие всех перечисленных выше эффектов инсулина сводится к **снижению содержания глюкозы в крови**. Этому действию инсулина противостоят эффекты целого ряда гормонов, что, несомненно, отражает один из важнейших защитных механизмов организма, поскольку длительная гипогликемия способна вызвать несовместимые с жизнью изменения в мозге и, следовательно, ее нельзя допускать.

Д. Влияние на метаболизм липидов. Липогенное действие инсулина уже рассматривалось в разделе, посвященном его влиянию на утилизацию глюкозы. Кроме того, инсулин является мощным ингибитором липолиза в печени и жировой ткани, оказывая, таким образом, не прямое анаболическое действие. Частично это может быть следствием способности инсулина снижать содержание cAMP (уровень которого в тканях повышается под действием липолитических гормонов глюкагона и адреналина), а также способности инсулина ингибировать активность гормон-чувствительной липазы. В основе такого ингибирования лежит, по-видимому, активация фосфатазы, которая дефосфорилирует и тем самым инактивирует липазу или cAMP-зависимую протеинкиназу. В результате инсулин снижает содержание жирных кислот в крови. Это в свою очередь вносит вклад в действие инсулина на углеводный обмен, поскольку жирные кислоты подавляют гликолиз на нескольких этапах и стимулируют глюконеогенез. Данный пример показывает, что при обсуждении регуляции метаболизма нельзя учитывать действие лишь какого-либо одного гормона или метаболита. Регуляция — сложный процесс, в котором превращения по определенному метаболическому пути пред-

ставляют собой результат сложных взаимодействий целого ряда гормонов и метаболитов.

У больных с инсулиновой недостаточностью активность липазы повышается, что приводит к усилению липолиза и увеличению концентрации жирных кислот в плазме и печени. Содержание глюкагона у таких больных также повышается, и это тоже усиливает выход свободных жирных кислот в кровь. (Глюкагон оказывает противодействие многим эффектам инсулина, и метаболический статус при диабете отражает соотношение уровней глюкагона и инсулина). Часть свободных жирных кислот метаболизируется до ацетил-СоА (обращение липогенеза) и затем в лимоннокислом цикле — до CO_2 и H_2O . При инсулиновой недостаточности емкость этого процесса быстро оказывается превышенной и ацетил-СоА превращается в ацетоацетил-СоА и затем в ацетоуксусную и β -гидроксимасляную кислоты. Под действием инсулина происходят обратные превращения.

Инсулин, по-видимому, влияет на образование или клиренс липопротеинов очень низкой плотности и липопротеинов низкой плотности, поскольку у больных с плохой компенсацией диабета содержание этих частиц, а следовательно, и содержание холестерина часто бывает повышенным. Именно этот метаболический дефект лежит, очевидно, в основе такого серьезного осложнения, как ускоренный атеросклероз, наблюдаемый у многих больных диабетом.

Влияние инсулина на метаболические процессы проиллюстрировано на рис. 51.14, где изображен ряд важнейших метаболических превращений в отсутствие инсулина.

Е. Влияние на метаболизм белков. Инсулин, как правило, оказывает анаболическое действие на белковый обмен, поскольку он стимулирует синтез белков и уменьшает их распад. Инсулин стимулирует поглощение мышцей нейтральных аминокислот типа А — эффект, не связанный с поглощением глюкозы или с последующим включением аминокислот в белки. Влияние инсулина на синтез белков в скелетной и сердечной мышцах проявляется, по-видимому, на уровне трансляции мРНК.

В последние годы было показано, что инсулин влияет на синтез специфических белков, вызывая изменения в соответствующих мРНК. Возможно, именно этим объясняется действие гормона на активность или количество отдельных белков. (Подробнее эта проблема обсуждается ниже.)

Ж. Влияние на размножение клеток. Инсулин стимулирует пролиферацию ряда клеток в культуре. Возможно, он участвует и в регуляции роста *in vivo*. При изучении регуляции роста чаще всего используются культуры фибробластов. В таких клетках инсулин усиливает способность фактора роста фибробластов (ФРФ), тромбоцитарного фактора роста (ТФР), фактора роста эпидермиса (ФРЭ), стимули-

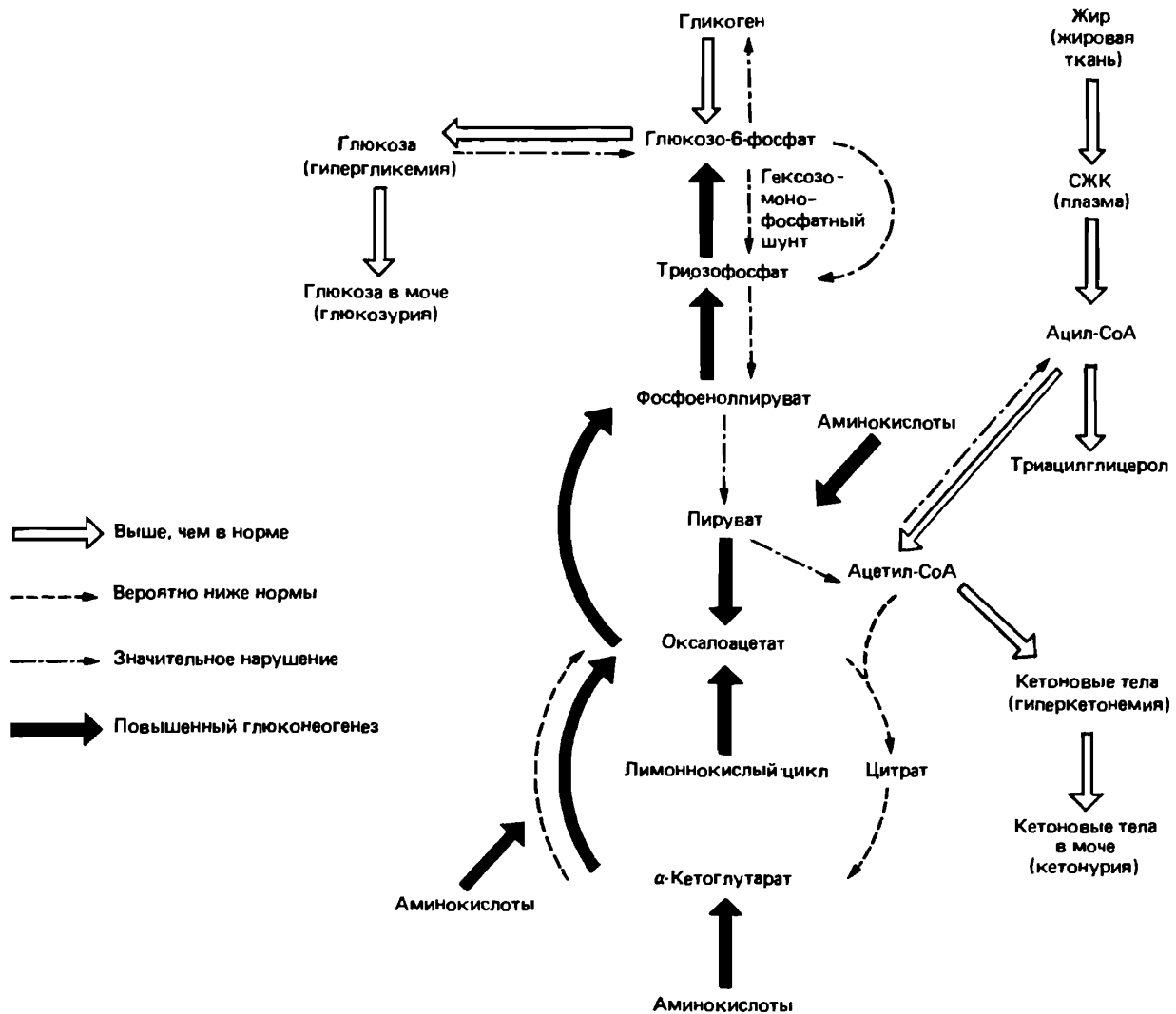


Рис. 51.14. Метаболические последствия инсулиновой недостаточности. СЖК — свободные жирные кислоты.

рующих рост опухолей форболовых эфиров, простагладина $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), вазопрессина и аналогов cAMP активировать размножение клеток, остановленных в фазе G₁ в результате удаления из среды сыворотки.

Преходящая потребность в различных факторах роста лежит в основе концепции о существовании двух классов таких факторов. Один из них, к которому относятся ТФР, ФРФ, PGF_2 и форболовые эфиры, вызывает, по-видимому, какие-то биохимические изменения в ранней G-фазе, которые, возникнув, устраняют дальнейшую потребность клетки в этих факторах и делают ее способной к репликации. Факторы роста второго класса (к ним относится инсулин) способствуют «продвижению» клетки к S-фазе и через нее и должны присутствовать постоянно. Данная модель описывает процессы, происходящие в фибробластах 3Т3, и ее универсальность не доказана. Не известно также, связан ли эффект инсулина с его

взаимодействием с собственным рецептором или с рецептором инсулиноподобного фактора роста (ИФР) (тем более, что ИФР-1 тоже является фактором «продвижения»).

Инсулин поддерживает рост и репликацию многих клеток эпителиального происхождения, в том числе гепатоцитов, клеток гепатомы, клеток опухоли коры надпочечника и клеток карциномы молочной железы. Очень низкие концентрации инсулина стимулируют репликацию (по-видимому, через инсулиновый рецептор), причем нередко это происходит в отсутствие других пептидных факторов роста. Действительно, инсулин является необходимым компонентом всех известных сред для культивирования тканей, так что его значение для роста и репликации клеток несомненно.

Биохимический механизм влияния инсулина на репликацию клеток не выяснен; предполагают, что он основан на анаболическом действии гормона.

Возможно, здесь играет роль влияние на поглощение глюкозы, фосфата, нейтральных аминокислот типа А и катионов. Гормон может стимулировать репликацию, используя свою способность активировать или инактивировать ферменты путем регуляции скорости и степени фосфорилирования белков или регулируя синтез ферментов.

Весьма интересная новая область исследований связана с изучением тирозинкиназной активности. Инсулиновый рецептор, как и рецепторы многих других факторов роста, включая ТФР и ФРЭ, обладает тирозинкиназной активностью. Важно отметить, что по крайней мере 10 онкогенных продуктов (многие из которых, вероятно, участвуют в стимулировании репликации злокачественных клеток) также представляют собой тирозинкиназы. Клетки млекопитающих содержат аналоги этих онкогенов (**протоонкогены**), продукты которых могли бы участвовать в репликации нормальных клеток. В пользу предположения о роли протоонкогенов свидетельствуют недавние работы, показавшие, что экспрессия, по крайней мере двух продуктов протоонкогенов—с-fos и с-mys,—после добавления сыворотки к культуре клеток с остановленным ростом усиливается. Показано также что, ТФР стимулирует образование специфических мРНК. Предстоит выяснить, аналогичен ли механизм действия инсулина.

Механизм действия инсулина

А. Рецептор инсулина. Действие инсулина начинается с его связывания со специфическим гликопротеиновым рецептором на поверхности клетки-мишени. Различные эффекты этого гормона (рис. 51.15) могут проявляться либо через несколько секунд или минут (транспорт, фосфорилирование белков, активация и ингибирование ферментов, синтез РНК), либо через несколько часов (синтез белка и ДНК и клеточный рост).

Инсулиновый рецептор подробно исследован с помощью биохимических методов и технологии рекомбинантных ДНК. Он представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц (α и β) в конфигурации $\alpha_2\beta_2$, связанных между собой дисульфидными мостиками (рис. 51.15). Обе субъединицы содержат много гликозильных остатков. Удаление сиаловой кислоты и галактозы снижает как способность связывать инсулин, так и активность этого гормона. Каждая из гликопротеиновых субъединиц обладает особой структурой и определенной функцией. α -Субъединица (мол. масса 135 000) целиком расположена вне клетки, и связывание инсулина, вероятно, осуществляется с помощью богатого цистинном домена. β -Субъединица (мол. масса 95 000)—трансмембранный белок, выполняющий вторую важную функцию рецептора (гл. 44), т. е. преобразова-

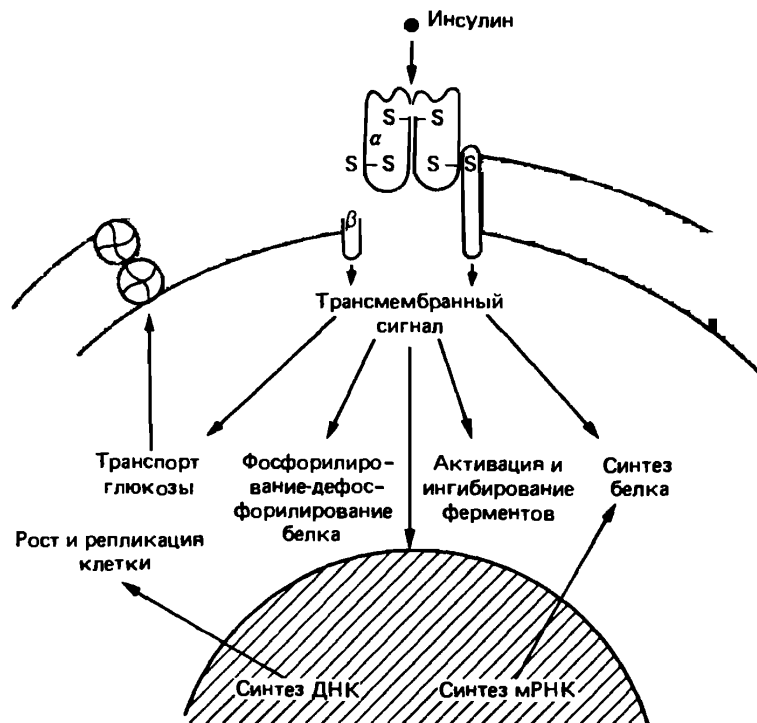


Рис. 51.15. Связь между рецептором инсулина и его действием. (Courtesy of C. R. Kahn.)

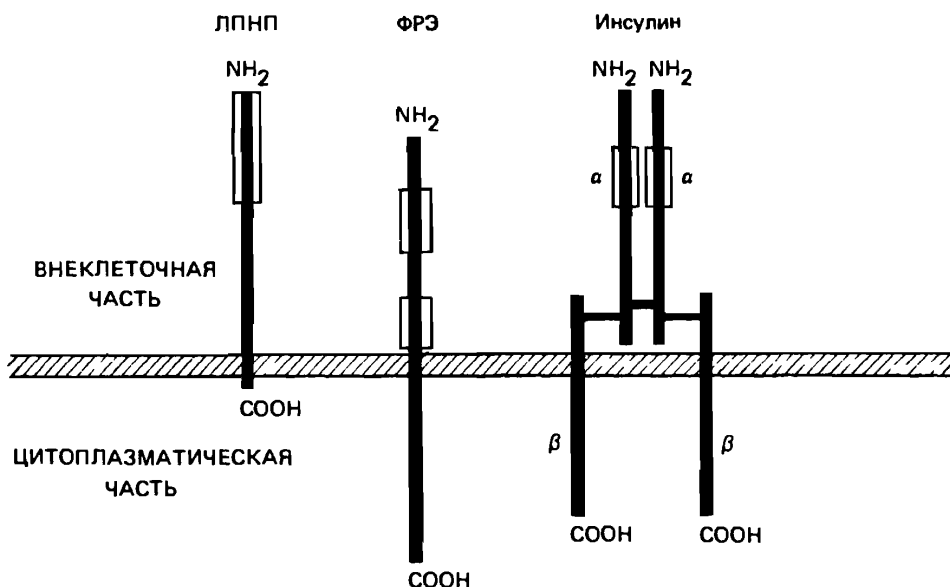


Рис. 51.16. Схема строения рецепторов липопroteинов низкой плотности (ЛПНП), фактора роста эпидермиса (ФРЭ) и инсулина. В каждом из этих рецепторов аминоконцы находятся в той части молекулы, которая выступает из клетки. Рамками обозначены участки, богатые цистеином, которые, как считают, участвуют в связывании лиганда. В каждом рецепторе (~ 25 аминокислот) имеется короткий домен, пересекающий плазматическую мембрану (заштрихованная полоса), и внутриклеточный домен варьирующей длины. Рецепторы ФРЭ и инсулина обладают тирозинкиназной активностью, локализованной в цитоплазматическом домене; кроме того, в этом домене находятся участки, в которых происходит аутофосфорилирование. Инсулиновый рецептор представляет собой гетеротетрамер, отдельные цепи (вертикальные полосы) которого связаны между собой дисульфидными мостиками.

ние сигнала. Цитоплазматическая часть β -субъединицы обладает тирозинкиназной активностью и содержит участок аутофосфорилирования. Считается, что и то и другое важно для преобразования сигнала и действия инсулина (см. ниже). Поразительное сходство между тремя рецепторами, выполняющими различные функции, проиллюстрировано на рис. 51.16. Действительно, последовательности некоторых участков β -субъединицы гомологичны таковым в рецепторе ФРЭ.

Рецептор инсулина постоянно синтезируется и распадается; его период полужизни составляет 7—12 ч. Рецептор синтезируется в виде одноцепочечного пептида в шероховатом эндоплазматическом ретикулеуме и быстро гликозилируется в аппарате Гольджи. Предшественник человеческого рецептора инсулина состоит из 1382 аминокислот, его мол. масса составляет 190 000, при расщеплении он образует зрелые α - и β -субъединицы. У человека ген инсулинового рецептора локализован в хромосоме 19.

Рецепторы инсулина обнаружены на поверхности большинства клеток млекопитающих. Их концентрация достигает 20 000 на клетку, причем часто они выявляются и на таких клетках, которые не относят к типичным мишеням инсулина. Спектр метаболических эффектов инсулина хорошо известен. Однако инсулин участвует и в таких процессах, как рост и репликация клеток (см. выше), органогенез и дифференцировка у плода, а также в процессах заживления и регенерации тканей. Строение инсулинового рецеп-

тора, способность различных инсулинов связываться с рецепторами и вызывать биологические реакции практически идентичны в клетках всех типов и у всех видов. Так, свиной инсулин почти всегда в 10—20 раз эффективнее свиного проинсулина, который в свою очередь в 10—20 раз эффективнее инсулина морской свинки даже у самой морской свинки. Инсулиновый рецептор имеет, по-видимому, высоко консервативную структуру, еще более консервативную, чем структура самого инсулина.

При связывании инсулина с рецептором происходят следующие события: 1) изменяется конформация рецептора, 2) рецепторы связываются друг с другом, образуя микроагрегаты, пятна (patches) или нашлапки, 3) рецептор подвергается интернализации и 4) возникает какой-то сигнал. Значение конформационных изменений рецептора не известно, но интернализация, вероятно, служит средством регуляции количества и кругооборота рецепторов. В условиях высокого содержания инсулина в плазме, например при ожирении или акромегалии, число инсулиновых рецепторов снижается и чувствительность тканей-мишеней к инсулину уменьшается. Такая «снижающая» регуляция обусловлена потерей рецепторов в результате их интернализации, т. е. процесса проникновения инсулин-рецепторных комплексов в клетку путем эндоцитоза с помощью покрытых клатрином пузырьков (см. гл. 41). «Снижающая» регуляция объясняет отчасти инсулинорезистентность при ожирении и сахарном диабете II типа.

Б. Внутриклеточные медиаторы. Хотя механизм действия инсулина изучается более 60 лет, некоторые важнейшие вопросы, например природа внутриклеточного сигнала, остаются нерешенными, и инсулин в этом отношении не исключение. Внутриклеточные посредники не идентифицированы для очень многих гормонов (табл. 44.1). Множество различных молекул рассматривалось в качестве возможных внутриклеточных вторых посредников или медиаторов. К ним относятся сам инсулин, кальций, циклические нуклеотиды (сАМР, сGMP), H_2O_2 , пептиды мембранного происхождения, фосфолипиды мембраны, одновалентные катионы и тирозинкиназа (рецептор инсулина). Не одно из предположений не подтвердилось.

В центре внимания современных исследователей лежит тот факт, что инсулиновый рецептор сам является ферментом, чувствительным к инсулину, поскольку при связывании инсулина он подвергается аутофосфорилированию. Эта функция осуществляется β -субъединицей, которая, действуя как протеинкиназа, переносит γ -фосфат с АТР на остаток тирозина в β -субъединице. Инсулин повышает $V_{\max}$ этой ферментативной реакции, а двухвалентные катионы, особенно Mn^{2+} , снижают K_m для АТР.

Фосфорилирование тирозина нетипично для клеток млекопитающих (на долю фосфотирозина приходится всего 0,03% фосфоаминокислот, содержащихся в нормальных клетках), и вполне возможно, что наличие у рецепторов ФРЭ, ТФР, ИФР-1 тирозинкиназной активности неслучайно. Существует предположение, что тирозинкиназная активность — важный фактор в действии продуктов ряда вирусных онкогенов. Их связь с клеточными аналогами онкогенов, обладающими сходными свойствами при злокачественном и нормальном клеточном росте, рассматривалась выше. Изучение структуры этих компонентов выявило высокую степень гомологии между рецепторами и онкогенами, например между рецептором ФРЭ и *erb-B*, между рецептором ТФР и *v-sis* и между инсулиновым рецептором и *v-ros*.

Участие тирозинкиназы в преобразовании инсулин-рецепторного сигнала не доказано, но оно могло бы заключаться в фосфорилировании специфического белка, инициирующего действие инсулина, в запуске каскада фосфорилирование-дефосфорилирование, в изменении некоторых свойств клеточной мембраны или образовании какого-то связанного с мембраной продукта, например фосфолипида.

В. Фосфорилирование-дефосфорилирование белка. Многие из метаболических эффектов инсулина, особенно те, которые возникают быстро, опосредованы его влиянием на реакции фосфорилирования-дефосфорилирования белка, что в свою очередь влияет на ферментативную активность данного белка. Перечень ферментов, активность которых регу-

лируется таким путем, приведен в табл. 51.3. В некоторых случаях инсулин снижает внутриклеточное содержание сАМР (активируя сАМР-фосфодиэстеразу), что приводит к уменьшению активности сАМР-зависимой протеинкиназы. Такие эффекты характерны для гликогенсинтазы и фосфорилазы. В других случаях действие инсулина не зависит от сАМР и сводится к активации других протеинкиназ (например, в случае тирозинкиназы инсулинового рецептора), ингибированию третьих протеинкиназ (табл. 44.4) или (что значительно чаще) к стимуляции фосфатаз фосфопротеинов. Дефосфорилирование увеличивает активность ряда ключевых ферментов (табл. 51.3). Такие ковалентные модификации обеспечивают почти мгновенные изменения активностей ферментов.

Таблица 51.3. Ферменты, степень фосфорилирования и активность которых регулируются инсулином. (Modified and reproduced, with permission, from Denton R. M. et al: a partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* 1981, 21, 347.)

Фермент	Изменения активности	Возможный механизм
Метаболизм сАМР		
Фосфодиэстераза (низкая K_m)	Повышается	Фосфорилирование
Протеинкиназа (сАМР-зависимая)	Понижается	Ассоциация R- и C-субъединиц
Метаболизм гликогена		
Гликогенсинтаза	Повышается	Дефосфорилирование
Киназа фосфорилазы	Понижается	»
Гликолиз и глюконеогенез		
Пируватдегидрогеназа	Повышается	»
Пируваткиназа	»	»
6-Фосфофрукто-2-киназа	»	»
Фруктозо-2,6-бисфосфатаза	Понижается	»
Обмен липидов		
Ацетил-СоА — карбоксилаза	Повышается	Фосфорилирование
ГМГ-СоА-редуктаза (гидроксиметилглутарил-СоА-редуктаза)	»	Дефосфорилирование
Триацилглицерол-липаза	Понижается	»
Другие процессы		
Тирозинкиназа (рецептор инсулина)	?	Фосфорилирование

Г. Влияние на трансляцию мРНК. Известно, что инсулин влияет на количество и активность по крайней мере 50 белков в различных тканях, причем многие из этих эффектов сводятся к ковалентной модификации. Представление о роли инсулина в трансляции мРНК основывается главным образом на данных о рибосомном S6-белке — компоненте рибосомной субъединицы 40S. Такой механизм мог бы обеспечивать общее влияние инсулина на синтез белков в печени, скелетных и сердечных мышцах.

Д. Влияние на экспрессию генов. Все описанные эффекты инсулина реализуются на уровне плазматической мембраны или в цитоплазме. Однако инсулин способен влиять (по-видимому, через свой внутриклеточный медиатор) и на некоторые специфические ядерные процессы. Фермент фосфоенолпируват-карбоксикиназа (ФЕПКК) катализирует скорость-лимитирующую реакцию глюконеогенеза. Синтез ФЕПКК под действием инсулина снижается, а следовательно, уменьшается и интенсивность глюконеогенеза. Сравнительно недавно было показано, что при добавлении инсулина к культуре клеток гепатомы уже через несколько минут избирательно уменьшается скорость транскрипции гена ФЕПКК (рис. 51.17). В результате уменьшается количество как первичного транскрипта, так и зрелой мРНК_{ФЕПКК}, что в свою очередь приводит к снижению синтеза ФЕПКК. Этот эффект проявляется при физиологических концентрациях инсулина (10^{-12} — 10^{-9} моль/л), опосредуется инсулиновым рецептором и, по-видимому, обусловлен снижением скорости синтеза мРНК_{ФЕПКК}.

Впервые влияние инсулина на транскрипцию генов было обнаружено при изучении механизма регуляции ФЕПКК, однако в настоящее время известны и другие примеры. Более того, представляется вероятным, что регуляция синтеза мРНК — главный эффект инсулина. Инсулин оказывает влияние на синтез многих специфических мРНК (табл. 51.4), в том числе на пока не идентифицированные мРНК в печени, жировой ткани и в мышцах (скелетных и сердечной). Доказано действие инсулина на транскрипцию генов овальбумина, альбумина и казеина.

Действие инсулина распространяется на ферменты, остающиеся в клетках, на секретируемые ферменты и белки, принимающие участие в процессах размножения, и на структурные белки (табл. 51.4). Эти эффекты регистрируются во многих органах и тканях и у многих видов. Регуляция транскрипции специфических мРНК под действием инсулина в настоящее время не вызывает сомнений. Этот путь модуляции ферментативной активности по важности не уступает механизму фосфорилирования-дефосфорилирования. Именно влиянием инсулина на транскрипцию генов, вероятно, объясняется его роль в эмбриогенезе, дифференцировке, а также росте и делении клеток.

Действие инсулина распространяется на ферменты, остающиеся в клетках, на секретируемые ферменты и белки, принимающие участие в процессах размножения, и на структурные белки (табл. 51.4). Эти эффекты регистрируются во многих органах и тканях и у многих видов. Регуляция транскрипции специфических мРНК под действием инсулина в настоящее время не вызывает сомнений. Этот путь модуляции ферментативной активности по важности не уступает механизму фосфорилирования-дефосфорилирования. Именно влиянием инсулина на транскрипцию генов, вероятно, объясняется его роль в эмбриогенезе, дифференцировке, а также росте и делении клеток.

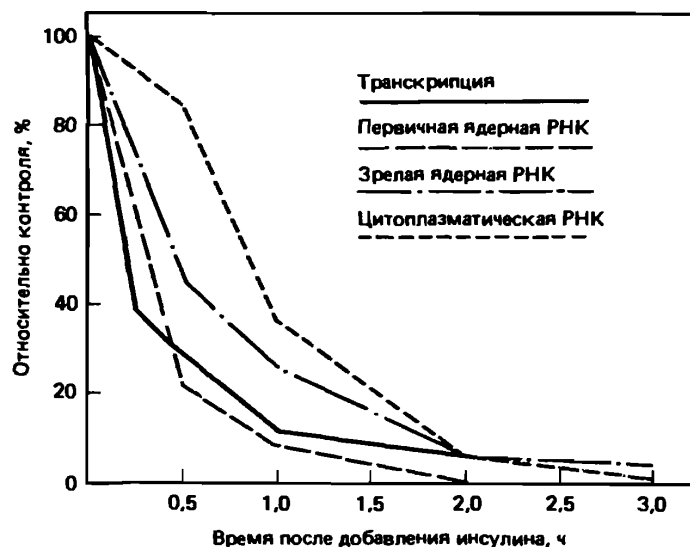


Рис. 51.17. Влияние гена инсулина на транскрипцию специфического гена. При внесении инсулина в культуру клеток гепатомы Н4ПЕ скорость транскрипции гена ФЕПКК быстро снижается, что сопровождается уменьшением количества первичного транскрипта в зрелой мРНК_{ФЕПКК}. При уменьшении количества цитоплазматической мРНК_{ФЕПКК} снижается и скорость синтеза ФЕПКК-белка. (Reproduced, with permission, from Sasaki K. et al. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription, J. Biol. Chem., 1984, 259, 15242.)

Таблица 51.4. Белки, информационные РНК которых регулируются инсулином

Внутриклеточные ферменты

- Тирозин-аминотрансфераза ¹⁾
- Фосфоенолпируват-карбоксикиназа ¹⁾
- Синтаза жирных кислот
- Пируваткиназа
- Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа ¹⁾
- Глицеральдегид-1-дегидрогеназа ¹⁾
- Глюкокиназа

Секретируемые белки и ферменты

- Альбумин ¹⁾
- Амилаза
- α_2 -Глобулин
- Гормон роста ¹⁾

Белки, участвующие в процессах размножения

- Овальбумин ¹⁾
- Казеин ¹⁾

Структурные белки

- δ -Кристаллин

Другие белки

- В печени (р33 и т. п.)
- В жировой ткани
- В сердечной мышце
- В скелетных мышцах

¹⁾ Инсулин регулирует скорость транскрипции соответствующих генов.

Патофизиология

При недостаточности инсулина или устойчивости к его действию развивается **сахарный диабет**. Примерно у 90% больных диабетом наблюдается инсулин-независимый сахарный диабет II типа (ИНЗСД). Для таких больных характерны ожирение, повышенное содержание в плазме инсулина и снижение количества инсулиновых рецепторов. У остальных 10% больных наблюдается диабет типа I, т.е. инсулин-зависимый сахарный диабет I типа (ИЗСД). Рассмотренные выше метаболические нарушения более типичны именно для диабета типа I.

Ряд редких состояний иллюстрирует важные особенности действия инсулина. У некоторых людей образуются антитела к рецепторам инсулина. Эти антитела предотвращают связывание инсулина с рецептором, и в результате у таких лиц развивается синдром тяжелой инсулинорезистентности (см. табл. 43.2). При опухолях из В-клеток возникает гиперинсулинемия и синдром, характеризующийся тяжелой гипогликемией. О важной роли инсулина (или, возможно, ИФР-1 или ИФР-2) для органогенеза свидетельствуют редкие случаи **карликовости**. Этот синдром характеризуется низким весом при рождении, малой мышечной массой, малым количеством подкожного жира, очень мелкими чертами лица, инсулинорезистентностью со значительным повышением содержания биологически активного инсулина в плазме и ранней смертью. У некоторых таких больных либо совсем отсутствовали рецепторы инсулина, либо они были дефектными.

Таблица 51.5. Сравнение инсулина и инсулиноподобных факторов роста

	Инсулин	ИФР-1 (соматомедин С)	ИФР-2 (активность, стимулирующая размножение, АСР)
Число аминокислотных остатков	51	70	67
Источник	В-клетки поджелудочной железы	Печень и другие ткани	Различные ткани
Регулирующие факторы	Глюкоза	Гормон роста, питание	Неизвестны
Содержание в плазме	0,3—2 нг/мл	В пределах нг/мл	В пределах нг/мл
Связывающий белок в плазме	Нет	Есть	Есть
Основная физиологическая роль	Регуляция метаболизма	Рост скелета и хрящевой ткани	Неизвестна, возможно, играет роль в процессе эмбрионального развития

цептор ИФР-1, подобно рецептору инсулина, представляет собой гетеродимер с субъединичной структурой $\alpha_2\beta_2$ и обладает тирозинкиназной активностью. Рецептор ИФР-2 состоит из одной полипептидной цепи с мол. массой 260 000 и лишен тирозинкиназной активности.

Эти гормоны способны в какой-то степени перекрестно связываться с рецепторами, чем, возможно,

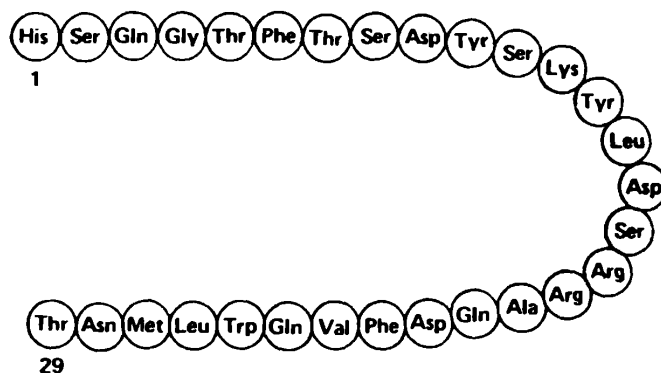


Рис. 51.18. Аминокислотная последовательность глюкагона. (Reproduced, with permission, from Katzung B. G. (ed.), Basic and Clinical Pharmacology, 3rd ed., Appleton and Lange, 1987.)

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА

Инсулиноподобные факторы роста (ИФР-1 и ИФР-2) не относятся к панкреатическим гормонам, но тем не менее близки к инсулину по структуре и функции. Влияние инсулина на рост и репликацию клеток трудно отделить от аналогичных эффектов со стороны ИФР-1 и ИФР-2. Действительно, инсулин и инсулиноподобные факторы роста могут взаимодействовать в этом процессе. О структурном сходстве этих белков уже говорилось (см. также рис. 51.8). Более детальное сравнение проведено в табл. 51.5. ИФР-1 и ИФР-2 представляют собой одноцепочечные полипептиды, состоящие из 70 и 67 аминокислот соответственно. Степень гомологии между двумя этими гормонами достигает 62%, причем 50% аминокислотных остатков в каждом из них идентичны таковым в инсулине. Молекулы этих факторов роста имеют разные антигенные участки и по-разному регулируются (табл. 51.5). Инсулин оказывает более сильное влияние на метаболизм, чем инсулиноподобные факторы роста, однако последние сильнее стимулируют рост клеток. Каждый из этих гормонов имеет свой специфический рецептор. Ре-

Таблица 51.6. Связывание инсулина, ИФР-1 и ИФР-2 с различными рецепторами

Гормон	Рецептор		
	инсулин	ИФР-1	ИФР-2
Инсулин	Высокое	Низкое	Незначительное
ИФР-1	Умеренное	Высокое	Умеренное
ИФР-2	Незначительное	Низкое	Высокое

и объясняется присущая им смешанная биологическая активность (табл. 51.6). Как правило, способность этих гормонов стимулировать рост наиболее всего коррелирует с их сродством к рецепторам ИФР-1 и ИФР-2.

ГЛЮКАГОН

Первые появившиеся в продаже препараты инсулина обладали следующей особенностью: у принимавших их больных содержание глюкозы в плазме сначала повышалось и лишь потом снижалось. Этот факт объясняется наличием в препарате примеси другого пептида — глюкагона, второго гормона островковых клеток поджелудочной железы.

Химические свойства

Глюкагон представляет собой одноцепочечный полипептид (мол. масса 3485), состоящий из 29 аминокислотных остатков (рис. 51.18). В молекуле глюкагона нет дисульфидных связей, поскольку в ней нет остатков цистеина. По некоторым иммунологическим и физиологическим свойствам глюкагон аналогичен энтероглюкагону — пептиду, экстрагированному из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Кроме того, 14 из 27 аминокислотных остатков глюкагона идентичны таковым в молекуле секретина (табл. 52.5).

Биосинтез и метаболизм

Основным местом синтеза глюкагона служат А-клетки островкового аппарата поджелудочной железы. Однако довольно большие количества этого гормона могут вырабатываться и в других местах желудочно-кишечного тракта. Глюкагон синтезируется в виде значительно более крупного предшественника — проглюкагона (мол. масса около 9000). Обнаружены и более крупные молекулы, однако не ясно, являются ли они предшественниками глюкагона или близкородственными пептидами. Лишь 30—40% иммунореактивного «глюкагона» в плазме приходится на долю панкреатического глюкагона. Остальная часть — это более крупные молекулы, лишенные биологической активности.

В плазме глюкагон находится в свободной фор-

ме. Поскольку он не связывается с транспортным белком, период его полужизни мал (около 5 мин). Инактивация этого гормона происходит в печени под действием фермента, который, расщепляя связь между Ser-2 и Gln-3, удаляет с N-конца две аминокислоты. Печень — первый барьер на пути секретиремого глюкагона, и, поскольку она быстро инактивирует этот гормон, содержание его в крови воротной вены гораздо выше, чем в периферической крови.

Регуляция секреции

Секреция глюкагона подавляется глюкозой — эффект, подчеркивающий противоположную метаболическую роль глюкагона и инсулина. Подавляет ли глюкоза секрецию глюкагона непосредственно или ее ингибирующий эффект опосредуется действием инсулина или ИФР-1, не ясно, поскольку оба последних гормона подавляют высвобождение глюкагона. На его секрецию влияют и многие другие соединения, включая аминокислоты, жирные кислоты и кетонные тела, гормоны желудочно-кишечного тракта и нейромедиаторы.

Физиологические эффекты

Эффекты глюкагона, как правило, противоположны эффектам инсулина. Если инсулин способствует запасанию энергии, стимулируя гликогенез, липогенез и синтез белка, то глюкагон, стимулируя гликогенолиз и липолиз, вызывает быструю мобилизацию источников потенциальной энергии с образованием глюкозы и жирных кислот соответственно. Глюкагон — наиболее активный стимулятор глюконеогенеза; кроме того, он обладает и кетогенным действием.

Печень — основная мишень глюкагона. Связываясь со своими рецепторами на плазматической мембране гепатоцитов, глюкагон активирует аденилатциклазу. Генерируемый при этом сАМР в свою очередь активирует фосфорилазу, которая ускоряет распад гликогена, а одновременное ингибирование гликогенсинтазы тормозит образование последнего (см. гл. 44). Для этого эффекта характерна и гормональная, и тканевая специфичность: глюкагон не влияет на гликогенолиз в мышце, а адреналин активен и в мышцах, и в печени.

Повышенное содержание сАМР индуцирует ряд ферментов глюконеогенеза, стимулируя превращение аминокислот в глюкозу. Главная роль среди этих ферментов принадлежит ФЕПМК. Глюкагон опосредованно через сАМР повышает скорость транскрипции гена ФЕПМК, стимулируя тем самым синтез больших количеств ФЕПМК. Этот эффект противоположен действию инсулина, который подавляет транскрипцию гена ФЕПМК. Другие примеры приведены в табл. 51.7. Суммарный эффект глю-

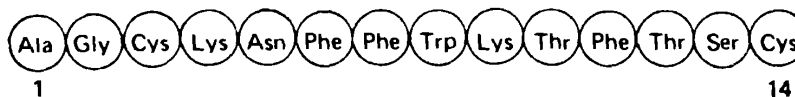


Рис. 51.19. Аминокислотная последовательность соматостатина. (Reproduced, with permission, from Karam J. H., Salber P. R., Forsham P. H. *Pancreatic hormones and diabetes mellitus*. In: *Basic and Clinical Endocrinology*, 2nd ed. Greenspan F. S., Forsham P. H. (editors). Appleton and Lange. 1986.)

Таблица 51.7. Ферменты, индуцируемые или репрессируемые инсулином или глюкагоном. (Slightly modified and reproduced, with permission from Karam J. H., Salber P. R., Forsham P. H. *Pancreatic hormones and diabetes mellitus*. In: *Basic and Clinical Endocrinology*, 2nd ed., Greenspan F. S., Forsham P. H. (eds.), Appleton and Lange, 1986.)

Ферменты, индуцируемые высоким отношением инсулин:глюкагон и репрессируемые низким отношением инсулин:глюкагон

Глюкокиназа
Цитрат-расщепляющий фермент
Ацил-СоА-карбоксилаза
ОМГ-СоА-редуктаза
Пируваткиназа
6-Фосфофрукто-1-киназа
6-Фосфофрукто-2-киназа (фруктозо-2,6-бисфосфатаза)

Ферменты, индуцируемые низким соотношением инсулин:глюкагон и репрессируемые высоким отношением инсулин:глюкагон

Глюкозо-6-фосфатаза
Фосфоенолпируват-карбоксикиназа (ФЕПКС)
Фруктозо-1,6-бисфосфатаза

кагона в печени сводится к повышенному образованию глюкозы. Поскольку большая ее часть покидает печень, концентрация глюкозы в крови под влиянием глюкагона повышается.

Глюкагон — мощный липолитический агент. Повышая содержание сАМР в адипоцитах, он активирует гормон-чувствительную липазу. Образующиеся при этом в большом количестве жирные кислоты могут использоваться в качестве источников энергии или превращаться в кетонные тела (ацетоацетат и β-гидроксимасляная кислота). Это важный аспект метаболизма при диабете, поскольку при инсулиновой недостаточности содержание глюкагона всегда повышено.

СОМАТОСТАТИН

Соматостатин был назван так потому, что впервые был выделен из гипоталамуса как фактор, подавляющий секрецию гормона роста. Соматостатин — циклический пептид, синтезируемый в виде большого прогормона (мол. масса около 11 500) в D-клетках островков поджелудочной железы. Скорость транскрипции гена просоматостатина значительно повышается под действием сАМР. Прогормон вначале превращается в 28-членный пептид и в конце

концов в молекулу с мол. массой 1640, содержащую 14 аминокислотных остатков (рис. 51.19). Биологической активностью обладают все формы гормона.

Помимо гипоталамуса и островков поджелудочной железы соматостатин обнаружен и во многих тканях желудочно-кишечного тракта, где он, по-видимому, регулирует множество функций, а также в различных участках центральной нервной системы (там он может играть роль нейромедиатора).

Соматостатин подавляет секрецию других гормонов островковых клеток, действуя паракринным путем. В фармакологических количествах он значительно уменьшает кетоз, сопровождающий инсулиновую недостаточность. Это, по-видимому, объясняется его способностью тормозить секрецию глюкагона, обусловленную инсулинопенией. Он снижает также поступление питательных веществ из желудочно-кишечного тракта в кровь, поскольку 1) замедляет опорожнение желудка, 2) тормозит секрецию гастрина, а следовательно, и образование соляной кислоты, 3) подавляет экзокринную (секреция пищеварительных ферментов) функцию поджелудочной железы, 4) уменьшает кровообращение в брюшной полости и 5) снижает всасывание сахаров. Биохимические и молекулярные эффекты этого гормона изучены недостаточно.

ПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

Панкреатический полипептид (ПП), образованный 36 аминокислотами (мол. масса около 4200), — недавно обнаруженный продукт F-клеток поджелудочной железы. У человека его секрецию стимулируют богатая белками пища, голод, физическая нагрузка и острая гипогликемия. Соматостатин и внутривенно введенная глюкоза снижают его секрецию. Функция панкреатического полипептида неизвестна. Весьма вероятно, что он влияет на содержание гликогена в печени и на желудочно-кишечную секрецию.

ЛИТЕРАТУРА

- Chance R. E., Ellis R. M., Bromer W. W. Porcine proinsulin: Characterization and amino acid sequence, *Science*, 1968, **161**, 165.
Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity, *Nature*, 1982, **296**, 613.

- Docherty K., Steiner D. F.* Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis, *Annu. Rev. Physiol.*, 1982, **44**, 625.
- Granner D. K., Andreone I.* Insulin modulation of gene expression, In: *Diabetes and Metabolism Reviews*, Vol. 1, DeFronzo R. (ed.), Wiley, 1985.
- Kahn C. R.* The molecular mechanism of insulin action, *Annu. Rev. Med.*, 1985, **36**, 429.
- Kono T.* Action of insulin on glucose transport and cAMP phosphodiesterase in fat cells: Involvement of two distinct molecular mechanisms, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1983, **30**, 519.
- Straus D. S.* Growth-stimulatory action of insulin in vitro and in vivo, *Endocr. Rev.*, 1984, **5**, 356.
- Tager H. S.* Abnormal products of the human insulin gene, *Diabetes*, 1984, **33**, 693.
- Ullrich A. et al.* Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes, *Nature*, 1985, **313**, 756.
- Unger R. H., Orci L.* Glucagon and the A cell (2 parts), *N. Engl. J. Med.*, 1981, **304**, 1518, 1575.

Гормоны желудочно-кишечного тракта

Дарил Греннер

ВВЕДЕНИЕ

Желудочно-кишечный тракт секретирует множество гормонов, вероятно, больше, чем какой-либо другой отдельный орган. Желудочно-кишечный тракт предназначен для продвижения пищевых продуктов к местам переваривания, создания подходящей среды (ферменты, рН, соли и т. д.) для процесса переваривания, транспорта переваренных продуктов через клетки слизистой оболочки во внеклеточное пространство, для доставки этих продуктов в отдаленные клетки с кровью и удаления отходов. В осуществлении всех этих функций принимают участие гормоны желудочно-кишечного тракта.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Описаны синдромы заболеваний, связанных с избыточной продукцией некоторых гормонов желудочно-кишечного тракта. Признаки и симптомы таких состояний часто проявляются со стороны многих органов, и врачу, непомнящему об этих синдромах, может быть трудно установить правильный диагноз.

ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Эндокринология как наука началась с открытия желудочно-кишечного гормона. В 1902 г. Бейлисс и Старлинг ввели в денервированную петлю тощей кишки собаки соляную кислоту и обнаружили при этом увеличение секреции жидкости поджелудочной железой. Внутривенная инъекция HCl не давала такого эффекта, но он воспроизводился при внутривенном введении экстракта слизистой тощей кишки. Авторы пришли к выводу, что за этот эффект ответствен «секретин», который высвобождается при стимуляции верхних отделов кишечника и переносится с кровью к поджелудочной железе, где и оказывает

свое действие. Бейлисс и Старлинг первыми использовали термин «гормон», и секретин оказался первым гормоном с выясненной функцией.

Активность секретина была открыта в 1902 г., но потребовалось целых 60 лет, чтобы идентифицировать его химически. За это время было обнаружено много «новых» гормонов, расшифрована их аминокислотная последовательность и осуществлен синтез, причем на это часто уходило всего несколько лет (например, для кальцитонина; см. гл. 47). Причины того, что для расшифровки химической природы секретина потребовался 60-летний срок, теперь ясны. Дело в том, что семейства близкородственных желудочно-кишечных пептидов имеют много общего в своей химической структуре и биологических функциях, причем большинство этих пептидов существует в множественных формах. Методика их разделения разработана только недавно.

СВОЙСТВА ГОРМОНОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Из тканей желудочно-кишечного тракта выделено более 12 пептидов, обладающих специфическим действием (табл. 52.1). Пептиды, относящиеся к системе желудочно-кишечных гормонов, во многих отношениях отличаются от пептидов более типичных гормональных систем. Некоторые из этих различий рассматриваются ниже.

А. Разнообразие эффектов. Многие желудочно-кишечные пептиды удовлетворяют классическому определению «гормон» (см. гл. 43). К ним относятся гастрин, секретин, желудочный ингибиторный полипептид (ЖИП) и, возможно, холецистокинин (ХЦК), мотилин, панкреатический полипептид (ПП) и энтероглюкагон (табл. 52.1). Другие желудочно-кишечные пептиды, вероятно, обладают **паракринным** эффектом (см. гл. 43) или действуют **нейроэндокринным** путем (как локальные нейромедиаторы или нейромомо-

Таблица 52.1. Желудочно-кишечные гормоны. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Deveney C. W., Way L. W. Regulatory peptides of the gut. In: Basic Clinical Endocrinology, 2nd ed. Greenspan F. S., Forsham P. H. (Editors). Appleton and Lange, 1986.)

Гормоны	Механизм действия ¹⁾			Основное действие
	Э	Н	П	
Гастрин	+	(+)	—	Секреция желудком кислоты и пепсина
Холецистокинин (ХЦК)	(+)	+	—	Секреция амилазы поджелудочной железой
Секретин	+	—	—	Секреция бикарбоната поджелудочной железой
Желудочный ингибиторный полипептид (ЖИП)	+	—	—	Усиливает опосредованную глюкозой секрецию инсулина. Ингибирует секрецию кислоты желудком
Вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП)	—	+	(—)	Расслабление гладких мышц. Стимулирует секрецию бикарбоната поджелудочной железой
Мотилин	(+)	—	—	Запускает моторику кишечника при переваривании пищи
Соматостатин	—	+	(+)	Множественные ингибиторные эффекты
Панкреатический полипептид (ПП)	(+)	—	(+)	Ингибирует секрецию бикарбоната и белка поджелудочной железой
Энкефалины	—	+	(+)	Опиатоподобные эффекты
Вещество Р	—	+	(+)	Физиологическое действие не установлено
Бомбезиноподобная иммунореактивность (БПИ)	—	+	(+)	Стимулирует секрецию гастрина и холецистокинина
Нейротензин	—	+	(+)	Физиологическое действие неизвестно
Энтеролюкагон	(+)	+	+	Физиологическое действие неизвестно

¹⁾ Э — эндокринное; Н — нейрокринное; П — паракринное, () — возможно, но не доказано; + да; — нет.

дуляторы). Это предположение основано на том, что, хотя указанные вещества обнаруживаются в высоких концентрациях в нейронах и в различных клетках желудочно-кишечного тракта, в крови они в нормальных условиях либо отсутствуют, либо имеют такой короткий период полужизни, который исклю-

чает биологическую активность. К пептидам с нейроэндокринным действием относят вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), соматостатин, вещество Р, энкефалины, бомбезиноподобные пептиды и нейротензин (табл. 52.1). Многие из этих веществ, по-видимому, обладают *in vivo* паракринным действием, поскольку при добавлении к тканевым или органным культурам оказывают влияние на различные клетки.

Б. Локализация клеток, продуцирующих желудочно-кишечные гормоны. Отличительная особенность желудочно-кишечной эндокринной системы состоит в том, что ее клетки рассеяны по желудочно-кишечному тракту, а не собраны в отдельных органах, как это характерно для более типичных эндокринных желез. Распределение желудочно-кишечных гормонов показано в табл. 52.2, в которой также приведены названия клеток.

Поскольку многие желудочно-кишечные пептиды найдены в нервах тканей желудочно-кишечного тракта, неудивительно, что большинство из них присутствует и в центральной нервной системе (табл. 52.3). Синтез пептидов тканями центральной нервной системы часто бывает трудно доказать, но с помощью новых молекулярно-биологических методов можно определить активность генов, кодирующих эти вещества. Функция указанных пептидов в центральной и периферической нервной системе находится в процессе исследования.

В. Предшественники и множественные формы. Из основных желудочно-кишечных гормонов только секретин существует в единственной форме (табл. 52.4). Присутствие в тканях желудочно-кишечного тракта и в кровотоке множественных форм этих пептидов затрудняет определение количества и природы их молекул. Решению данной проблемы способствует существование молекул-предшественников. Кроме того, оказывается полезным синтез чистых пептидов, которые могут быть получены в форме, свободной от примесей посторонних пептидов, и затем использованы для изучения функции специфических пептидов.

Г. Перекрывающиеся структура и функция пептидов желудочно-кишечного тракта. Аминокислотные последовательности желудочно-кишечных пептидов в настоящее время уже известны (табл. 52.5). Большинство этих гормонов по сходству их последовательностей и функции могут быть отнесены к одному из двух семейств. Это **семейство гастрина** (гастрин и холецистокинин) и **семейство секретина** (секретин, глюкагон, желудочный ингибиторный полипептид, вазоактивный кишечный пептид и глицентин). Нейроэндокринные пептиды — нейротензин, бомбезиноподобные пептиды, вещество Р и соматостатин — не обнаруживают структурного сходства с каким-либо желудочно-кишечным пептидом. Общее свойство этой последней группы молекул состоит в том,

Таблица 52.2. Распределение желудочно-кишечных гормонов. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Deveney C. W., Way L. W. Regulatory peptides of the gut. In: Basic and Clinical Endocrinology, 2nd ed. Greenspan F. S., Forsham P. H. (editors). Appleton and Lange, 1986.)

	Эндокринные клетки ¹⁾	Локализация	Локализация в нервах кишечника
Гастрин	G	Привратник желудка, двенадцатиперстная кишка	(?)
Холецистокинин (ХЦК)	I	Двенадцатиперстная и тощая кишка	Да
Секретин	S	Двенадцатиперстная и тощая кишка	Нет
Желудочный ингибиторный полипептид	K	Тонкий кишечник	Нет
Вазоактивный кишечный полипептид (ВИП)	D ₁	Поджелудочная железа	Да
Мотилин	ЭХ ₂	Тонкий кишечник	Нет
Вещество Р	ЭХ ₁	Весь желудочно-кишечный тракт	Да
Нейротензин	N	Подвздошная кишка	(?)
Соматостатин	D	Желудок, двенадцатиперстная кишка, поджелудочная железа	Да
Энкефалины		Желудок, двенадцатиперстная кишка, желчный пузырь	Да
Бомбезиноподобная иммунореактивность (БПИ)	P	Желудок, двенадцатиперстная кишка	Да
Панкреатический полипептид (ПП)	D ₂ F	Поджелудочная железа	Нет
Энтероглюкагон	A L	Поджелудочная железа Тонкий кишечник	Нет

¹⁾ Эндокринные клетки, продуцирующие специфический гормон, обозначаются буквами. ЭХ — энтерохромаффинные клетки. Некоторые пептиды обнаруживаются как в нервах, так и в эндокринных клетках. ВИП найден только в нервах. Клетки, содержащие энкефалины, еще не обозначены.

что они имеют очень короткий срок полужизни в плазме и могут не играть в ней физиологической роли.

Д. Механизм действия. Изучение механизма действия желудочно-кишечных пептидных гормонов отстает от аналогичных исследований других гормонов. До недавнего времени основное внимание уде-

Таблица 52.3. Пептиды, найденные в кишечнике и центральной нервной системе. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Deveney C. W., Way L. W. Regulatory peptides of the gut. In: Basic and Clinical Endocrinology, 2nd ed. Greenspan F. S., Forsham P. H. (editors). Appleton and Lange, 1986.)

Выделенные из мозга и кишечника

Вещество Р

Нейротензин

Секретин

Соматостатин

Холецистокинин

Выделенные либо из мозга, либо из кишечника; иммунореактивность обнаружена и во втором органе

Вазоактивный кишечный полипептид

Панкреатический полипептид и мотилин

Энкефалины и эндорфины

Бомбезиноподобная иммунореактивность

Инсулин

Глюкагон

лялось систематизации различных молекул и установлению их физиологического эффекта. Успехи достигнуты лишь при изучении регуляции секреции ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы.

Установлено присутствие на панкреатических ацинарных клетках шести различных классов рецепторов (рис. 52.1). Это рецепторы для 1) мускарино-

Таблица 52.4. Множественные формы желудочно-кишечных гормонов

Гормон	В ткани	В плазме
Секретин	27 аминокислот (C27)	C27
Гастрин	Большой предшественник	
	34 аминокислоты (Г34)	Г34
	17 аминокислот (Г17)	Г17
	14 аминокислот (Г14)	Г14
Холецистокинин	Большой предшественник	
	39 аминокислот (ХЦК39)	
	33 аминокислоты (ХЦК33)	
	12 аминокислот (ХЦК12)	ХЦК12
	8 аминокислот (ХЦК8)	ХЦК8
	4 аминокислоты (ХЦК4)	
Желудочный ингибиторный полипептид	Большой предшественник	Большая форма
	43 аминокислоты (ЖИП43)	ЖИП43
Соматостатин	Прогормон с мол. массой 11 500	
	28 аминокислот	
	14 аминокислот	

Таблица 52.5. Аминокислотные последовательности желудочно-кишечных пептидов¹⁾. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Grossman M. I.: The gastrointestinal hormones: An overview. On Endocrinology. James V.H.T. (editor) Excerpta Medica 1977.)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ХЦК	Гастрин	ЖИП	Глюкагон	Секретин	ВИП	Мотилин	Вещество Р	Бомбезин	Соматостатин
Tyr		Tyr	His	-	-	Phe	Arg	(pyro)Glu	Ala
Ile		Ala	Ser	-	-	Val	Pro	Gln	Gly
Gln		Glu	Gln	Asp	-	Pro	Lys	Arg	Cys
Gln		Gly	-	-	Ala	Ile	Pro	Leu	Lys
Ala		Thr	-	-	Val	Phe	Gln	Gly	Asn
→Arg	(pyro)Glu	Phe	-	-	-	Thr	Gln	Asn	Phe
Lys	Leu	Ile	Thr	-	-	Tyr	Phe	Gln	Phe
Ala	Gly	Ser	-	-	Asp	Gly	Phe	Trp	-
Pro	-	Asp	-	Glu	Asn	Glu	Gly	Ala	Lys
Ser	Gln	Tyr	-	Leu	Tyr	Leu	-	Val	Thr
Gly	-	Ser	-	-	Thr	Gln	Met-NH ₂	Gly	Phe
Arg	His	Ile	Lys	Arg	-	-		His	Thr
Val	Pro	Ala	Tyr	Leu	-	Met		Leu	Ser
Ser	-	Met	Leu	Arg	-	Gln		Met-NH ₂	Cys
Met	Leu	Asp	-	-	Lys	Glu			
Ile	Val	Lys	Ser	-	Gln	Lys			
Lys	Ala	Ile	Arg	Ala	Met	Glu			
Asn	Asp	Arg	-	-	Ala	Arg			
Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	Val	Asn			
Gln	Ser	Gln	-	-	Lys	-			
Ser	Lys	Asp	-	Arg	Lys	Gly			
Leu	→Lys	Phe	-	Leu	Tyr	Gln			
Asp	→Gln	Val	-	Leu	-				
Pro	Gly	Asn	Gln	-	Asn				
Ser	→Pro	Trp	-	Gly	Ser				
His	→Trp	Leu	-	-	Ile				
→Arg	Leu	-	Met	Val-NH ₂	Leu				
Ile	Glu	Ala	Asp		Asn-NH ₂				
Ser	Glu	Gln	Thr						
Asp	Glu	Gln							
→Arg	Glu	Lys							
→Asp	Glu	Gly							
Tys	Ala	Lys							
Met	Tys	Lys							
→Gly	→-	Ser							
Trp	-	Asp							
Met	-	Trp							
Asp	-	Lys							
Phe-NH ₂	-	His							
		Asn							
		Ile							
		Thr							
		Gln							

¹⁾ Tys — тирозинсульфат, — то же, что в предыдущей колонке, → сайт расщепления с образованием варианта меньшего размера.

вых холинергических агентов; 2) семейства гастрин — холецистокинина; 3) бомбезина и родственных пептидов; 4) семейства физалемин — вещества Р; 5) секретина и вазоактивного кишечного пептида; 6) холерного токсина.

На рис. 52.1 показано, что соответствующие пептид-рецепторные комплексы активируют два разных внутриклеточных механизма. Один из них включает мобилизацию внутриклеточных резервов каль-

ция, а второй — активацию аденилатциклазы и генерацию сАМР. Оба механизма не пересекаются между собой: например, гастрин не изменяет уровень сАМР, а секретин не влияет на содержание внутриклеточного Ca²⁺. Однако в некоторых точках эти системы конвергируют: так, комбинация секретогенов, действующих через разные механизмы, оказывает синергичный эффект на секрецию ферментов.

Пептиды, вызывающие мобилизацию Ca²⁺ в аци-

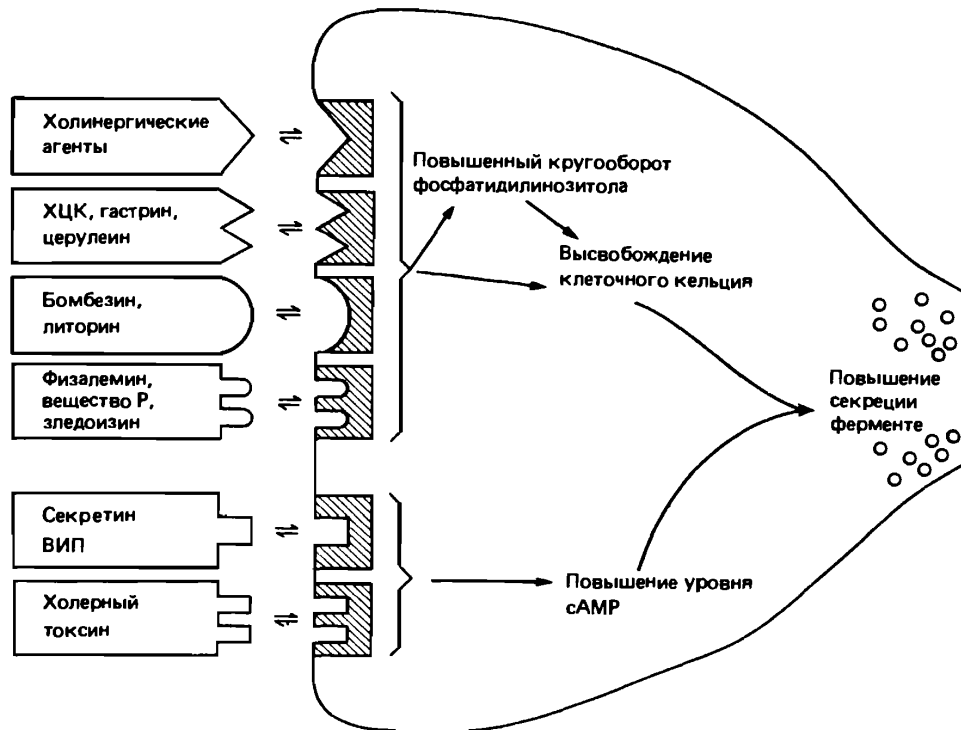


Рис. 52.1. Механизм действия секретогенов на секрецию ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы. Существуют 4 класса рецепторов для секретогенов, которые могут стимулировать мобилизацию клеточного кальция, и 2 класса рецепторов для секретогенов, способных активировать аденилатциклазу и повышать продукцию cAMP клетками. Взаимодействие этих двух путей описано в тексте.

нарных клетках поджелудочной железы, влияют также на метаболизм фосфатидилинозитола и усиливают его превращение в диацилглицерол и различные инозитолфосфаты. Эти эффекты предшествуют изменениям мобилизации Ca^{2+} и, таким образом, могут быть отнесены к первичному ответу. Они сочетаются с деполяризацией ацинарных клеток, которая может играть роль в секреции амилазы. Молекулярная основа cAMP-опосредованной секреции пока неясна. Конвергенция в действии на секрецию амилазы cAMP и Ca^{2+} , с одной стороны, и фосфолипидов — с другой, во многих отношениях аналогична взаимодействию других факторов, обсуждавшемуся в гл. 44.

СЕМЕЙСТВО СЕКРЕТИНА

Секретин

Секретин — пептид из 27 аминокислотных остатков — синтезируется и секретируется S-клетками двенадцатиперстной кишки и проксимального отдела тощей кишки в ответ на закисление дуоденального содержимого. Он содержит 4 аргининовых и один гистидиновый остаток и имеет основную реакцию. 14 из 27 его аминокислот идентичны таковым в глюкагоне. Секретин близок по структуре и к ЖИП, и к VIP (табл. 52.5). Для стимуляции секре-

ции бикарбоната и воды поджелудочной железой необходима полная 27-членная структура пептида.

Желудочный ингибиторный полипептид

Желудочный ингибиторный полипептид (ЖИП) представляет собой 43-членный пептид, высвобождаемый слизистой двенадцатиперстной и тощей кишок в ответ на глюкозу. Хотя этот пептид ингибирует сокращение желудка и желудочную секрецию, его основное действие состоит в стимуляции секреции инсулина. ЖИП, вероятно, служит физиологическим стимулятором В-клеток, причем этот эффект проявляется только в условиях гипергликемии.

Вазоактивный интестинальный полипептид

Вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП) — это основной 28-членный пептид, физиологическая роль которого неясна. Он присутствует в нервах подслизистого сплетения, миозентерального сплетения и кровеносных сосудов и может играть роль в регуляции моторики кишечника, расслабления сфинктера и кровотока. В высоких концентрациях ВИП стимулирует секрецию поджелудочной железы и тонкого кишечника. Опухоли, образующие этот пептид (ВИПомы), вызывают синдром водной диареи, гипокалиемии и ахлоргидрии.

Глюкагон

Глюкагон — последний член данного семейства; его химическая природа и действие обсуждались выше. Он образуется А-клетками желудка и двенадцатиперстной кишки, а также панкреатическими А-клетками.

СЕМЕЙСТВО ГАСТРИН—ХОЛЕЦИСТОКИНИН

Гастрин продуцируется G-клетками, локализованными в слизистой антральной части желудка и в меньшем количестве — в слизистой двенадцатиперстной кишки. Он более гетерогенен по размерам молекул и количеству форм, чем какой-либо другой желудочно-кишечный гормон (табл. 52.4). Кроме того, каждая из форм гастрин существует в сульфированном и несulfированном виде (по единственному остатку тирозина; табл. 52.5). С-концевые 14 аминокислот в гастрине 34, гастрине 17 и гастрине 14 идентичны. Гастрин 34 присутствует в крови в большем количестве, чем гастрин 17. Вероятно, это объясняется тем, что период его полужизни в плазме (15 мин) в 5—7 раз превышает таковой для гастрин 17. Последний, по-видимому, выступает в роли главного стимулятора секреции кислоты желудком, которая регулируется по механизму отрицательной обратной связи, так как закисление содержимого антральной области желудка снижает секрецию гастрин. Гастрин также стимулирует секрецию пепсина и вызывает гипертрофию слизистой желудка. За биологическую активность ответствен С-конец гормона, С-концевой пентапептид вызывает полный спектр физиологических эффектов гастрин 17, но в расчете на единицу массы обладает лишь 1/10 его биологической активности.

Гомология между гастрином и холецистокинином особенно выражена в их С-концевой области: последние 5 аминокислот обеих молекул идентичны (табл. 52.5). Оба пептида содержат сульфированный остаток тирозина, но для активности гастрин (стимуляция секреции кислоты и пепсина желудком) этот остаток несущественен, тогда как для максимальной активности холецистокинина (стимуляция секреции панкреатических ферментов и сокращений желчного пузыря) требуется С-концевой фрагмент из 7 аминокислот, содержащий сульфированный тирозин.

Секретирующие гастрин опухоли (гастриномы) сопровождаются избыточной продукцией кислоты желудком и возникновением плохо поддающихся лечению пептических язв желудка. С-концевой пентапептид (пентагастрин) стимулирует секрецию кальцитонина и применяется при тестировании медуллярного рака щитовидной железы.

Холецистокинин (ХЦК) существует минимум в 5 молекулярных формах (табл. 52.4), из которых в крови содержится в самом большом количестве

и наиболее активен ХЦК8. Холецистокинин образуется I-клетками слизистой двенадцатиперстной кишки и проксимального отдела тощей кишки и секретируется при действии пептидов, аминокислот, длинноцепочечных жирных кислот, кальция и кислоты. Его физиологический эффект заключается в стимуляции сокращений желчного пузыря и секреции панкреатических ферментов. Подобно всем другим желудочно-кишечным пептидам, он характеризуется многочисленными дополнительными активностями, из которых наиболее загадочной является способность вызывать ощущение сытости (ХЦК8 обнаружен в мозге).

ДРУГИЕ ПЕПТИДЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Из тканей желудочно-кишечного тракта выделены и некоторые другие пептиды, которые, по-видимому, участвуют в регуляции пищеварения (вероятно, с помощью паракринного или нейрокринного механизма, поскольку в крови они в заметных количествах не обнаружены). Следует подчеркнуть, что ни для одной из этих молекул пока не установлена определенная физиологическая роль.

Вещество Р было первым пептидом, обнаруженным в кишечнике и мозге. Для активности этого 11-членного пептида, которая проявляется в стимуляции сокращений гладкой мускулатуры кишечника, необходимы 5 С-концевых аминокислот. Бомбезин найден в коже лягушки, но сходный с ним пептид, часто называемый гастрин-рилизинг-пептидом (ГРП) выделен из эндокринных клеток кишечника, нейронов кишечника и из мозга. Аминокислоты в положениях 5—14 бомбезина аналогичны аминокислотам 18—27 гастрин-рилизинг-пептида, за исключением одного остатка. Бомбезин стимулирует желудочную и панкреатическую секрецию и увеличивает подвижность желчного пузыря и кишечника. Этот пептид может оказывать и рост-стимулирующее аутокринное действие на мелкоклеточную карциному легких. Мотилин представляет собой 22-членный пептид, образующийся в слизистой кишечника. Он повышает секрецию кислоты и пепсина слизистой желудка и, кроме того, стимулирует сокращение гладких мышц кишечника. Соматостатин продуцируется D-клетками желудка и ингибирует (посредством паракринного действия) секрецию гастрин, секретин, холецистокинина, мотилина и желудочного ингибиторного полипептида. Глюкагон образуется в А-клетках слизистой желудка. Вполне возможно его участие в метаболическом действии панкреатического глюкагона. Другие пептиды с глюкагоноподобной иммунореактивностью (ГЛП) выделены из L-клеток подвздошной и толстой кишок. Основной компонент ГЛП — это большой пептид, состоящий из 100 аминокислот, называемый глицинтином

и точно соответствующий по аминокислотной последовательности панкреатическому глюкагону. Глицентин может имитировать действие глюкагона. **Нейротензин** (13-членный пептид), **мет-** и **лей-энкефалины**, а также **серотонин** найдены в клетках кишечника и могут проявлять активность в его тканях. Около 40 пептидов обнаружено в нервных тканях, и весьма вероятно, что еще большее количество желудочно-кишечных пептидов ждет своего открытия.

ЛИТЕРАТУРА

Bloom S. R., Polak J. M. Gut Hormones, 2nd ed., Churchill Livingstone, 1981.

Boden G. Gastrointestinal hormones, Pages 1175 –1190. In: Endocrinology and Metabolism, Felig P. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1981.

Buchanan K. D. Gastrointestinal hormones: General concepts, Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 8, 249.

Chen W. Y., Gutierrez J. G. The endocrine control of gastrointestinal function, Adv. Intern. Med., 1978, 23, 61.

Gardner J. D., Jensen R. T. Gastrointestinal peptides: The basis of action at the cellular level, Recent Prog. Horm. Res., 1983, 39, 211.

Walsh J. H. Gastrointestinal hormones and peptides. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Johnson L. R. (ed.), Raven Press, 1981.

Раздел VI

Частные вопросы

Глава 53

Питание, пищеварение и всасывание

Путер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Наука о питании призвана качественно и количественно оценить пищевые потребности, удовлетворение которых необходимо для сохранения здоровья. Главный вклад в понимание современных концепций питания вносит биохимия обмена веществ (ей посвящены предыдущие главы книги). Переваривание и всасывание пищи служат звеном между питанием и метаболизмом.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Выраженная пищевая недостаточность в большинстве развитых стран встречается редко, хотя определенная степень такой недостаточности может наблюдаться у неимущих или пожилых людей, в группах с особыми потребностями в питании (дети, беременные или кормящие матери, больные и выздоравливающие, алкоголики), а также у лиц, потребляющих ограниченное количество пищи по желанию или в силу необходимости. В развивающихся странах различные виды выраженной пищевой недостаточности распространены более широко, например недостаточность белка (**квашиоркор**), витаминов (витамина А при **ксерофтальмии**), минеральных веществ (недостаток железа, вызывающий **анемию**) и энергии (**голодание**). До недавнего времени переизбыток ассоциировался только с ожирением, но сейчас все более широкое признание получает концепция о связи избыточного потребления отдельных пищевых веществ с возникновением определенных заболеваний: атеросклероза, ишемической болезни сердца, диабета, рака молочной железы и толстого кишечника, заболеваний сосудов мозга и инсультов, цирроза печени. Нарушение всасывания пищевых веществ или дефекты в системе пищеварительных ферментов также приводят к развитию пато-

логических состояний. Например, нарушение всасывания витамина B_{12} и фолата вызывает **анемию**; нарушение всасывания кальция, магния и витамина D приводит к **тетании** и **остеопорозу**; наконец, **общий синдром нарушения всасывания** включает как эти, так и другие расстройства. При недостаточности лактазы нарушается **толерантность к молоку**, а дефекты всасывания нейтральных аминокислот характеризуют **болезнь Хартнупа**.

ПИТАНИЕ

В табл. 53.1 суммированы данные о потребности в пищевых веществах.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПОТРЕБНОСТИ

Снабжение энергией

Организм млекопитающих должен получать столько питательных веществ, чтобы их свободная энергия обеспечила суточную потребность в макроэнергетических фосфатах (в основном АТФ) и восстанавливающих эквивалентах (2H), которые необходимы для осуществления всех функций организма (см. рис. 16.1). Питательные вещества поступают в виде углеводов, жиров и белков в соотношениях, широко варьирующих в разных группах населения. Алкоголь также может служить источником энергии. Постоянная масса тела в условиях неизменной потребности в энергии указывает на достаточное поступление ее с пищей.

Количество усвояемой энергии, содержащееся в основных питательных веществах, приведено в табл. 53.2. Следует отметить, что 1 г жира постав-

Таблица 53.1. Потребности в основных компонентах пищи

	Человек	Другие виды
Аминокислоты	Гистидин ¹⁾ , изолейцин, лизин, метионин (цистеин ³⁾), фенилаланин (тирозин ³⁾), треонин, триптофан, валин	Растущие крысы нуждаются в аргинине ²⁾ . Глицин требуется для цыплят, таурин — для кошек. Жвачные могут обходиться без большинства аминокислот; потребность в них других травоядных удовлетворяется за счет функционирования микроорганизмов кишечника
Жирные кислоты	Линолевая кислота (арахидоновая кислота ³⁾), α-линоленовая кислота ⁴⁾	Специфическая потребность в арахидоновой кислоте существует у кошек
Витамины		
Водорастворимые	Аскорбиновая кислота (С), биотин ⁵⁾ , кобаламин (В ₁₂), фолевая кислота, ниацин, пантотеновая кислота, пиридоксин (В ₆), рибофлавин (В ₂), тиамин (В ₁)	Большинство млекопитающих способны синтезировать аскорбиновую кислоту, но у приматов, морских свинок и индийских крыланов она должна присутствовать в пище. Водорастворимые витамины для жвачных не обязательны; потребность в них других травоядных удовлетворяется за счет микроорганизмов кишечника
Жирорастворимые	Витамины А, D ⁶⁾ , Е, К ⁵⁾	Большинство видов способны использовать β-каротин в качестве источника витамина А (ретинола); кошки должны получать его в виде ретинола
Минералы		
Макроэлементы	Кальций, хлорид, магний, фосфор, калий, натрий	
Микроэлементы (следовые элементы)	Хром, медь, йод, железо, марганец, молибден, селен, цинк	Кремний, ванадий, никель, мышьяк, фторид и олово важны для различных видов и могут требоваться для человека. Кобальт необходим для синтеза кобаламина микроорганизмами рубца
Волокна	Требуются для здоровья	
Вода	Самый необходимый компонент диеты	
Энергия	Использование углеводов, жиров и белков в различных соотношениях	

¹⁾ Требуется для младенцев и, вероятно, для детей и взрослых.²⁾ Может быть отчасти незаменим для младенцев.³⁾ Цистеин, тирозин и арахидоновая кислота удовлетворяют потребность в метионине, фенилаланине и линолевой кислоте соответственно.⁴⁾ Существуют разногласия по поводу необходимости присутствия α-линоленовой кислоты в диете человека.⁵⁾ Синтезируется микроорганизмами кишечника, поэтому потребность в нем неопределенна⁶⁾ При действии солнечного света на кожу пищевая потребность в витамине уменьшается.

Таблица 53.2. Теплота сгорания и энергия, усваиваемая из главных пищевых источников. (Adapted from Davidson S. et al. Human Nutrition and Dietetics, 7th ed. Churchill Livingstone, 1979.)

	Энергия, ккал/г (кДж/г)		
	теплота сгорания (бомбовый калориметр)	окисление у человека	стандартные факторы конверсии ¹⁾
Белки	5,4 (22,6)	4,1 (17,2) ²⁾	4 (17)
Жиры	9,3 (38,9)	9,3 (38,9)	9 (38)
Углеводы	4,1 (17,2)	4,1 (17,2)	4 (17)
Этанол	7,1 (29,7)	7,1 (29,7)	7 (29)

¹⁾ Факторы конверсии получают путем округления данных о теплоте сгорания и внесения в них поправки на эффективность всасывания.²⁾ Окисление белков с поправкой на потерю аминокрупп, выделяющихся с мочой.

ляет энергии гораздо больше, чем соответствующие количества белков и углеводов; много энергии содержится и в алкоголе. В табл. 53.3 представлены сведения о рекомендуемом для человека уровне потребления энергии.

РАСХОД ЭНЕРГИИ

В условиях энергетического равновесия (баланса калорий) потребление энергии должно быть равно ее затратам. Расходование энергии в различных условиях варьирует в широких пределах и может быть измерено путем помещения животного в изолированную камеру и определения энергопотерь с теплом и продуктами экскреции. Обычно более удобно оценивать поглощение кислорода, поскольку в большинстве случаев 1 л поглощенного O₂ соответствует примерно 4,83 ккал (20 кДж) затраченной энергии.

Индивидуальный расход энергии зависит от нескольких факторов, среди них:

Таблица 53.3. Рекомендуемое потребление энергии для мужчин и женщин. (Data from Recommended Dietary Allowances, 9th ed. Food and Nutrition Board, National Research Council—National Academy of Sciences, 1980.)

Группа	Возраст (годы)	Масса тела		Потребность в энергии		
		(кг)	(фун- ты)	(ккал)	(мДж)	
				Сред- няя вели- чина	Пределы колебаний	
Мужчины	23—50	70	154	2700	2300—3100	11,3
Женщины	23—50	55	120	2000	1600—2400	8,4
Беремен- ные				+ 300		
Кормящие				+ 500		

1) **основной обмен**, соответствующий затрате энергии на поддержание основных физиологических функций в стандартных условиях (субъект должен быть в состоянии покоя, бодрствовать, находиться в тепле, и измерения должны производиться не менее чем через 12 ч после последнего приема пищи). Основной обмен пропорционален массе тела без жира и поверхности тела. Он больше у мужчин, чем у женщин, повышен у маленьких детей и у лиц с **лихорадкой и гипертиреозом** и снижен при **гипотиреозе и голодании**;

2) **термогенный эффект** (специфическое динамическое действие) пищи. Он составляет примерно 5—10% общей затраты энергии и связан с дополнительным расходом энергии на пищеварение и со стимуляцией метаболизма благодаря притоку нового субстрата;

3) **физическая активность** — фактор, обуславливающий наибольшее и сильно варьирующее расходование энергии; диапазон колебаний энергозатрат между состоянием покоя и максимальной физической активности у спортсменов может достигать 10-кратной величины;

4) **температура окружающей среды**. У животных, обладающих бурым жиром, повышенный расход энергии при низкой температуре обеспечивается теплопродукцией за счет дрожания и других механизмов. При температуре среды, превышающей температуру тела, избыточная энергия тратится на охлаждение организма.

АЗОТ АМИНОКИСЛОТ И ПОТРЕБНОСТЬ В СПЕЦИФИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТАХ

Белок в норме удовлетворяет потребность организма в азоте аминокислот и в самих аминокисло-

тах. Весь белок пищи подвергается перевариванию и поступает в кровоток в виде отдельных аминокислот. Для синтеза специфических белков и других азотсодержащих соединений, таких, как пурины, пиримидины и гем, организму требуется 20 аминокислот. Синтез 9 из них у человека невозможен, это **незаменимые аминокислоты**. Они должны поступать в организм с пищей (табл. 53.1). Еще две аминокислоты, цистеин и тирозин, могут образовываться из незаменимых аминокислот, метионина и фенилаланина соответственно. При недостатке метионина и фенилаланина в пище цистеин и тирозин становятся незаменимыми аминокислотами. И наоборот, если цистеин и тирозин содержатся в рационе в адекватных количествах, они способствуют удовлетворению потребности в метионине и фенилаланине. Пока в диете достаточно незаменимых аминокислот, остальные 9 аминокислот, требующиеся для синтеза белка и других целей, могут образовываться посредством реакций трансминирования.

Азотный баланс (см. также гл. 30)

В условиях метаболического равновесия у взрослых животных белок пищи требуется для возмещения потерь незаменимых аминокислот и аминоказота в ходе их метаболического кругооборота. Потеря азота происходит с мочой, калом, слюной, слущенной кожей, волосами и ногтями. Данные о ежедневной потребности в общем белке и незаменимых аминокислотах у человека представлены в табл. 53.4. При их пересчете на массу тела становится совершенно очевидно, что эта потребность резко увеличена у младенцев и детей. Она возрастает также при беременности, лактации, заживлении ран, выздоровлении и в условиях повышенной физической активности. Для большинства ситуаций адекватной является диета, 12% энергетической ценности которой приходится на белок.

Эффективность использования пищевого белка обуславливает его требуемое количество. Кроме того, это количество зависит от следующих факторов: **качества белка, потребления энергии и физической активности**.

А. Качество белка. Качество (пищевая ценность) белка определяется соотношением доли незаменимых аминокислот в пище с величиной этого показателя при адекватном питании. Чем ближе обе величины, тем выше качество белка. Белки яйца и молока обладают **высокой ценностью**, они эффективно используются организмом и применяются в качестве стандарта при оценке других белков. Высококачественный белок содержится в мясе, а многие растительные белки, используемые как основные источники питания, характеризуются относительным дефицитом некоторых незаменимых аминокислот, например триптофана и лизина (кукуруза, зерно), лизина

Таблица 53.4. Данные о потребности в белке и аминокислотах и их поступлении с пищей. (Data from Recommended Dietary Allowances, 9th ed. Food and Nutrition Board, National Research Council - National Academy of Sciences, 1980.)

	Потребность (мг/кг массы тела в сутки)			Потребление (г в сутки)	
	Младенцы (4—6 мес)	Дети (10— 12 лет)	Взрос- лые	Взрослые (70 кг) нор- ма	Реальное потре- бление у взрослых в США
Белок	2000	1400	800	56	101
Животный	...	...	...	...	71
Растительный	...	...	...	...	30
Незаменимые аминокис- лоты					
Гистидин	33	?	10	0,70	?
Изолейцин	83	28	12	0,84	5,3
Лейцин	135	42	16	1,12	8,2
Лизин	99	44	12	0,84	6,7
Метионин (и цистеин)	49	22	10	0,70	2,1
Фенилаланин (и тиро- зин)	141	22	16	1,12	4,7
Треонин	68	28	8	0,56	4,1
Триптофан	21	4	3	0,21	1,2
Валин	92	25	14	0,98	5,7

(пшеница) и метионина (некоторые бобы). В смешанной диете недостаток какой-либо аминокислоты в одном белке компенсируется ее обилием в другом. Такие белки рассматриваются как комплементарные; например, сочетание белков пшеницы и бобов обеспечивает полноценный набор потребляемых аминокислот. В таких условиях для удовлетворения потребности в белке общее его поступление в организм должно быть увеличено. Аминокислоты, которые не включаются в новообразуемый белок и не являются необходимыми для немедленного удовлетворения потребностей организма, не могут резервироваться, быстро распадаются и выводятся в виде мочевины и других продуктов.

Б. Потребление энергии. Энергия, извлекаемая из углеводов и жиров, влияет на потребность в белке, поскольку она способствует сбережению белка как источника энергии. Для эффективного использования «дорогого» (высокоценного) пищевого белка и для сведения потребности в нем до минимума необходимо обеспечить адекватное поступление энергии из небелковых источников, в частности из углеводов, которые «оберегают» белок от его использования в процессе глюконеогенеза.

В. Физическая активность. Физическая активность повышает задержку азота из пищевого белка.

Белково-энергетическая недостаточность

Понятие белково-энергетической недостаточности включает ряд нарушений, обусловленных голоданием, в которых наряду с дефицитом белка играет роль и дефицит других факторов, таких, как витамины и минеральные вещества. В острой форме эта недостаточность часто наблюдается у детей (обычно до 5-летнего возраста) из слаборазвитых стран Азии, Африки и Южной Америки. Наиболее выраженные ее формы — это **маразм** и **квашиоркор**, описан и ряд других промежуточных нарушений. При маразме имеет место общее истощение вследствие недостаточности как энергии, так и белка, тогда как квашиоркор, характеризующийся отеками, связан с количественным и качественным дефицитом белка, а потребление энергии может быть адекватным.

ПОТРЕБНОСТЬ В УГЛЕВОДАХ

Многие ткани обладают специфической потребностью в глюкозе, которая, однако, не обязательно должна поступать с пищей, поскольку в нее легко превращаются другие пищевые углеводы либо в процессе переваривания (например, крахмал), либо позднее в печени (например, фруктоза, галактоза). Глюкоза образуется и из глицеролового компонента

жиров и из глюкогенных аминокислот в ходе глюконеогенеза. Установлено, что минимальное дневное потребление углеводов должно составлять 50—100 г. Такая доза предотвращает кетоз и потерю мышечного белка у человека. Основные пищевые продукты, содержащие углеводы, рассматриваются в гл. 14.

ПОТРЕБНОСТЬ В ПИЩЕВЫХ ВОЛОКНАХ

Пищевые волокна (клетчатка)—это компоненты стенки растительных клеток, которые не расщепляются ферментами животного организма; к ним относятся целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин, смолы, пектины и пентозаны. У травоядных, в частности у жвачных, волокна (в основном в виде целлюлозы) после их переваривания микроорганизмами служат главным источником энергии.

У людей богатая волокнами диета оказывает благоприятный эффект, способствуя задержке воды при прохождении пищи по кишечнику и формированию благодаря этому объемных мягких фекалий. Такая диета снижает вероятность возникновения **дивертикулоза, рака толстой кишки, сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета**. Волокна с небольшой растворимостью, такие, как целлюлоза и лигнин, содержащиеся в пшеничных отрубях, хорошо действуют на функцию толстой кишки, тогда как более растворимые волокна, присутствующие в овощах и фруктах, например смолы и пектины, снижают уровень холестерина в крови, возможно, благодаря связыванию желчных кислот и холестерина пищи. Растворимые волокна также препятствуют опорожнению желудка, замедляют и снижают подъем уровня глюкозы в крови после приема пищи с последующим уменьшением секреции инсулина. Этот эффект особенно благоприятен для больных диабетом и лиц, находящихся на диете, поскольку в таких условиях степень последующего падения уровня глюкозы в крови (феномен отдачи), которое стимулирует аппетит, уменьшается.

ПОТРЕБНОСТЬ В ЛИПИДАХ

Хотя липиды нередко обеспечивают значительную часть суточной потребности в энергии, это не является их основной функцией.

Пищевые липиды повышают вкусовые качества пищи, обеспечивают состояние насыщения и, кроме того, выполняют еще две важные функции в питании человека. Они действуют как пищевые растворители для **жирорастворимых витаминов** и служат источником **эссенциальных (незаменимых) полиненасыщенных жирных кислот**, синтезировать которые организм не способен. К ним относятся (по крайней мере у некоторых животных) линолевая кислота (ω 6, 18:2), α -линоленовая кислота (ω 3, 18:3) и арахидоно-

вая кислота (ω 6, 20:4). Эти кислоты найдены в составе липидов растительных и животных продуктов (см. табл. 15.2). Обсуждение их метаболизма см. в гл. 24.

У людей арахидоновая кислота образуется главным образом из линолевой кислоты и не является эссенциальной, если линолевая кислота присутствует в пище в достаточном количестве. Продолжаются споры о том, можно ли отнести α -линоленовую кислоту к истинно эссенциальным жирным кислотам для человека. Недостаточность линолевой кислоты встречается редко, вероятность возникновения такого состояния повышается у детей, получающих снятое молоко, и у больных, находящихся на внутривенном обезжиренном питании.

Незаменимые жирные кислоты имеют важнейшее значение как предшественники **лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов** (см. рис. 24.6), функционирующих как «локальные гормоны». Прием пищи, которая обеспечивает удовлетворение 1—2% энергетической потребности незаменимыми жирными кислотами, предотвращает клинические проявления их недостаточности.

Липиды и заболевания. В ходе многочисленных исследований обнаружена корреляция между **ишемической болезнью сердца**, содержанием холестерина в крови и потреблением жиров, особенно насыщенных (см. гл. 27). Высокое потребление жира ассоциируется также с раком молочной железы и толстого кишечника. Основными источниками насыщенных жиров в пище человека служат мясо жвачных животных, молочные продукты и твердый маргарин. Холестерол присутствует только в пищевых продуктах животного происхождения и особенно в яичном желтке.

ПОТРЕБНОСТЬ В ВИТАМИНАХ

Витамины представляют собой органические пищевые вещества, которые требуются для нормального метаболизма в малых дозах и не могут синтезироваться организмом в адекватных количествах. Суточная потребность человека в каждом из витаминов выражается в миллиграммовых или микрограммовых количествах. Витамины выполняют специфические биохимические функции. Эти функции, синдромы недостаточности и пищевые источники витаминов суммированы в табл. 53.5 (для **водорастворимых витаминов**) и в табл. 53.6 (для **жирорастворимых витаминов**).

Водорастворимые витамины включают витамины группы В и аскорбиновую кислоту (витамин С). Водорастворимые витамины всасываются в кровь воротной вены печени, а их избыток выделяется с мочой. Таким образом, создается лишь небольшой резерв свободного витамина, который в большинстве случаев должен постоянно пополняться за счет пи-

Таблица 53.5. Главные водорастворимые витамины. Основные свойства

Витамин	Коферменты	Биохимическая или физиологическая функция ¹⁾	Синдром или симптомы ²⁾ недостаточности (и диета, которая их вызывает)	Источники ³⁾
Ниацин (никотиновая кислота, никотинамид)	Никотинамидадениндинуклеотид (NAD); никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP)	Реакции переноса электронов (водорода), осуществляемые дегидрогеназами, например пируватдегидрогеназой, глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой	Пеллагра (молотое зерно)	Белковая пища, содержащая триптофан, в дополнение к источникам ниацина, перечисленным в сноске ³⁾
Тиамин (витамин B ₁)	Тиаминпирофосфат	Окислительное декарбоксилирование α-кетокислот (пируват- и α-кетоглутарат-дегидрогеназы) и 2-кетосахаров (транскетолазы)	Бери-бери (полированный рис); синдром Вернике—Корсакова (алкоголь). Тиаминаза в сырой рыбе оказывает антагонистический эффект	
Рибофлавин (витамин B ₂)	Флавинадениндинуклеотид (FAD); флавиномононуклеотид (FMN)	Реакции переноса электронов (водорода) (например, ацил-CoA-дегидрогеназа)	Хилез	
Пантотеновая кислота	CoA	Реакции переноса ацильной группы, включающие CoA, синтазный комплекс CoA или жирных кислот		
Витамин B ₆ , пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин	Пиридоксальфосфат	Трансаминирование и декарбоксилирование через шиффово основание (многие аминотрансферазы и декарбоксилазы)	Низкий уровень в сыровотке при беременности и приеме оральных контрацептивов. Антагонисты — изониазид, пеницилламин и другие лекарственные средства	
Биотин	N-карбоксибиотиниллизин	Реакции переноса CO ₂ , осуществляемые коферментами карбоксилаз (например, пируваткарбоксилазы, ацетил-CoA-карбоксилазы)	Вызывается авидином, белком сырого яичного белка, или лечением антибиотиками	Синтезируется микроорганизмами кишечника
Витамин B ₁₂ (кобаламин)	Метилкобаламин; 5'-дезоксиденозилкобаламин	Метилирование гомоцистеина в метионин; превращение метилмалонил-CoA в сукцинил-CoA	Мегалобластическая анемия, метилмалонатацидурия, периферическая нейропатия (строго вегетарианская диета). Пернициозная анемия, вызываемая отсутствием внутреннего фактора	Животная пища (например, мясо)

Витамин	Коферменты	Биохимическая или физиологическая функция ¹⁾	Синдром или симптомы ²⁾ недостаточности (и диета, которая их вызывает)	Источники ³⁾
Фолиевая кислота (фолацин)	Производные тетрагидрофолиевой кислоты	Реакции переноса одноуглеродных остатков, например синтез пуриновых нуклеотидов и тимидилата	Мегалобластическая анемия	
Аскорбиновая кислота (витамин С)	Неизвестны	Антиоксидант; биосинтез коллагена; катаболизм тирозина (?)	Цинга (недостаток свежих фруктов и овощей)	Свежие фрукты (особенно цитрусовые) и овощи

¹⁾ Метаболизм большинства водорастворимых витаминов имеет общие черты. Они всасываются в кишечнике, запасаются в связанном с ферментами или транспортными белками виде и выделяются с мочой, когда их уровень в плазме превышает почечный порог. Единственным важным исключением является витамин В₁₂, для всасывания которого в дистальном отрезке подвздошной кишки требуется внутренний фактор (синтезируемый париетальными клетками желудка); этот витамин хранится в печени в миллиграммовых количествах, выделяется с желчью (и реабсорбируется через энтерогепатическую циркуляцию) и с мочой.

²⁾ Избыток водорастворимых витаминов не всегда токсичен. Исключения: избыток никотиновой кислоты (но не никотинамида) приводит к расширению сосудов кожи (покраснению лица); сообщалось, что прием больших доз аскорбиновой кислоты вызывает понос, образование оксалатных почечных камней и ряд других вредных симптомов; высокие дозы пиридоксина (5 г в сутки) вызывают сенсорную атаксию, дисфункцию сенсорных нервов и в редких случаях — дегенерацию аксонов. Дефицит этих витаминов сказывается на тканях с активным метаболизмом; симптомы обычно включают поражения пищеварительной и нервной системы, кожи и клеток крови.

³⁾ За некоторыми исключениями, потребность в водорастворимых витаминах покрывается приемом адекватных количеств следующих пищевых продуктов: цельные зерна хлебных злаков, бобовые, овощи с зелеными листьями, мясо и молочные продукты.

щи. Некоторый запас фолиевой кислоты содержится в печени. Истощение резервов может наступить через несколько месяцев для аскорбиновой кислоты и через несколько лет для витамина В₁₂ (также запасаемого в печени). Избыток витаминов этой группы в общем переносится хорошо, не считая побочных эффектов при введении больших доз никотиновой кислоты, аскорбиновой кислоты или пиридоксина.

Всасывание витамина В₁₂ требует присутствия **внутреннего фактора**, гликопротеина, секретируемого желудком. У больных, перенесших гастроэктомию и не получающих парентерально витамин В₁₂, примерно через 5 лет могут развиваться симптомы его недостаточности. Витамин В₁₂ отсутствует в растительной пище, но он секретируется микроорганизмами, обнаруживаемыми в кишечной флоре травоядных животных, в частности жвачных, мясо и молоко которых содержат этот витамин. Таким образом, основным источником витамина В₁₂ служат продукты животного происхождения. У вегетарианцев, не получающих соответствующие добавки, существует риск развития недостаточности витамина В₁₂. Поскольку большинство водорастворимых витаминов входит в состав одних и тех же пищевых продуктов, недостаточность одного из них отмечается редко, и у большинства больных наблюдаются симптомы множественного дефицита витаминов группы В.

Жирорастворимые витамины (А, D, Е и К) присут-

ствуют в липидах пищевых продуктов как животного, так и растительного происхождения. Они перевариваются с жиром, всасываются в кишечнике и включаются в хиломикроны. Вслед за этим витамины данной группы переносятся (главным образом в составе хиломикроновых ремнантов) в печень, в которой сосредоточены основные запасы витаминов А, D и К. Главным местом резервирования витамина Е служит жировая ткань. Жирорастворимые витамины не выделяются с мочой, а их избыток в организме оказывает токсический эффект (в особенности избыток витаминов А и D).

Недостаточность жирорастворимых витаминов (в частности, витамина D, вызывающая **рахит**) наблюдается в основном у детей. Однако она может развиваться и у взрослых (**остеомаляция**), в особенности в сочетании с нарушениями всасывания липидов. Некоторые болезни, связанные с метаболизмом кофакторов, поддающиеся лечению специфическими витаминами, перечислены в табл. 53.7.

ПОТРЕБНОСТЬ В МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ

Минеральные вещества, необходимые для осуществления физиологических функций, могут быть произвольно разделены на 2 группы: 1) **макроэлементы**, которые требуются в количествах, превы-

Таблица 53.6. Главные жирорастворимые витамины. Основные свойства

Витамин провита- мин ¹⁾	Метаболизм ²⁾	Активный метаболит: фи- зиологическая функция	Болезнь или симп- томы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симп- томы, вызванные токсичностью	Источники
Витамин А Провита- мин: β-ка- ротин Витамин: ретинол	Транспортируется в лимфу в виде ретиновых эфи- ров; в крови свя- зан с ретинол-свя- зывающим бел- ком и преальбу- мином	11-Цис-ретиноль — компонент родоп- сина и других вос- принимающих свет пигментов. Неизвестные ме- таболиты (рети- новая кислота?) требуются для ро- ста и дифференци- ровки эпителиаль- ной, нервной и костной тканей	Дети: плохая темновая адаптация, сухость ко- жи, керато- маляция, нарушение роста, смерть Взрослые: ноч- ная слепос- та, ксеро- дермия	Гипервитаминоз А: головная боль, голо- вокруже- ние, тошнота, шелушение кожи. боли в костях	Сильно окра- шен- ные овощи (содер- жащие кароти- ны), твер- дый марга- рин
Витамин D Провитами- ны: эрго- стерол (растения, дрожжи) и 7-де- гидрохоло- стерол (кожа)	Провитамины превра- щаются в витами- ны под действием ультрафиолетово- го облучения. Ви- тамины гидрокси- лируются в печени с образованием 25-гидроксивита- мина D и в почках с образованием 1,25-дигидрокси- витамина D и дру- гих метаболитов	1,25-дигидроксивита- мин D — основной гормональный ре- гулятор обмена минеральных ве- ществ (кальция и фосфора) в ко- стях	Дети: рахит Взрослые: остеомаля- ция	Гипервитаминоз D: гиперка- льциемия, гиперкаль- циурия, не- фрокальци- ноз	Обогащен- ное моло- ко, со- лнеч- ное облу- чение кожи
Витамины D₂ (эргокаль- циферол) и D ₃ (хо- лекаль- циферол)					
Витамин Е Токоферо- лы, токо- триенолы	Изучен недостаточно	Активный метаболит неизвестен. Вы- полняет функции антиоксиданта	Дети: анемия у недо- ношенных младенцев Взрослые: известных синдромов нет	Не установле- ны. Прием больших доз ухуд- шает зрение («туман» в глазах), вызывает головные боли	Основным источ- ником являют- ся ра- стите- льные масла
Витамин К: К ₁ (филлохи- нон), К ₂ (менахи- нон), дру- гие	Изучен недостаточно	Активный метаболит неизвестен, но, возможно, пред- ставляет собой гидрохиноновое производное. Ак- тивирует факторы свертывания кро- ви II, VII, IX и X путем γ- карбоксилирования остатков	Дети: геммо- рагическая болезнь но- ворожден- ных Взрослые: нару- шение свер- тывания крови. Симптомы недостаточ- ности мо-	Могут быть вы- званы ди- спергиро- ванными в воде ана- логами: ге- молитиче- ская ане- мия, пора- жение пече- ни	Синтезируе- тся ки- шеч- ными бактери- ями

Витамин/провитамин ¹⁾	Метаболизм ²⁾	Активный метаболит: физиологическая функция	Болезнь или симптомы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симптомы, вызванные токсичностью	Источники ³⁾
		глутаминовой кислоты; карбоксилирует также костные и почечные белки	гут быть вызваны курариновыми антикоагулянтами и лечением антибиотиками		

¹⁾ Жирорастворимые витамины нерастворимы в воде, но растворяются в жирах и маслах. Они относительно стабильны при обычной температуре варки пищи, но инактивируются ультрафиолетовым светом и при окислении.

²⁾ Для всасывания жирорастворимых витаминов необходимы пищевой жир и желчь; нарушение всасывания или закупорка желчных путей приводят к витаминной недостаточности. В транспорте витаминов участвуют липопротеины или специфические транспортные белки. Хранятся жирорастворимые витамины преимущественно в печени и в некоторой степени — в жировой ткани. Витамины выделяются в желчь и либо реабсорбируются через энтерогепатическую циркуляцию, либо экскретируются с калом. Некоторые метаболиты могут выделяться с мочой.

³⁾ Пищевые источники всех жирорастворимых витаминов включают овощи с зелеными листьями, растительные масла, содержащие жир и мясные продукты, помимо специфических источников, перечисленных в таблице.

Таблица 53.7. Синдромы, поддающиеся лечению витаминами. Примеры специфических нарушений метаболизма витаминных кофакторов, которые поддаются коррекции высокими дозами витаминов. (From: Herman R. H., Stifel F. B., Green H. L. Vitamin-deficient states and other related diseases. In: Disorders of the Gastrointestinal Tract; Disorders of the Liver; Nutritional Disorders. Dietschy J. M. (editor). Crune and Stratton, 1976.)

Витамин	Болезнь	Биохимический дефект
Биотин	Пропионовая ацидемия	Пропионил-СоА-карбоксилаза
Витамин В ₁₂	Метилмалоновая ацидурия	Образование кобаламина кофактора
Фолиевая кислота	Нарушение всасывания фолата	Транспорт фолиевой кислоты
Ниацин	Болезнь Хартнупа	Транспорт триптофана
Пиридоксин (витамин В ₆)	Судороги у младенцев Цистатионинурия Гомоцистинурия	Глутаматдекарбоксилаза (?) Цистатиониназа Цистатионин-синтаза
Тиамин	Гипераланинемия Поддающийся лечению тиамином лактацидоз	Пируватдекарбоксилаза Пируваткарбоксилаза печени

шающих 100 мг в сутки, и 2) **микроэлементы**, суточная потребность в которых не превышает 100 мг. Соответствующие данные приведены в табл. 53.1. В табл. 53.8 суммированы сведения о свойствах макроэлементов, а в табл. 53.9 — о свойствах микроэлементов.

РЕКОМЕНДАЦИИ В ОБЛАСТИ ДИЕТЫ

Все требования к питанию должны быть направлены на предотвращение заболеваний, связанных с пищевой недостаточностью, и на укрепление здоровья. В основе неспособности удовлетворить эти требования почти всегда лежат невежество или экономическая бедность. С другой стороны, некоторые распространенные заболевания связаны с избыточным потреблением каких-то пищевых продуктов. Ожирение обычно отражает избыточное потребление пищи, богатой энергией, и часто сочетается с развитием инсулин-независимого сахарного диабета. Атеросклероз и ишемическая болезнь сердца, как правило, обусловлены приемом пищи, богатой общим и насыщенным жиром. Развитие рака молочной железы, толстого кишечника и простаты коррелирует с высоким потреблением жира. Поражение мозговых сосудов и гипертония ассоциируются с потреблением больших количеств соли.

Во многих странах мира созданы комитеты, которые занимаются разработкой рекомендаций по улучшению диеты человека. Эти рекомендации могут быть суммированы следующим образом: 1) в случае избыточной массы тела общее потребление

Таблица 53.8. Главные макроэлементы. Основные свойства

Элементы	Функции	Метаболизм ¹⁾	Болезнь или симптомы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симптомы, вызванные токсичностью ²⁾	Источники ³⁾
Кальций	Компонент костей, зубов; регуляция функций нервов, мышц	Для всасывания требуется кальций-связывающий белок. Регулируется витамином D, паратгормоном, кальцитонином и др.	Дети: рахит Взрослые: остеомалация. Может играть роль в развитии остеопороза	Встречаются при избыточном всасывании вследствие гипervитаминоза D или при гиперкальциемии, вследствие гиперпаратиреоза, а также при идиопатической гиперкальциемии	Молочные продукты, бобы, овощи с зелеными листьями
Фосфор	Компонент костей, зубов, АТФ, фосфорилированных интермедиатов метаболизма, нуклеиновых кислот	Регуляция всасывания неизвестна (витамин D?). Уровень в сыворотке регулируется реабсорбцией в почках	Дети: рахит Взрослые: остеомалация	Низкое отношение Ca^{2+} : $P_{неорг.}$ в сыворотке стимулирует развитие вторичного гиперпаратиреоза; может возникать резорбция костей	Добавки фосфата к пище
Натрий	Основной катион внеклеточной жидкости. Регулирует объем плазмы, кислотно-щелочное равновесие, функцию нервов и мышц, Na^+/K^+ -АТФазу	Регулируется альдостероном	При нормальной диете неизвестны; возникают при травме или заболеваниях	Гипертония (у предрасположенных лиц)	Пищевая соль
Калий	Основной катион внутриклеточной жидкости; функция нервов и мышц, Na^+/K^+ -АТФаза	Также регулируется альдостероном	Развиваются вторично при болезнях, травме или лечении диуретиками; мышечная слабость, параличи, спутанность сознания	Остановка сердца, язвы тонкого кишечника	

Элементы	Функции	Метаболизм ¹⁾	Болезнь или симптомы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симптомы, вызванные токсичностью ²⁾	Источники ³⁾
Хлорид	Баланс жидкости и электролитов; компонент желудочного сока		Младенцы, получающие обессоленную пищу. Возникают в связи с рвотой, лечением диуретиками, болезнями почек		Пищевая соль
Магний	Компонент костей, зубов; кофактор ферментов (киназ и др.)		Развиваются при нарушении всасывания или поносе, алкоголизме	Угнетение глубоких сухожильных рефлексов и дыхания	Овощи с зелеными листьями (содержащие хлорофилл)

¹⁾ Обычно для всасывания минеральных веществ требуются белки-носители. Всасывание редко бывает полным, на него влияют другие пищевые компоненты и соединения, содержащиеся в пище (например, оксалаты и фитаты, хелирующие двухвалентные катионы). Для транспорта и хранения также необходимы специфические белки. Экскреция минеральных веществ происходит с калом (невсосавшиеся минералы), мочой, потом и желчью.

²⁾ Избыточное потребление минеральных веществ вызывает симптомы отравления. Если не указано особо, подразумеваются тошнота, понос и раздражительность.

³⁾ Потребность в минеральных веществах удовлетворяется при включении в диету адекватных количеств цельных зерен хлебных злаков, бобовых, овощей с зелеными листьями, мяса и молочных продуктов.

энергии должно быть снижено; 2) диета должна включать меньше жиров и больше углеводов; 3) большая часть углеводов должна поступать в организм в виде сложных углеводов и меньшая часть — в виде сахаров; 4) следует употреблять больше полиненасыщенных жиров и меньше — насыщенных жиров; 5) содержание холестерина и соли в диете должно быть минимальным; 6) количество пищевых волокон в рационе необходимо увеличить.

ческих ферментов пищеварительного тракта, которые катализируют гидролиз нативных белков до аминокислот, крахмала — до моносахаридов, триацилглицеролов — до моноацилглицеролов, глицерола и жирных кислот. В ходе этих процессов повышается также усвояемость минеральных веществ и витаминов, входящих в состав пищевых продуктов.

Природа и функции гормонов желудочно-кишечного тракта подробно рассматриваются в гл. 52.

ПИЩЕВАРЕНИЕ

Большинство пищевых веществ поступает в организм в неусвояемой форме, поскольку они не могут всасываться из пищеварительного тракта, пока не распадутся на более мелкие молекулы. Эта дезинтеграция природных пищевых веществ с образованием ассимилируемых форм и составляет процесс пищеварения.

Химические изменения, происходящие при пищеварении, осуществляются под действием гидролити-

ПИЩЕВАРЕНИЕ В ПОЛОСТИ РТА

Переваривающее действие слюны

Слюна, секретируемая слюнными железами, на 99,5% состоит из воды. Она действует как смазывающее средство при жевании и глотании. Добавление к сухой пище воды создает среду для растворения частиц пищи и для начала переваривающего действия гидролаз. При жевании пища измельчается, повышается ее растворимость и увеличивается площадь поверхности, подвергающейся ферментной

Таблица 53.9. Главные микроэлементы (следовые элементы). Основные свойства

Элементы	Функции	Метаболизм	Болезнь или симптомы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симптомы, вызванные токсичностью ¹⁾	Источник ²⁾
Хром	Трехвалентный хром — компонент «фактора толерантности к глюкозе»		Нарушение толерантности к глюкозе; вторичные симптомы при парентеральном питании		
Кобальт	Компонент витамина B ₁₂	Как для витамина B ₁₂	Недостаточность витамина B ₁₂		Продукты животного происхождения
Медь	Оксидазы: цитохром-с-оксидаза, ферроксидоза и др.	Переносится альбумином; связывается церулоплазмином	Анемия (гипохромная, микроцитарная); возникают при недостаточном питании, синдром Менке	Наблюдаются редко; сопутствуют болезни Вильсона	
Иод	Тироксин, трийодтиронин	Хранится в щитовидной железе в составе тиреоглобулина	Дети: кретинизм Взрослые: зоб и гипотиреоз, микседема	Тиреотоксикоз, зоб	Иодированная соль, морепродукты
Железо	Гем-содержащие ферменты (гемоглобин, цитохромы и др.)	Транспортируется в виде трансферрина; хранится в виде ферритина или гемосидерина; теряется со слущивающимися клетками и при кровотечении	Анемия (гипохромная, микроцитарная)	Сидероз; наследственный гемохроматоз	Посуда для приготовления пищи
Марганец	Гидролазы, декарбоксилазы и трансферазы. Синтез гликопротеинов и протеогликанов		У людей неизвестны	Отравление при вдыхании вызывает симптомы нарушения психики и паркинсонизм	
Молибден	Оксидазы (ксантиноксидаза)		Возникают при парентеральном питании		

Элементы	Функции	Метаболизм	Болезнь или симптомы, вызванные недостаточностью	Болезнь или симптомы, вызванные токсичностью ¹⁾	Источник ²⁾
Селен	Глутатионпероксидаза	Синергичный с витамином Е антиоксидант	Некоторые симптомы недостаточности при низком содержании в почве; возникают при парентеральном питании, белково-энергетической пищевой недостаточности	При употреблении в больших дозах вызывает выпадение волос, дерматит и раздражительность	
Цинк	Кофактор многих ферментов: лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, карбоангидразы и др.		Гипогонадизм, нарушение роста, нарушение заживления ран, снижение остроты вкуса и обоняния; вторичные симптомы при энтеропатическом акродерматите, парентеральном питании	Раздражение желудочно-кишечного тракта, рвота	
Фторид ³⁾		Увеличивает твердость костей и зубов	Кариес зубов; остеопороз(?)	Флуороз зубов	Питьевая вода

¹⁾ Избыток минеральных веществ в пище вызывает токсические симптомы. Без специальных указаний подразумевается тошнота, понос и раздражительность.

²⁾ Потребность в минеральных веществах удовлетворяется потреблением адекватными количествами цельных зерен хлебных злаков, бобовых, овощей с зелеными листьями, мяса и молочных продуктов.

³⁾ Фторид важен для роста крыс. Не являясь абсолютно необходимым для человека, он играет важную роль в предотвращении кариеса зубов.

атаке. Слюна, кроме того, играет роль в экскреции некоторых лекарств (например, этанола и морфия), неорганических ионов, таких, как K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , тиоцианат (SCN^-) и иод, а также иммуноглобулинов (IgA).

Слюна обычно имеет pH 6,8, хотя этот показатель может отклоняться в обе стороны от нейтральной величины.

Амилаза слюны осуществляет гидролиз крахмала и гликогена до мальтозы; этот процесс не играет важной роли в организме из-за кратковременности действия фермента на пищу. Слюнная амилаза быстро инактивируется при pH 4,0 (или ниже), так что переваривание пищи, начавшееся в полости рта, вскоре прекращается в кислой среде желудка. У многих животных слюнная амилаза вообще отсутствует. Имеется сообщение о существовании **липазы языка**, секретируемой его дорсальной поверхностью (железы Эбнера).

ПИЩЕВАРЕНИЕ В ЖЕЛУДКЕ

Секрет желудка известен как **желудочный сок**. Это прозрачная бледно-желтая жидкость, содержащая 0,2—0,5% HCl и имеющая pH около 1,0. Желудочный сок на 97—99% состоит из воды, остальное составляют слизь, неорганические соли, пищеварительные ферменты (пепсин и реннин) и липаза.

А. Соляная кислота. Источником HCl являются париетальные клетки желудка. Соляная кислота возникает в ходе реакций, представленных на рис. 53.1. Процесс аналогичен «хлоридному сдвигу», описанному для эритроцитов. Он сходен также с механизмами секреции H^+ почечными канальцами, поскольку в обоих случаях источником H^+ служит H_2CO_3 , образующаяся из H_2O и CO_2 при участии **карбоангидразы**. Прием пищи часто сопровождается выделением щелочной мочи («щелочной поток») в результате образования бикарбоната в процессе секреции соляной кислоты. Выделение H^+ в просвет желудка

представляет собой активный процесс, запускаемый мембранной K^+ -АТФазой, которая в отличие от Na^+/K^+ -АТФазы нечувствительна к убаину. HCO_3^- поступает в плазму в обмен на Cl^- , и этот процесс сопряжен с секрецией H^+ в просвет желудка.

При контакте с HCl белки в желудке денатурируются, утрачивая третичную структуру в результате разрушения водородных связей. Это обуславливает раскручивание полипептидной цепи и увеличивает доступность белка для действия протеолитических ферментов (протеаз). Низкий pH вызывает также разрушение большинства микроорганизмов, поступающих в желудочно-кишечный тракт.

Б. Пепсин. Основная пищеварительная функция желудка заключается в том, что в нем начинается переваривание белка. Пепсин продуцируется главными клетками в виде неактивного зимогена, **пепсиногена**. Пепсиноген активируется в пепсин ионами H^+ , которые отщепляют защитный полипептид, «раскрывая» активный пепсин, а также самим пепсином, вызывающим быструю активацию дополнительных молекул пепсиногена (**аутокатализ**). Пепсин преобразует денатурированный белок в протеозы и затем в пептоны — большие полипептидные производные. Он представляет собой **эндопептидазу**, поскольку осуществляет гидролиз пептидных связей в составе главной полипептидной структуры, а не N- или C-концевых последовательностей, что характерно для **экзопептидаз**. При этом фермент специфически атакует пептидные связи, образуемые с участием ароматических аминокислот (например, тирозина) или дикарбоновых аминокислот (например, глутамата).

В. Реннин (химозин, сычужный фермент). Этот фермент вызывает створаживание молока. Он чрезвычай-

но важен для процессов пищеварения у младенцев, поскольку предотвращает быстрый выход молока из желудка. В присутствии кальция реннин вызывает необратимые изменения казеина молока, превращая его в **параказеин**, который затем подвергается действию пепсина. В желудке взрослых людей реннин, по-видимому, отсутствует. Он используется при производстве сыра.

Г. Липаза. Теплая среда желудка важна для перевода в жидкое состояние основной массы пищевых липидов; происходит их эмульгирование, которому способствуют перистальтические сокращения желудка. Хотя в желудке присутствует липаза, способная гидролизовать триацилглицеролы с короткой или средней цепью, липолитическое действие желудочного сока не играет существенной физиологической роли. В то же время в желудке при низких значениях pH может продолжаться действие **липазы языка**, которое сохраняется в течение 2—4 ч и способно обеспечить переваривание примерно 30% пищевых триацилглицеролов. Липаза языка более активна в отношении триацилглицеролов, содержащих короткоцепочечные жирные кислоты, и с большей специфичностью атакует эфирную связь в положении *sn*-3, чем в положении 1. В жире молока присутствуют короткоцепочечные жирные кислоты и жирные кислоты со средней длиной цепи, имеющие тенденцию к эстерификации в положении *sn*-3. Таким образом, молочный жир представляет собой особенно хороший субстрат для этого фермента. Высвобождающиеся гидрофильные короткоцепочечные жирные кислоты всасываются стенкой желудка и поступают в воротную вену, тогда как длинноцепочечные жирные кислоты растворяются в жировых каплях.

ПАНКРЕАТИЧЕСКОЕ И КИШЕЧНОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ

Желудочное содержимое, или **химус**, в ходе переваривания периодически поступает в двенадцатиперстную кишку через пилорический клапан. Панкреатический и желчный протоки открываются в двенадцатиперстную кишку в непосредственной близости к пилорусу. Щелочное содержимое секрета поджелудочной железы и желчи нейтрализует химус и сдвигает его pH в щелочную сторону. Этот сдвиг pH необходим для проявления активности ферментов панкреатического и кишечного сока, но он **ингибирует** дальнейшее действие пепсина.

Желчь

Кроме многочисленных функций в межуточном обмене, печень в силу ее способности продуцировать желчь играет важную роль в пищеварении. Желчный пузырь, мешотчатый орган, примыкающий к печеночному протоку, накапливает некоторое количество желчи, образуемой печенью в периоды между

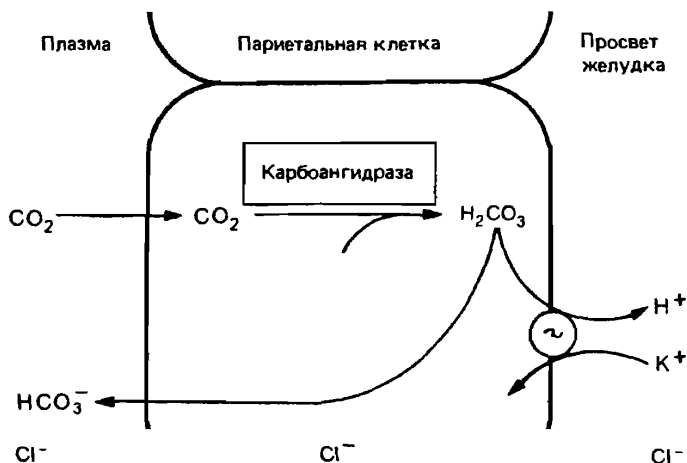


Рис. 53.1. Образование соляной кислоты в желудке. ~, K^+ -АТФаза.

приемами пищи. Во время пищеварения желчный пузырь сокращается и быстро выбрасывает желчь в тонкий кишечник через общий желчный проток. Продукты секреции поджелудочной железы смешиваются с желчью, поскольку попадают в общий желчный проток чуть раньше его впадения в двенадцатиперстную кишку.

А. Состав желчи. Печеночная желчь отличается по составу от желчи, содержащейся в желчном пузыре. Последняя, как показано в табл. 53.10, является более концентрированной.

Б. Функции желчи.

1. Эмульсификация. Соли желчных кислот обладают способностью значительно уменьшать поверхностное натяжение. Благодаря этому они осуществляют эмульгирование жиров в кишечнике, растворяют жирные кислоты и нерастворимые в воде мыла. Присутствие желчи в кишечнике способствует завершению переваривания и всасывания жиров, а также всасыванию жирорастворимых витаминов А, D, Е и К. При нарушении переваривания жира плохо перевариваются также другие пищевые вещества, потому что жир обволакивает частицы пищи и препятствует действию на них ферментов. В этих условиях деятельность кишечных бактерий приводит к активации процессов гниения и образования газа.

2. Нейтрализация кислоты. Помимо своих пищеварительных функций желчь, имеющая рН чуть выше 7, нейтрализует кислый химус, поступающий из желудка, подготавливая его для переваривания в кишечнике.

3. Экскреция. Желчь — важный носитель экскретируемых желчных кислот и холестерина, но она также удаляет из организма многие лекарства, токсины, желчные пигменты и различные неорганические вещества, такие, как медь, цинк и ртуть.

4. Растворимость холестерина в желчи; образование желчных камней. Свободный холестерол нерастворим в воде и, следовательно, включается в мицеллы, образуемые фосфатидилхолином и желчными солями. Более того, фосфатидилхолин, преобладающий фосфолипид желчи, сам по себе нерастворим в водных системах, но он может быть переведен в растворимое состояние желчными солями в составе мицелл. Большие количества холестерина, присутствующие в желчи человека, подвергаются сольubilизации в этих водорастворимых смешанных мицеллах, что обеспечивает перенос холестерина в кишечник через желчный проток. Однако фактическая растворимость холестерина в желчи зависит от соотношения желчных солей, фосфатидилхолина и холестерина. Она зависит также от содержания воды в желчи, что особенно важно в случае разбавленной печеночной желчи.

Используя систему треугольных координат (рис. 53.2), Редингер и Смолл сумели определить максимальную растворимость холестерина в желчи из желчного пузыря человека. Из чертежа видно, что любая точка в этой системе, находящаяся выше кривой ABC, будет представлять желчь такого состава, в которой холестерол окажется либо в состоянии перенасыщенного раствора, либо выпадет в осадок.

Можно полагать, что у больных желчнокаменной болезнью в какой-то период жизни образуется аномальная желчь, перенасыщенная холестерином. С течением времени различные факторы, например инфекция, могут выступать в качестве агентов, провоцирующих выпадение из перенасыщенной желчи избытка холестерина в виде кристаллов. Если новообразованные кристаллы сразу не перенесутся с желчью в кишечник, то они будут расти, образуя камни. Определение активности ключевых ферментов образования желчных кислот в печени пациентов с желчнокаменной болезнью показало, что синтез холестерина у них повышен, а синтез желчных кислот снижен, в результате чего возрастает концентрация холестерина в печени. Снижение активности 7 α -гидроксилазы может приводить к уменьшению энтерогепатического запаса желчных кислот, что служит для печени сигналом к образованию еще больших количеств холестерина. Желчь оказывается перегруженной холестерином, который не может полностью раствориться в смешанных мицеллах.

Основываясь на изложенных выше данных о растворимости холестерина, была сделана попытка разработать способ растворения желчных камней или предотвращения их дальнейшего образования. Применение хенодезоксихолевой кислоты открывает

Таблица 53.10. Состав печеночной и пузырной желчи

	Печеночная желчь (секретируемая)		Пузырная желчь
	Процент от цельной желчи	Процент от общего количества твердых веществ	Процент от цельной желчи
Вода	97,00		85,92
Твердые вещества	2,52		14,08
Желчные кислоты	1,93	36,9	9,14
Муцин и пигменты	0,53	21,3	2,98
Холестерол	0,06	2,4	0,26
Эстерифицированные и неэстерифицированные жирные кислоты	0,14	5,6	0,32
Неорганические соли	0,84	33,3	0,65
Удельный вес	1,01		1,04
рН	7,1—7,3		6,9—7,7

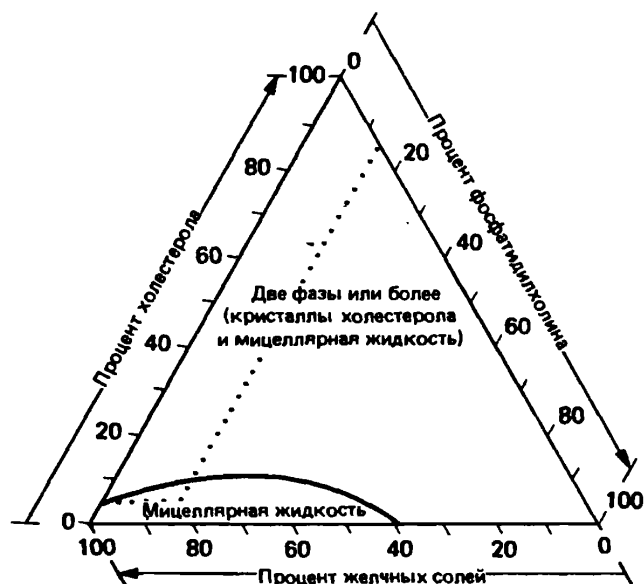


Рис. 53.2. Способ изображения трех основных компонентов желчи (желчные кислоты, фосфатидилхолин и холестерол) в треугольных координатах. Каждый компонент выражен в процентах общего количества (в молях) желчных солей, фосфатидилхолина и холестерола. Кривая отражает максимальную растворимость холестерола в различных смесях желчных солей и фосфатидилхолина. Точка пересечения пунктирных линий соответствует нормальной желчи (5% холестерола, 15% фосфатидилхолина и 80% желчных солей) и находится в зоне однофазной мицеллярной жидкости. Желчь, которая по своему составу располагается выше этой линии, должна содержать избыток холестерола в виде перенасыщенного раствора либо осадка (кристаллы или жидкие кристаллы). (Reproduced, with permission, from Redinger R. N. Small D. M. Bile composition, bile salt metabolism, and gallstones. Arch. Intern. Med., 1972, 130, 620. Copyright © 1972. American Medical Association.)

возможность специфического лечения больных с рентгеноплотными камнями в функционирующем желчном пузыре, поскольку это соединение обладает способностью ингибировать гидроксиметилглутарил (ГМГ)-CoA-редуктазу в печени, что приводит к снижению синтеза холестерола.

5. Метаболизм желчных пигментов. Происхождение желчных пигментов из гемоглобина обсуждается в гл. 33.

Переваривание секретом поджелудочной железы

Секрет поджелудочной железы — это неклеякая водянистая жидкость, сходная со слюной по количеству воды, содержащая белок, а также органические и неорганические ионы (преимущественно Na^+ , K^+ , HCO_3^- и Cl^-) и, кроме того, малые количества Ca^{2+} , Zn^{2+} , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} . Значение pH панкреатического секрета — отчетливо щелочное — 7,5—8,0 или выше.

В секрете присутствуют многие ферменты, некоторые из них секретируются в виде зимогенов.

А. Трипсин, химотрипсин и эластаза. Протеолитическое действие панкреатического секрета обуславливается тремя эндопептидазами — трипсином, химотрипсином и эластазой, которые расщепляют белки и полипептиды, поступающие из желудка, с образованием полипептидов, пептидов или тех и других. Трипсин специфически действует на пептидные связи, образуемые основными аминокислотами, химотрипсин — на связи между остатками незаряженных аминокислот (например, ароматических), в то время как эластаза вопреки своему названию обладает довольно широкой специфичностью, расщепляя связи, примыкающие к остаткам малых аминокислот, таких, как глицин, аланин и серин. Все три фермента секретируются в виде зимогенов. Активация трипсиногена осуществляется другим протеолитическим ферментом, энтерокиназой, секретируемой слизистой кишечника. Она гидролизует лизиновую пептидную связь в зимогене, высвобождая малый полипептид, что приводит к разворачиванию молекулы в активный трипсин. Образовавшийся трипсин действует не только на новые молекулы трипсиногена, но и на другие зимогены панкреатического секрета — химотрипсиноген, проэластазу и прокарбоксипептидазу — с высвобождением соответственно химотрипсина, эластазы и карбоксипептидазы.

Б. Карбоксипептидаза. Дальнейшее расщепление полипептидов, образовавшихся под действием эндопептидаз, осуществляет экзопептидаза — карбоксипептидаза, которая атакует С-концевую пептидную связь, высвобождая одиночные аминокислоты.

В. Амилаза. Крахмал-расщепляющая активность секрета поджелудочной железы обусловлена панкреатической α -амилазой. Она сходна по действию с амилазой слюны и гидролизует крахмал и гликоген с образованием мальтозы, мальтотриозы [три α -глюкозных остатка, связанные $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -связями], а также смеси разветвленных ($1 \rightarrow 6$) олигосахаридов (α -декстрины), неразветвленных олигосахаридов и некоторого количества глюкозы.

Г. Липаза. Панкреатическая липаза действует на поверхности раздела жир—вода тонкоэмульгированных липидных капель, образуемых в кишечнике при механическом перемешивании в присутствии продуктов действия липазы языка, желчных солей, колипазы (белка, присутствующего в секрете поджелудочной железы), фосфолипидов и фосфолипазы A_2 (также входящей в состав панкреатического секрета). Фосфолипаза A_2 и колипаза секретируются в виде про-форм, и для их активации требуется триптический гидролиз специфических пептидных связей. Для проявления активности фосфолипазы A_2 необходим Ca^{2+} . В результате ограниченного гидролиза фосфолипазой A_2 эфирной связи фосфолипидов в положении 2 (см. рис. 25.5) липаза связывается на поверхно-

сти раздела субстрата и происходит быстрый гидролиз триацилглицеролов. Колипаза связывается с поверхностью раздела системы желчная соль — триацилглицерол/вода, образуя высокоаффинный якорь для липазы. Полный гидролиз триацилглицеролов приводит к образованию глицерола и жирных кислот. Заметим, однако, что отщепление второй и третьей жирных кислот от триацилглицеролов происходит с возрастающей трудностью. Панкреатическая липаза в сущности специфична в отношении гидролиза первичных эфирных связей, т.е. связей в положениях 1 и 3 триацилглицеролов. Во время переваривания жира водная, или «мицеллярная», фаза содержит смешанные дисковидные мицеллы и липосомы из желчных солей, насыщенных продуктами липолиза (см. рис. 15.34). Так как гидролиз вторичной эфирной связи в триацилглицероле затруднен, можно предположить, что перевариванию триацилглицерола предшествует удаление терминальных жирных кислот с образованием 2-моноацилглицерола. Поскольку последняя жирная кислота связана вторичной эфирной связью, ее удаление требует изомеризации в первичную эфирную

связь. Это относительно медленный процесс, и поэтому главными конечными продуктами переваривания триацилглицерола оказываются именно 2-моноацилглицеролы и только менее одной четверти переваренного триацилглицерола полностью распадается на глицерол и жирные кислоты (рис. 53.3).

Д. Гидролаза холестеридовых эфиров (холестеролэстераза). В условиях, характерных для просвета кишечника, фермент катализирует гидролиз эфиров холестерина, который затем всасывается из кишечника в неэстерифицированной, свободной форме.

Е. Рибонуклеаза (РНКаза) и дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) получены из ткани поджелудочной железы (см. гл. 38 и 39).

Ж. Фосфолипаза A_2 . Фосфолипаза A_2 гидролизует эфирную связь во 2-м положении глицерофосфолипидов как желчного, так и пищевого происхождения с образованием лизофосфолипидов.

Переваривание секретом кишечника

Кишечный сок, секретируемый железами Бруннера и Либеркюна, также содержит пищеварительные ферменты, в число которых входят:

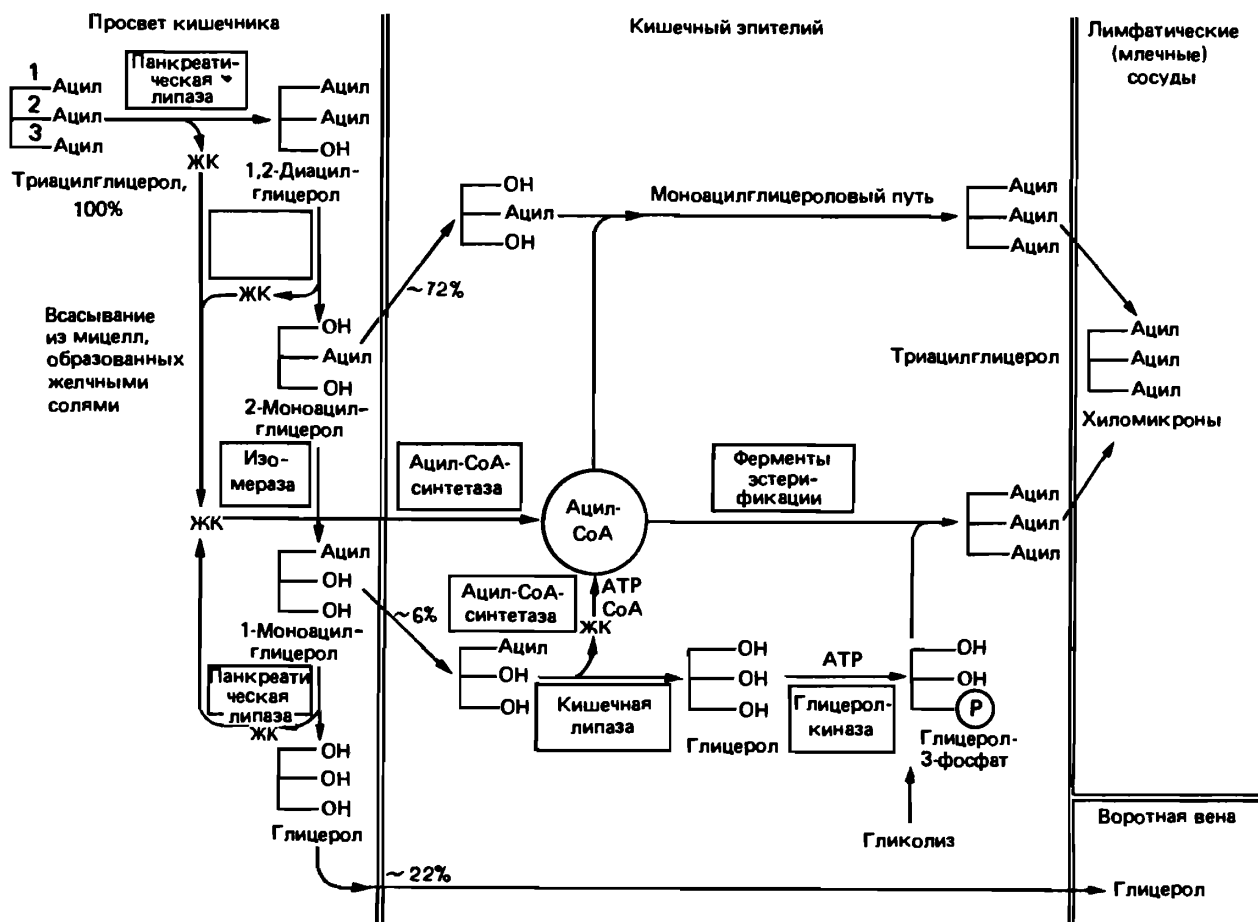


Рис. 53.3. Переваривание и всасывание триацилглицеролов. ЖК — длинноцепочечные жирные кислоты. (Modified from Mattson F. H., Volpenheim R. A. The digestion and absorption of triglycerides. J. Biol. Chem., 1964, 239, 2772.)

1) **аминопептидаза**, представляющая собой экзопептидазу, которая гидролизует пептидные связи за N-концевыми аминокислотами полипептидов и олигопептидов; **дипептидазы** различной специфичности, некоторые из них могут находиться **внутри кишечного эпителия**; они завершают расщепление дипептидов до свободных аминокислот;

2) **специфические дисахаридазы и олигосахаридазы**, такие, как α -глюкозидаза (**мальтаза**), удаляющая единичные глюкозные остатки из $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -связанных олигосахаридов и дисахаридов начиная с нередуцирующих концов, **изомальтаза (α -декстриназа)**, которая гидролизует $(1 \rightarrow 6)$ -связи α -декстринов; β -галактозидаза (**лактаза**), удаляющая галактозу из лактозы; **сахараза**, гидролизующая сахарозу, и **трегалаза**, расщепляющая трегалозу;

3) **фосфатаза**, удаляющая фосфат из некоторых органических фосфатов (гексозофосфаты и глицерофосфат) и из нуклеотидов пищевого происхождения или образующихся из нуклеиновых кислот в результате их переваривания нуклеазами;

4) **полинуклеотидазы**, которые расщепляют нуклеиновые кислоты на нуклеотиды;

5) **нуклеозидазы (нуклеозидфосфорилазы)**, катализирующие фосфоролитическое расщепление нуклеозидов с образованием свободных азотистых оснований и пентозофосфатов;

6) **кишечный секрет**, по-видимому, содержит также **фосфолипазу**, которая действует на фосфолипиды с образованием глицерола, жирных кислот, фосфорной кислоты и оснований, таких, как холин.

Основные продукты переваривания

Окончательный результат действия описанных пищеварительных ферментов заключается в редуцировании компонентов пищи до форм, которые могут всасываться и усваиваться. Этими конечными продуктами переваривания являются для углеводов моносахариды (в основном глюкоза), для белков — аминокислоты, для триацилглицеролов — жирные кислоты, глицерол и моноацилглицерол и для нуклеиновых кислот — основания, нуклеозиды и пентозы.

Полисахариды стенки растительной клетки и лигнин, которые не расщепляются ферментами млекопитающих, составляют **пищевые волокна** и образуют массу, остающуюся после переваривания. Волокна выполняют важную функцию, придавая пище дополнительный объем, что уже обсуждалось в этой главе. Основные пищеварительные процессы суммированы в табл. 53.11.

ВСАСЫВАНИЕ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Всасывание в желудке идет весьма слабо, хотя этанол может усиливать этот процесс.

Наиболее интенсивно переваривание и всасывание осуществляются в тонком кишечнике. Приблизительно 90% переваренных пищевых веществ подвергается всасыванию при прохождении через него; одновременно всасывается и вода. Этот процесс усиливается при поступлении пищи в толстый кишечник, в результате жидкое содержимое тонкого кишечника, попадая в толстую кишку, постепенно становится более твердым.

Транспорт веществ, всасывающихся в кишечнике, осуществляется двумя путями: через **воротную систему печени**, ведущую прямо в печень, и по **лимфатическим сосудам**, сообщаящимся с кровью через грудной лимфатический проток.

ВСАСЫВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Продукты переваривания углеводов всасываются из тощей кишки в кровь портальной венозной системы в форме моносахаридов, главным образом гексоз (глюкозы, фруктозы, маннозы и галактозы) и пентоз. Олигосахариды (соединения, образующиеся из крахмала и дающие при гидролизе 3—10 моносахаридных компонентов) и дисахариды гидролизуются соответствующими ферментами слизистой поверхности тонкого кишечника, в число которых может входить панкреатическая амилаза, адсорбированная на слизистой. Активность свободных дисахаридаз в просвете кишечника невелика. Большая часть их активности ассоциирована с небольшими «выпуклостями» на щеточной каемке эпителиальных клеток кишечника.

Всасывание моносахаридов осуществляется с помощью двух механизмов: **активного транспорта** против градиента концентрации и **простой диффузией**. Однако всасывание некоторых сахаров нельзя четко приписать действию одного из них. Особенности молекулярной конфигурации, которые, по-видимому, необходимы для активного транспорта и которые характерны для глюкозы и галактозы, состоят в следующем: группа OH при 2-м углероде должна иметь такую же конфигурацию, как в глюкозе; должно присутствовать пиранозное кольцо; при 5-м углероде должны находиться метил или замещенная метильная группа. Фруктоза всасывается медленнее, чем глюкоза и галактоза. Этот процесс, по-видимому, протекает путем диффузии по градиенту концентрации.

Таблица 53.11. Обобщающая сводка процессов пищеварения

Источник секрета и стимул секреции	Фермент	Способ активации и оптимальные условия для проявления активности	Субстрат	Конечный продукт действия
Слюнные железы: рефлекторная секреция слюны на присутствие пищи в ротовой полости	Слюнная амилаза	Необходим ион хлора, pH 6,6—6,8	Крахмал Гликоген	Мальтоза плюс 1:6 глюкозиды (олигосахариды) плюс мальтотриоза
Железы языка	Липаза языка	Диапазон pH 2,0—7,5; оптимальное значение 4,0—4,5	Короткоцепочечные первичные эфиры, связь при <i>sn-3</i>	Жирные кислоты плюс 1,2-диацилглицеролы
Железы желудка: главные и париетальные клетки секретируют желудочный сок в ответ на рефлекторную стимуляцию и действие гастрина	Пепсин А (дно желудка) Пепсин В (привратник)	Пепсиноген превращается в активный пепсин под действием HCl, pH 1,0—2,0	Белок	Пептиды
	Реннин	Для проявления активности необходим кальций, pH 4,0	Казеин молока	Створоженное молоко
Поджелудочная железа: поступление кислотного химуса из желудка активирует образование двенадцатиперстной кишкой 1) секретина, который как гормон стимулирует выделение панкреатического сока; 2) холецистокинина, который стимулирует секрецию ферментов	Трипсин	Трипсиноген превращается в активный трипсин под действием энтерокиназы кишечника при pH 5,2—6,0. При pH 7,9 имеет место автокаталитическое превращение	Белок Пептиды	Полипептиды Дипептиды
	Химотрипсин	Секретируется в виде химотрипсиногена и превращается в активную форму под действием трипсина, pH 8,0	Белок Пептиды	Те же, что в случае трипсина. Более сильная способность вызывать створаживание молока
	Эластаза	Секретируется в виде проэластазы и превращается в активную форму под действием трипсина	Белок Пептиды	Полипептиды Дипептиды

Источник секрета и стимул секреции	Фермент	Способ активации и оптимальные условия для проявления активности	Субстрат	Конечный продукт действия
	Карбоксипептидаза	Секретируется в виде прокарбоксипептидазы, активируется трипсином	Полипептиды со свободного С-конца цепи	Более мелкие пептиды Свободные аминокислоты
	Панкреатическая амилаза	pH 7,1	Крахмал Гликоген	Мальтоза плюс 1:6 глюкозиды (олигосахариды) плюс мальтотриоза
	Липаза	Активируется желчными солями, фосфолипидами, колипазой, pH 8,0	Первичные эфирные связи триацилглицеролов	Жирные кислоты, моноацилглицеролы, диацилглицеролы, глицерол
	Рибонуклеаза		Рибонуклеиновая кислота	Нуклеотиды
	Дезоксирибонуклеаза		Дезоксирибонуклеиновая кислота	Нуклеотиды
	Гидролаза холестеринловых эфиров	Активируется желчными солями	Холестеринловых эфиров	Свободный холестерин плюс жирные кислоты
	Фосфолипаза A ₂	Секретируется в виде профермента, активируется трипсином и Ca ²⁺	Фосфолипиды	Жирные кислоты, лизофосфолипиды
Печень и желчный пузырь: холецистокинин (гормон слизистой кишечника) и, возможно, гастрин и секретин — стимулируют желчный пузырь и секрецию желчи печенью	(Желчные соли и щелочи)		Жиры: также нейтрализуют кислый химус	Конъюгаты жирных кислот — желчных солей, тонко эмульгированные мицеллы из нейтрального жира и желчных солей и липосомы
Тонкий кишечник: секреция желез Бруннера в двенадцатиперстной кишке и желез Либержюна	Аминопептидаза		Полипептиды со свободного N-конца цепи	Более мелкие пептиды. Свободные аминокислоты

Источник секрета и стимул секреции	Фермент	Способ активации и оптимальные условия для проявления активности	Субстрат	Конечный продукт действия
	Дипептидазы		Дипептиды	Аминокислоты
	Сахараза	pH 5,0—7,0	Сахароза	Фруктоза, глюкоза
	Мальтаза	pH 5,8—6,2	Мальтоза	Глюкоза
	Лактаза	pH 5,4—6,0	Лактоза	Глюкоза, галактоза
	Трегалаза		Трегалоза	Глюкоза
	Фосфатаза	pH 8,6	Органические фосфаты	Свободный фосфат
	Изомальтаза или 1:6 глюкозидаза		1:6 глюкозиды	Глюкоза
	Полинуклеотидаза		Нуклеиновые кислоты	Нуклеотиды
	Нуклеозидазы (нуклеозидфосфорилазы)		Пуриновые или пиримидиновые нуклеозиды	Пуриновые или пиримидиновые основания, пентозофосфат

ВСАСЫВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ

Щеточная каемка энтероцитов содержит системы переносчиков, многие из которых сходны с переносчиками, присутствующими в мембранах щеточной каемки почек и специализированными в отношении захвата разных аминокислот и сахаров. Постулировано существование переносчика, способного связывать различными своими участками глюкозу и Na^+ и переносить их через плазматическую мембрану кишечной клетки. Можно себе представить, что глюкоза и Na^+ высвобождаются затем в цитозоль, позволяя переносчику захватить новую порцию «груза». Na^+ транспортируется по градиенту концентрации, стимулируя переносчик к транспорту глюкозы против указанного градиента. Свободная энергия, необходимая для этого активного транспорта, образуе-

тся благодаря гидролизу АТФ, связанному с натриевым насосом, который «откачивает» из клетки Na^+ в обмен на K^+ (рис. 53.4). Активный транспорт глюкозы подавляется убаином (сердечным гликозидом), ингибитором натриевого насоса, и флоризином, известным ингибитором реабсорбции глюкозы в почечных канальцах. Соотношение транспортируемых Na^+ и глюкозы может варьировать. Существует также независимый от Na^+ переносчик глюкозы.

Гидролиз полисахаридов, олигосахаридов и дисахаридов происходит быстро; в связи с этим быстро насыщаются абсорбционные механизмы для глюкозы и фруктозы. Исключением является гидролиз лактозы, скорость которого ниже скорости гидролиза сахарозы; этим и объясняется тот факт, что переваривание лактозы не приводит к насыщению транспортных механизмов для глюкозы и галактозы.

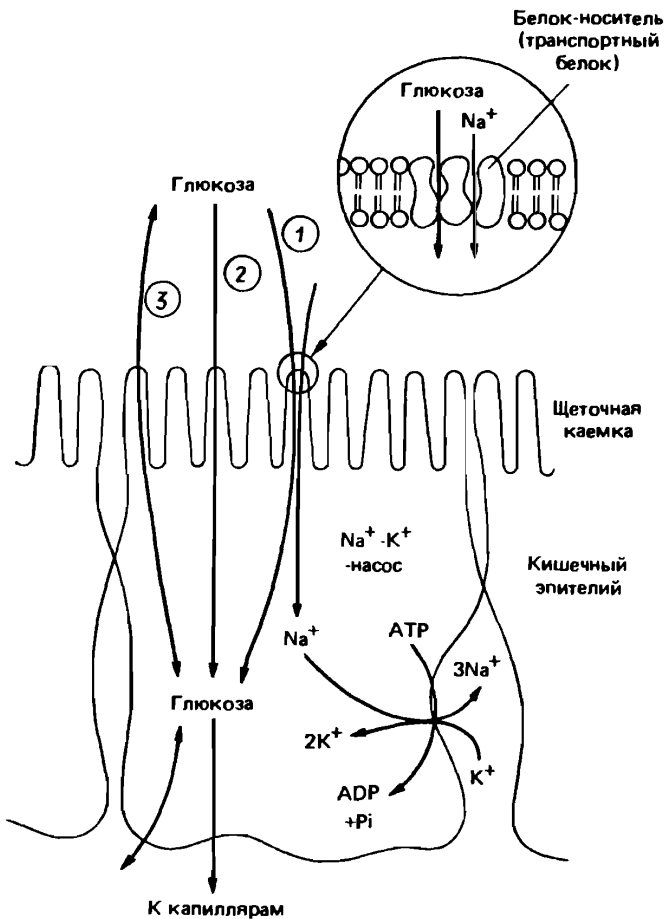


Рис. 53.4. Транспорт глюкозы через кишечный эпителий. Активный транспорт глюкозы сопряжен с Na^+ , K^+ -насосом (1) или с независимой от Na^+ системой (2). Диффузия представлена пунктом 3.

Нарушения (дефекты) в переваривании и всасывании углеводов

А. Недостаточность лактазы. Нарушение толерантности к молочному сахару—лактозе может обуславливаться недостаточностью лактазы. Синдром не следует путать с неусваиваемостью молока, связанной с повышенной чувствительностью к молочным белкам (обычно β -лактоглобулину). Симптомы и в том и в другом случае одинаковы: спазмы в животе, понос и метеоризм. В их основе—накопление лактозы, которая задерживает воду в силу своей осмотической активности, а также действие на сахар ферментов кишечных бактерий, образующих газы и другие продукты, раздражающие кишечник.

Существуют три типа недостаточности лактазы.

1. Наследственный дефицит лактазы. При этом относительно редком синдроме симптомы нарушенной толерантности развиваются очень быстро после рождения. Кормление пищей, не содержащей лактозы, приводит к исчезновению симптомов. Иногда у детей, как будто способных к перевариванию и вса-

сыванию лактозы, после приема молока или лактозы развиваются тяжелые симптомы. Характерной особенностью этого синдрома, который приписывается действию лактозы на кишечник, является присутствие лактозы в моче.

2. Низкая активность лактазы вторичного характера. Неусваиваемость молока нередко бывает следствием кишечных заболеваний. Примерами служат тропическая и нетропическая формы спру, квашиоркор, колит и гастроэнтерит. Это нарушение может наблюдаться и после операции по поводу язвы желудка.

3. Низкая активность лактазы первичного характера. Это относительно распространенный синдром, особенно среди цветного населения США и других стран. Поскольку у взрослых с нарушением толерантности к лактозе в детстве характерные симптомы отсутствуют, предполагается, что такое нарушение отражает постепенное снижение активности лактазы у предрасположенных лиц.

Б. Недостаточность сахаразы. Существует наследственная недостаточность дисахаридаз—сахаразы и изомальтазы. Эти два нарушения коррелируют, поскольку сахараза и изомальтаза представляют собой единый ферментный комплекс. Симптомы, аналогичные описанным при недостаточности лактазы, выявляются в раннем детстве.

В. Дисахаридурия. Повышение экскреции дисахаридов наблюдается у некоторых больных с дефицитом дисахаридаз. Выделение дисахаридов с мочой у таких лиц, а также у больных с поражением кишечника (например, спру) может составлять 300 мг или более.

Г. Нарушение всасывания моносахаридов. Существует врожденный дефект, при котором всасывание глюкозы и галактозы происходит медленно из-за нарушения механизма их транспорта. Поскольку для фруктозы этот процесс происходит без участия переносчика, ее всасывание при этом остается нормальным.

ВСАСЫВАНИЕ ЛИПИДОВ

2-Моноацилглицеролы, жирные кислоты и небольшие количества 1-моноацилглицеролов покидают жировую фазу липидной эмульсии и диффундируют в смешанные мицеллы и липосомы, состоящие из желчных солей, фосфатидилхолина и холестерина, содержащихся в желчи (рис. 53.2). Благодаря растворимости мицелл возможен транспорт продуктов переваривания через жидкую среду просвета кишечника к щеточной каемке клеток слизистой, где эти продукты всасываются. Желчные соли попадают в подвздошную кишку и всасываются здесь. Фосфолипиды пищевого и желчного происхождения (например, фосфатидилхолин) гидролизуются фосфолипазой A_2 панкреатического секрета на жирные ки-

слоты и лизофосфолипиды, которые также всасываются из мицелл. Холестериловые эфиры гидролизуются соответствующей гидролазой панкреатического сока, и свободный холестерол вместе с большей частью холестерола желчи после транспортировки в составе мицелл всасывается через щеточную каемку. В норме всасывается более 98% пищевых липидов.

В кишечной стенке 1-моноацилглицеролы подвергаются дальнейшему гидролизу с образованием свободного глицерола и жирных кислот под действием липазы, отличающейся от панкреатической, тогда как 2-моноацилглицеролы могут вновь превращаться в триацилглицеролы по моноацилглицероловому пути (рис. 53.3). Использование для ресинтеза триацилглицеролов жирных кислот требует их предварительной «активации».

Синтез триацилглицеролов в слизистой кишечника, вероятно, сходен с этим процессом и в других тканях. Всосавшиеся лизофосфолипиды вместе с большей частью всосавшегося холестерола также рециклируются ацил-СоА с регенерацией фосфолипидов и холестериловых эфиров.

Свободный глицерол, выделившийся в просвет кишечника, не утилизируется вновь, а поступает непосредственно в воротную вену. Однако глицерол, высвобождающийся в кишечных клетках, может снова использоваться для синтеза триацилглицерола с активацией в глицерол-3-фосфат при участии АТФ. Все длинноцепочечные жирные кислоты, всосавшиеся в клетках слизистой кишечной стенки, в конце концов используются для повторного образования триацилглицеролов.

Триацилглицеролы, синтезированные в слизистой кишечника, вовсе не поступают в кровь портальной вены. Вместо этого подавляющее большинство абсорбированных липидов, включая фосфолипиды, холестериловые эфиры, холестерол и жирорастворимые витамины, образуют хиломикроны, которые в составе млечной жидкости (хилуса) собираются в лимфатических сосудах брюшной области и поступают в системную кровь через грудной проток (см. также рис. 26.3).

Большая часть всосавшихся жирных кислот с длиной цепи более 10 углеродных атомов (независимо от формы, в которой они абсорбировались) обнаруживается в лимфе грудного протока в виде эстерифицированных жирных кислот. Жирные кислоты с длиной цепи менее 10—12 атомов углерода переносятся в кровь портальной вены в неэстерифицированной (свободной) форме.

Ни один из растительных стеролов (фитостеролов), кроме активированного эргостерола (провитамина D), не всасывается в кишечнике.

Хилурия — это нарушение, при котором больной выделяет млечную мочу из-за наличия аномальной связи между мочевым трактом и лимфатической

дренажной системой кишечника, так называемой хилезной фистулы. При сходном нарушении, **хилотораксе**, имеет место аномальная связь между плевральным пространством и лимфатической дренажной системой тонкого кишечника, приводящая к накоплению лимфы в плевральной полости. Потребление вместо пищевого жира триацилглицеролов, содержащих жирные кислоты со средней длиной цепи (менее 12 углеродных атомов), сопровождается исчезновением хилурии. При хилотораксе прием триацилглицеролов с короткоцепочечными жирными кислотами восстанавливает прозрачность плевральной жидкости.

ВСАСЫВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКА

В нормальных условиях пищевые белки почти полностью расщепляются на составляющие их аминокислоты, которые затем быстро всасываются в кишечнике. Возможно, что некоторые гидролитические процессы (например, в случае дипептидов) полностью завершаются в кишечной стенке. Потребность животных в белке может с успехом удовлетворяться скормливанием полной смеси аминокислот.

Природные (L-) изомеры (но не D-изомеры) аминокислот подвергаются активному переносу через кишечную стенку от слизистой ее поверхности к серозной; в этом переносе может участвовать витамин B₆ (пиридоксальфосфат). Активный транспорт L-аминокислот представляет собой энергозависимый процесс; об этом свидетельствует его ингибирование разобщителем окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом. Аминокислоты переносятся через щеточную каемку целым рядом переносчиков, многие из которых действуют при посредстве Na⁺-зависимых механизмов, подобно системе переноса глюкозы (рис. 53.4). К числу Na⁺-зависимых переносчиков относятся переносчик нейтральных аминокислот, переносчик фенилаланина и метионина и переносчик, специфичный для иминокислот, таких, как пролин и гидроксипролин. Охарактеризованы и независимые от Na⁺ переносчики, специализированные в отношении транспорта нейтральных и липофильных аминокислот (например, фенилаланина и лейцина) или катионных аминокислот (например, лизина).

Клинические аспекты. Лица, у которых возникает иммунологическая реакция на прием белка, по-видимому, обладают способностью к всасыванию некоторого количества негидролизованного белка, потому что переваренный белок лишен антигенных свойств. Это предположение не является полностью умозрительным, ведь известно, что антитела молока поступают в кровь младенца.

Получает все новые и новые подтверждения гипотеза, согласно которой при **нетропическом спру** ос-

Таблица 53.12. Место всасывания пищевых веществ

Место	Пищевое вещество
Тощая кишка	Глюкоза и другие моносахариды; некоторые дисахариды Моноацилглицеролы, жирные кислоты, глицерол, холестерол Аминокислоты, пептиды Витамины, фолат Электролиты, железо, кальций, вода
Подвздошная кишка	Желчные кислоты Витамин B ₁₂ Электролиты Вода

новной дефект локализуется в клетках слизистой кишечника и выражается в том, что, во-первых, полипептиды, образующиеся при пептическом и триптическом переваривании клейковины (главного белка пшеницы), оказывают на кишечник повреждающее действие, а во-вторых, они (эти полипептиды) всасываются в кровоток, что индуцирует образование соответствующих антител. Заметим, что антитела против клейковины или ее фракций часто обнаруживаются в крови больных нетропическим спру. Повреждающий эффект скорее всего принадлежит компоненту, представляющему собой полипептид, состоящий из 6 или 7 аминокислот, в число которых обязательно должны входить глутамин и пролин.

Анализ данного заболевания позволяет предположить, что при определенных условиях в кишечнике может происходить всасывание белковых фрагментов больших молекулярных размеров, чем аминокислоты.

В табл. 53.12 и 53.13 суммированы данные о том, в каких именно участках кишечника всасываются те или иные соединения, и, кроме того, содержатся сведения о нарушениях, возникающих в результате расстройства их всасывания.

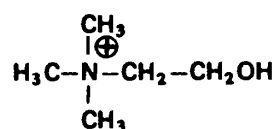
ПРОЦЕССЫ ГНИЕНИЯ И БРОЖЕНИЯ В КИШЕЧНИКЕ

Большая часть потребленной пищи всасывается в тонком кишечнике. Остальная часть попадает в толстый кишечник. Именно здесь происходит значительное всасывание воды и полужидкое кишечное содержимое постепенно становится более твердым. В этот период проявляется бактериальная активность. В ходе вызываемых бактериями процессов брожения и гниения образуются различные газы, такие, как CO₂, метан, водород, азот и сероводород, а также уксусная, молочная и масляная кислоты. Бактериальное разложение фосфатидилхолина при-

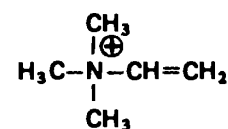
Таблица 53.13. Расстройства, связанные с нарушением всасывания

Признак или симптом	Вещество, всасывание которого нарушено
Анемия	Железо, витамин B ₁₂ , фолат
Отек	Продукты переваривания белка
Тетания	Кальций, магний, витамин D
Остеопороз	Кальций, продукты переваривания белка, витамин D
Нарушение толерантности к молоку	Лактоза
Кровотечения, кровоточивость	Витамин К
Стеаторрея (жирный стул)	Липиды и жирорастворимые витамины
Болезнь Хартнупа (дефект переносчика нейтральных аминокислот в кишечнике)	Нейтральные аминокислоты

водит к образованию холина и родственных токсических аминов, например нейрина.



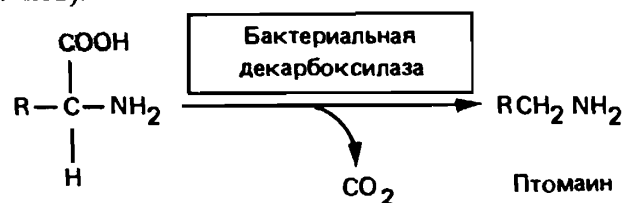
Холин



Нейрин

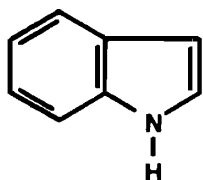
Судьба аминокислот

Большинство аминокислот подвергается декарбоксилированию в результате действия кишечных бактерий с образованием токсических аминов (птомаинов).

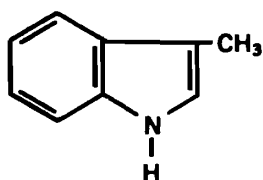


Реакции декарбоксилирования приводят к образованию кадаверина из лизина, агматина из аргинина, тирамина из тирозина, путресцина из орнитина и гистамина из гистидина. Многие из этих аминов являются мощными вазопрессорными агентами.

Аминокислота триптофан в результате нескольких реакций превращается в индол и метилиндола (скатол). Именно эти соединения в основном придают запах калу.



Индол



Скатол

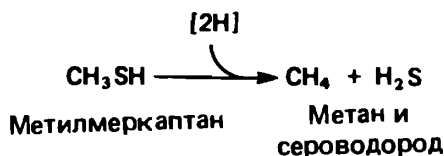
Серусодержащая аминокислота цистеин подвергается серии превращений с образованием меркаптанов, таких, как этил- и метилмеркаптаны, а также H_2S .



Этилмеркаптан



Метилмеркаптан



В толстом кишечнике образуется значительное количество аммиака, который представляет собой продукт гниения при действии кишечных бактерий на азотистые субстраты. Аммиак всасывается в портальную кровь, но при нормальных условиях быстро удаляется из крови печенью. При болезнях печени эта ее функция может нарушаться, и в таком случае концентрация аммиака в периферической крови повышается до токсических уровней. Считают, что аммониевая интоксикация может играть роль в возникновении у некоторых больных печеночной комы. Показано,

что оральное введение неомицина уменьшает количество аммиака, поступающего из кишечника в кровь, благодаря антибактериальному действию этого вещества. У больных с тяжелыми поражениями печени диета с высоким содержанием белка, а также желудочно-кишечные кровотечения могут способствовать развитию интоксикации аммиаком. В этих случаях также показан неомицин.

Кишечные бактерии

Кишечная флора может составлять значительную часть (до 25%) сухого веса кала. У травоядных, пища которых состоит большей частью из целлюлозы, бактерии кишечника или рубца играют важную роль в пищеварении, поскольку они расщепляют полисахариды и тем самым способствуют их всасыванию. Кроме того, эти бактерии осуществляют синтез незаменимых аминокислот и витаминов. Для людей кишечная флора не столь важна, как для травоядных. Однако бактериальная активность вносит определенный полезный вклад в питание человека, ибо с ней связан синтез витаминов К и B_{12} , а возможно, и других витаминов группы В, которые далее усваиваются организмом.

ЛИТЕРАТУРА

- American Cancer Society. Nutrition and cancer: Cause and prevention. (Special report.) CA, 1984, **34**, 121.
- Börgstrom B. The micellar hypothesis of fat absorption: Must it be revisited? Scand. J. Gastroenterol., 1985, **20**, 389.
- Crapo P. A. Simple versus complex carbohydrate use the diabetic diet, Annu. Rev. Nutr., 1985, **5**, 95.
- Nestle M. Nutrition on Clinical Practice, Jones Medical Publications, 1985.
- Passmore R., Eastwood M. A. Davidson and Passmore Human Nutrition and Dietetics, 8th ed., Churchill Livingstone, 1986.
- Steven B. R., Kaunitz J. D., Wright E. M. Intestinal transport of amino acids and sugars, Annu. Rev. Physiol., 1984, **46**, 417.
- Tso P. Gastrointestinal digestion and absorption of lipid, Adv. Lipid. Res., 1985, **21**, 143.
- Woo R., Daniels-Kush R., Horton E. S., Regulation of energy balance, Annu. Rev. Nutr., 1985, **5**, 411.

Гликопротеины и протеогликаны

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Гликопротеины — это белки, содержащие олигосахаридные (гликановые) цепи, ковалентно присоединенные к полипептидной основе. **Гликозаминогликаны** представляют собой полисахариды, построенные из повторяющихся дисахаридных компонентов, которые обычно содержат аминсахара (глюкозамин или галактозамин в сульфированном или несulfированном виде) и уроновую кислоту (глюкуроновую или идуроновую). Раньше гликозаминогликаны называли **мукополисахаридами**. Они обычно ковалентно связаны с белком; комплекс одного или более гликозаминогликанов с белком носит название **протеогликана**. **Гликоконъюгаты** и **сложные углеводы** — эквивалентные термины, обозначающие молекулы, которые содержат углеводные цепи (одну или более), ковалентно связанные с белком или липидом. К этому классу соединений относятся гликопротеины, протеогликаны и гликолипиды.

БИМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Почти все белки плазмы человека, кроме альбумина, представляют собой гликопротеины. Многие белки клеточных мембран содержат значительные количества углеводов (см. гл. 42). Вещества групп крови в ряде случаев оказываются гликопротеинами, иногда в этой роли выступают гликофинголипиды. Некоторые гормоны (например, хорионический гонадотропин) имеют гликопротеиновую природу. В последнее время рак все чаще характеризуется как результат аномальной генной регуляции (см. гл. 57). Главная проблема онкологических заболеваний, метастазы, — феномен, при котором раковые клетки покидают место своего происхождения (например, молочную железу), переносятся с кровотоком в отдаленные части тела (например, в мозг) и неограниченно растут с катастрофическими последствиями для больного. Многие онкологи полагают, что метастазирование, по крайней мере частично,

обусловлено изменениями в структуре гликоконъюгатов на поверхности раковых клеток. В основе целого ряда заболеваний (мукополисахаридозы) лежит недостаточная активность различных лизосомных ферментов, разрушающих отдельные гликозаминогликаны; в результате один или несколько из них накапливаются в тканях, вызывая различные патологические признаки и симптомы. Одним из примеров таких состояний является синдром Хурлера.

ГЛИКОПРОТЕИНЫ

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ФУНКЦИИ

Гликопротеины имеются у большинства организмов — от бактерий до человека. Многие вирусы животных также содержат гликопротеины, некоторые из этих вирусов интенсивно изучались, отчасти в силу удобства их использования для исследований.

Гликопротеины — это многочисленная группа белков с разнообразными функциями (табл. 54.1); содержание в них углеводов варьирует от 1 до 85% и более (в единицах массы). Роль олигосахаридных цепей в функции гликопротеинов до сих пор точно не определена, несмотря на интенсивное изучение этого вопроса; некоторые предполагаемые функции олигосахаридных цепей перечислены в табл. 54.2.

ИНФОРМАЦИЯ, ЗАКЛЮЧЕННАЯ В ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЦЕПЯХ

Между сахарами может возникать огромное количество гликозидных связей. Например, три различных гексозы могут соединяться друг с другом с образованием более 1000 различных трисахаридов. Конформация сахаров в олигосахаридных цепях варьирует в зависимости от их связей и близости дру-

Таблица 54.1. Некоторые функции, выполняемые гликопротеинами

Структурные молекулы
Клеточные стенки
Коллаген, эластин
Фибрины
Костный матрикс
«Смазочные» и защитные агенты
Муцины
Слизистые секреты
Транспортные молекулы для
витаминов
липидов
минералов и микроэлементов
Иммунологические молекулы
Иммуноглобулины
Антигены гистосовместимости
Комплемент
Интерферон
Гормоны
Хорионический гонадотропин
Тиреотропин
Ферменты
Протеазы
Нуклеазы
Гликозидазы
Гидролазы
Факторы свертывания
Места клеточных контактов/распознавания
Клетка – клетка
Вирус—клетка
Бактерия—клетка
Гормональные рецепторы
Антифризные функции у антарктических рыб
Лектины

Таблица 54.2. Некоторые функции олигосахаридных цепей гликопротеинов. (Adapted from Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and heterogeneity of protein—bound oligosaccharides. Biochem. Cell. Biol., 1986, 64, 163.)

Модулируют физико-химические свойства, такие, как растворимость, вязкость, заряд и денатурируемость
Осуществляют защиту от протеолиза внутри клетки и во внеклеточном пространстве
Влияют на протеолитический процессинг белков-предшественников до продуктов меньшего размера
Участвуют в биологической активности, например, хорионического гонадотропина
Влияют на проникновение в мембраны, внутриклеточную миграцию, сортировку и секрецию
Влияют на эмбриональное развитие и дифференцировку
Могут влиять на выбор мест метастазирования раковых клеток

гих молекул, с которыми олигосахариды могут взаимодействовать. Широко распространено мнение, что в олигосахаридных цепях закодирована значительная биологическая информация, зависящая от составляющих их сахаров, последовательности и конформации этих сахаров. Имеются также данные о взаимодействии различных лекарств и токсинов со специфическими олигосахаридными цепями гликоконъюгатов клеточной поверхности (например, холерный токсин взаимодействует с олигосахаридным компонентом ганглиозида G_{M1} ; см. гл. 15). Кроме того, маннозо-6-фосфатные остатки служат, по-видимому, мишенью действия вновь синтезируемых лизосомных ферментов в этих органеллах (см. ниже).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Определение

Гликопротеины могут быть выделены из сложных смесей (например, из клеточных мембран) при помощи ПААГ с ДСН (см. гл.2) и выявлены путем окрашивания **реактивом Шиффа с иодной кислотой**, который идентифицирует альдегидные группы сахаров, образующихся при действии иодной кислоты. Они могут быть также определены визуально путем **радиоавтографии в ПААГ-ДСН** по включению метки при инкубировании клеток или тканей с соответствующими радиоактивными сахарами.

Очистка и структурный анализ

Определение структуры гликопротеинов требует (как и в случае других молекул) их предварительной очистки, которая может быть достигнута с помощью методов, обычно применяемых для белка. Для очистки некоторых гликопротеинов оказалось весьма плодотворным также применение аффинных колонок с лектинами (см. ниже). Углеводный состав гликопротеинов определяли после кислотного гидролиза при помощи **газожидкостной хроматографии—масс-спектрометрии (ГЖХ—МС)**. Для изучения детальной структуры олигосахаридных цепей было опробовано множество различных методов. Наиболее эффективной оказалась комбинация ГЖХ—МС и ЯМР-спектрометрии с высоким разрешением. Особенности связей между сахарами в гликопротеинах (рассмотрение которых не входит в задачу данной главы) имеют фундаментальное значение для структуры и функций этих молекул.

САХАРА, ПРИСУТСТВУЮЩИЕ В ГЛИКОПРОТЕИНАХ

Хотя в природе обнаружено около 200 моносахаридов, в составе олигосахаридных цепей гликопротеинов присутствует менее 12 из них (табл. 54.3). Большинство этих сахаров рассматривалось в гл. 14. На концах олигосахаридных цепей присутствует N-ацетилнейраминная кислота (NeuAc), обычно присоединенная к претерминальным остаткам галактозы (Gal) или N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Другие перечисленные в таблице сахара обычно занимают положения ближе к середине цепи.

НУКЛЕОТИДСАХАРА

Первым описанным нуклеотидсахаром была уридиндифосфатглюкоза (UDPGlc). Распространенные

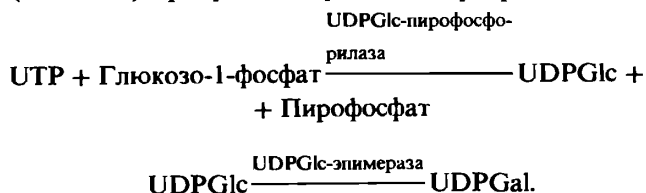
нуклеотидсахара, участвующие в биосинтезе гликопротеинов, перечислены в табл. 54.3; причины, по которым одни из них содержат UDP, а другие — гуанозиндифосфат (GDP) или цитидинмонофосфат, неясны. Многие, но не все реакции гликозилирования при биосинтезе гликопротеинов протекают с использованием этих соединений (см. ниже). Связь между фосфатной группой и сахарами имеет ангидридную природу и принадлежит к разряду богатых энергией связей с высоким потенциалом переноса групп. Сахара в подобных соединениях являются, таким образом, «активированными» и при наличии необходимых трансфераз могут переноситься на соответствующие акцепторы.

Нуклеотидсахара образуются в цитозоле обычно при участии соответствующих нуклеозидтрифосфатов. Образование уридиндифосфатгалактозы

Таблица 54.3. Основные сахара, присутствующие в гликопротеинах человека. Структура большинства перечисленных сахаров описана в гл. 14

Сахар	Тип	Сокращение	Примечание
Галактоза	Гексоза	Gal	Часто занимает претерминальное положение перед NeuAc в N-связанных гликопротеинах. Обнаруживается также в трисахаридном ядре протеогликанов
Глюкоза	Гексоза	Glc	Присутствует на этапе биосинтеза N-связанных гликопротеинов, но не всегда обнаруживается в зрелых гликопротеинах
Манноза	Гексоза	Man	Обычный сахар в N-связанных гликопротеинах
N-ацетилнейраминная кислота (9-атомов C)	Сиаловая кислота (9-атомов C)	NeuAc	Часто служит терминальным сахаром в N- и O-связанных гликопротеинах. Известны и другие сиаловые кислоты, но NeuAc — главный вид этих соединений, обнаруживаемый у человека
Фукоза	Дезоксигексоза	Fuc	Может занимать наружную позицию в N- и O-связанных гликопротеинах или быть связанной с остатком GlcNAc, который присоединен к Asp в N-связанных гликопротеинах
N-ацетилгалактозамин	Аминогексоза	GalNAc	Присутствует и в N-, и в O-связанных гликопротеинах
N-ацетилглюкозамин	Аминогексоза	GlcNAc	Этот сахар присоединяется к полипептидной цепи N-связанных гликопротеинов через остаток Asp; он присутствует и в других частях олигосахаридных компонентов этих белков

(UDPGal) требует следующих двух реакций:



Поскольку многие реакции гликозилирования протекают в просвете элементов комплекса Гольджи, нуклеотидсахара транспортируются через мембраны Гольджи. Описаны системы, переносящие UDP-Gal, GDP-Man и CMP-NeuAc в цистерны комплекса Гольджи. Они являются системами антипорта; это означает, что приток одной молекулы нуклеотидсахара уравнивается оттоком одной молекулы соответствующего нуклеотида (например, UMP, GMP или CMP), образовавшегося из нуклеотидсахаров. Такой механизм обеспечивает адекватную концентрацию каждого нуклеотидсахара внутри комплекса Гольджи. UMP образуется из UDPGal следующим образом:



ЭКЗОГЛИКОЗИДАЗЫ И ЭНДОГЛИКОЗИДАЗЫ

Ряд гликозидаз определенной специфичности используется при изучении структуры и функции гликопротеинов (табл. 54.4). Эти ферменты действуют либо на наружные (экзогликозидазы), либо на внутренние (эндогликозидазы) положения олигосахаридных цепей. Примерами экзогликозидаз являются нейраминидазы и галактозидазы; их последовательное применение приводит к удалению терминальных остатков NeuAc и претерминальных остатков Gal из большинства гликопротеинов. Эндогликозидазы F и H служат примерами второй группы гликозидаз; эти ферменты расщепляют олигосахаридные цепи в местах локализации специфических остатков GlcNAc, примыкающих к полипептидному скелету (т.е. во внутренних позициях), и могут использоваться поэтому для получения больших олигосахаридных цепей, что необходимо для структурного анализа. Обработка гликопротеина одной или несколькими гликозидазами дает возможность судить об эффекте удаления специфических сахаров на биологические свойства гликопротеинов.

Опыты Ашвелла, проведенные в начале 70-х гг., показали, что «обнажение» остатков Gal обработкой нейраминидазой приводит к быстрому исчезновению церулоплазмينا из плазмы. Дальнейшие исследования показали, что клетки печени содержат ре-

Таблица 54.4. Некоторые гликозидазы, используемые для изучения структуры и функций гликопротеинов. Ферменты могут быть получены из различных источников и часто обладают специфичностью в отношении определенных видов гликозидных связей, в том числе аномерных. На рис. 54.4 показаны места действия эндогликозидаз F и H. Форма F действует и на высокоманнозные, и на сложные олигосахаридные цепи, тогда как эндогликозидаза H атакует только цепи 1-го типа

Ферменты	Тип
Нейраминидазы	Экзогликозидаза
Галактозидазы	Экзогликозидаза
Эндогликозидаза F	Эндогликозидаза
Эндогликозидаза H	Эндогликозидаза

цептор, распознающий галактозилный компонент многих десилилированных (т.е. лишенных NeuAc) белков плазмы и способствующий их эндоцитозу. Эти данные свидетельствуют о том, что индивидуальный сахар может играть важную роль в регуляции по крайней мере одного из биологических свойств некоторых гликопротеинов — времени их пребывания в крови.

ЛЕКТИНЫ

Лектины — это белки растительного происхождения, связывающие один или несколько специфических сахаров. Многие лектины очищены, и более 40 из них имеется в продаже (табл. 54.5). В области биохимических исследований лектины находят применение для многих целей, в том числе:

1) для очистки и анализа гликопротеинов. Такие лектины, как конканавалин А (ConA), способны ковалентно присоединяться к инертному носителю, например к сефарозе. Образующаяся сефароза—ConA — может использоваться для очистки гликопротеинов, содержащих олигосахаридные цепи, которые взаимодействуют с ConA;

2) в качестве средств для изучения поверхности клеток. Поскольку лектины распознают специфические сахара, они могут использоваться как зонды для идентификации остатков сахаров, расположенных на мембранах клеточной поверхности. Многочисленные исследования посвящены применению лектинов для сравнения поверхности нормальных и раковых клеток (см. гл. 57). Показано, что для агглютинации раковых клеток некоторые лектины требуются в меньших количествах, чем для агглютинации нормальных клеток. Это подтверждает существование различий в организации или структуре ряда гликопротеинов на поверхности раковых и нормальных клеток;

3) для получения мутантных клеток, лишенных некоторых ферментов синтеза олигосахаридов. При

Таблица 54.5. Три лектина и сахара, с которыми они взаимодействуют. В большинстве случаев лектины обладают специфичностью в отношении аномерной гликозидной связи (α или β); в таблице это не указано

Лектины	Сокращение	Сахара
Конканавалин А	ConA	Man и Glc
Лектин соевых бобов		Gal и GalNAc
Агглютинин зародышей пшеницы	WGA	GlcNAc и NeuAc

обработке культуры клеток млекопитающих соответствующими концентрациями некоторых лектинов (например, ConA) большинство клеток погибает, а среди выживших многие оказываются лишенными некоторых ферментов, участвующих в синтезе олигосахаридов. Устойчивость таких клеток обусловлена, по-видимому, отсутствием одного или нескольких поверхностных гликопротеинов, способных взаимодействовать с данным лектином. Использование мутантных клеточных линий имеет важное значение для выяснения ряда аспектов биосинтеза гликопротеинов.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Основываясь на природе связей между полипептидными и олигосахаридными цепями, гликопротеины можно разделить на 4 класса: 1) содержащие связь Ser (или Thr)—GalNAc (рис. 54.1); 2) гликопротеины, содержащие связь Ser-Xyl; 3) коллагены, содержащие связь гидроксизин (Hyl)—Gal; 4) гликопротеины, содержащие связь Asn—GlcNAc (рис. 54.1).

Гликопротеины классов 1, 2 и 3 соединяются с соответствующими аминокислотами **О-гликозидной связью** (т.е. связью, образуемой OH боковой цепи аминокислоты и остатком сахара). Класс 4 характеризуется **N-гликозидной связью** (т.е. связью, образуемой N-амидной группой аспарагина и остатком сахара). Поскольку гликопротеины классов 2 и 3 встречаются относительно редко, термин **О-связанные гликопротеины** часто используют (как это имеет место и здесь) только в отношении представителей класса 1. Гликопротеины класса 4 получили название «**N-связанные гликопротеины**». Имеются и другие классы гликопротеинов, присутствующие в малых количествах. Число олигосахаридных цепей, присоединенных к одному белку, может колебаться от 1 до 30 и более, а длина сахарных цепей варьирует от 2 или 3 остатков до значительно больших структур.

Некоторые гликопротеины содержат как N-, так и О-гликозидные связи.

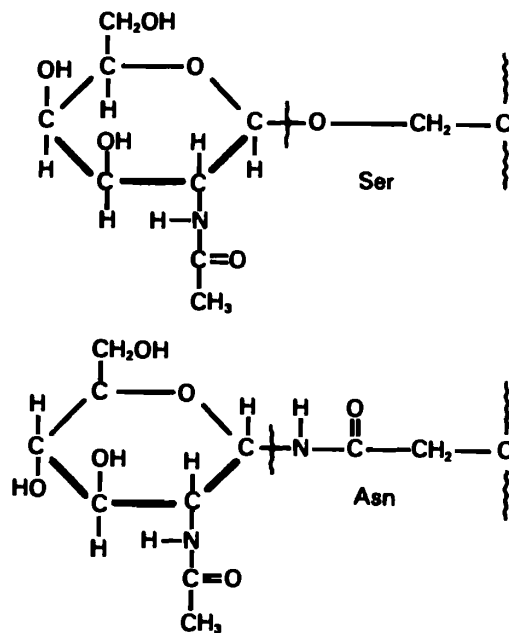


Рис. 54.1. Связь N-ацетилгалактозамина с серином и N-ацетилглюкозамина с аспарагином.

О-связанные гликопротеины

Большинство О-гликозидных связей образуется за счет свободных OH-групп остатков Ser и Thr полипептида в трипептидной последовательности Asn—Y—Ser(Thr), где Y—любая аминокислота, кроме аспартата. Эта специфическая трипептидная последовательность широко распространена в белках, но не каждая такая последовательность находится в гликозилированном состоянии. Гликозилирование остатков Ser или Thr зависит от конформации белка, окружающего трипептид при его проникновении через эндоплазматический ретикулум.

А. Распространение и структура олигосахаридных цепей О-связанных гликопротеинов. Многие гликопротеины этого класса присутствуют в муцинах. Однако О-гликозидные связи обнаруживаются также в некоторых мембранных и циркулирующих в крови гликопротеинах. Как отмечалось выше, сахаром, прямо присоединяющимся к остатку Ser или Thr, является GalNAc (рис. 54.1). Остаток Gal или NeuAc обычно присоединяется к GalNAc. Структура двух типичных олигосахаридных цепей гликопротеинов этого класса представлена на рис. 54.2. Встречаются также многие варианты таких структур.

Б. Биосинтез О-связанных гликопротеинов. Полипептидные цепи этих и других гликопротеинов кодируются соответствующими мРНК; поскольку большинство гликопротеинов связано с мембранами или секретируются, они обычно транслируются на мембраносвязанных полирибосомах (см. гл. 40). Олигосахаридные цепи гликопротеинов О-гликозидного типа конструируются путем ступенчатого добавления

А



Б

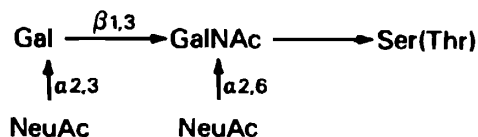


Рис. 54.2. Структура двух O-связанных олигосахаридов, обнаруживаемых в составе (А) муцинов слюны подчелюстной железы и (Б) фетуина, а также сиалогликопротеина эритроцитарных мембран человека. (Modified and reproduced, with permission, from Lennarz W. J. The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Plenum Press, 1980.)

сахаров из нуклеотидсахаров, таких, как UDPGalNAc, UDPGal и CMP-NeuAc. Ферменты, катализирующие эту реакцию, представляют собой мембраносвязанные гликопротеин-гликозилтрансферазы. Синтез каждого такого фермента контролируется одним специфическим геном. В общем плане образование одного типа связей требует активности соответствующей трансферазы (гипотеза «одна связь — одна гликозилтрансфераза»). Ферменты, катализирующие присоединение внутренних сахарных остат-

ков, локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, и присоединение первых сахаров происходит во время трансляции (т. е. имеет место котрансляционная модификация белка). Ферменты, осуществляющие присоединение терминальных сахаров (таких, как NeuAc), локализованы в комплексе Гольджи,

N-связанные гликопротеины

Отличительной особенностью этих соединений, составляющих основной класс гликопротеинов, служит наличие связи Asp—GlcNAc (рис. 54.1). Представители этого класса в связи с легкостью их получения изучены довольно тщательно (например, белки крови). Данный класс включает как мембраносвязанные, так и циркулирующие в крови гликопротеины. Основное отличие между ними и ранее описанным классом помимо природы аминокислоты, к которой присоединена олигосахаридная цепь (в основном Asp вместо Ser), заключается в особенностях их биосинтеза.

А. Группы N-связанных гликопротеинов и их структура. Существуют три главные группы N-связанных гликопротеинов: **сложные**, **гибридные** и **богатые маннозой** (рис. 54.3). Они содержат общий пентасахарид ([Man]₃[GlcNAc]₂), показанный внутри очерченной области на рис. 54.3 и на рис. 54.4, но различаются по структуре наружных цепей. Присутствие общего пентасахарида объясняется тем, что начальный биосинтез всех трех групп протекает одинаково. Гликопротеины сложного типа обычно содержат концевые остатки NeuAc и предшествующие им остатки Gal и GlcNAc; последние часто состав-

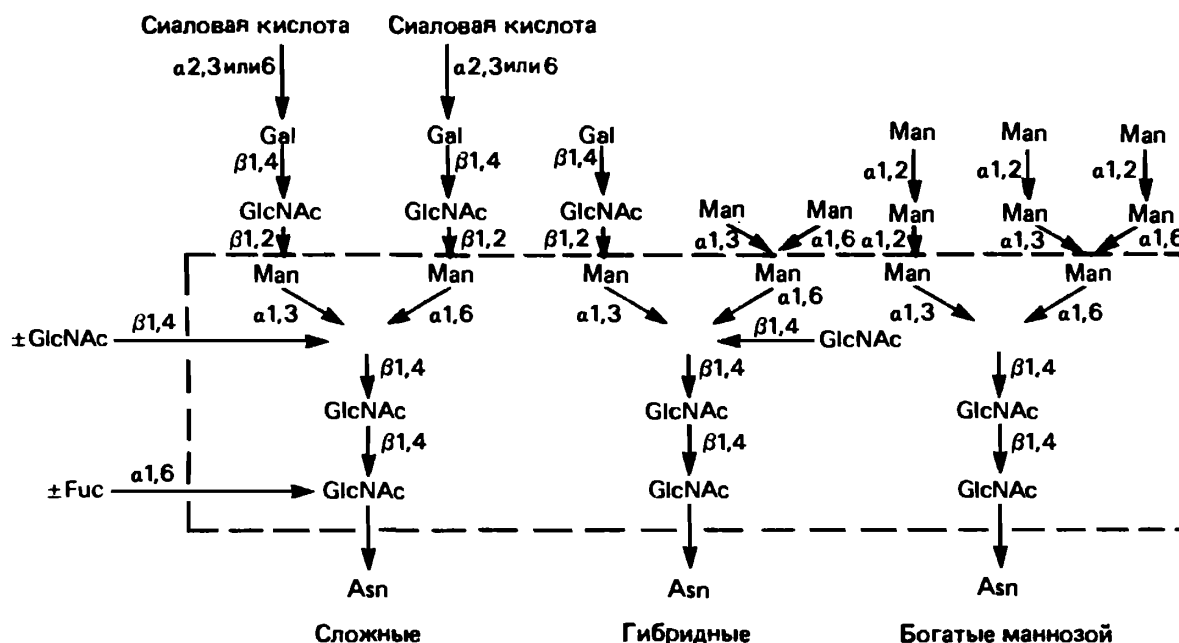


Рис. 54.3. Структура основных видов аспарагин-связанных олигосахаридов. Область, заключенная в рамку, включает олигосахаридное ядро, общее для всех N-связанных гликопротеинов. (Reproduced, with permission, from Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem., 1985, 54, 631.)

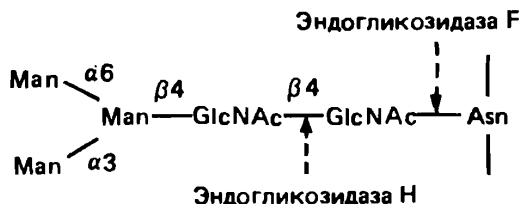


Рис. 54.4. Схематическое изображение пентасахаридного ядра, общего для всех N-связанных гликопротеинов, к которому могут присоединяться различные наружные олигосахаридные цепи. Указаны также места действия эндогликозидаз F и H.

ляют дисахарид лактозамин. (Присутствие повторяющихся лактозаминных компонентов $[\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3]_n$ характеризует четвертый класс гликопротеинов — полилактозаминных, которые играют важную роль, поскольку определяют группы крови I/i.) Большинство олигосахаридов сложного типа содержит 2 (рис. 54.2), 3 или 4 внешние ветви, но описаны и структуры, содержащие 5 ветвей. Эти ветви часто называют антеннами, так что можно говорить о наличии ди-, три-, тетра- и пентаантенных структур. Количество цепей комплексного типа удивительно велико, и вариант, представленный на рис. 54.3, только один из многих. Другие сложные цепи могут оканчиваться Gal или Fuc. Богатые маннозой олигосахариды обычно содержат 2—6 дополнительных маннозных остатков, присоединенных к пентасахаридному ядру.

Б. Обзор данных о биосинтезе N-связанных гликопротеинов. Группой исследователей под руководством Лелуа описано соединение, представляющее собой олигосахарид-пирофосфорил-долихол (олигосахарид-P—P-Dol), которое, как показали дальнейшие исследования, играет ключевую роль в биосинтезе N-связанных гликопротеинов. Олигосахаридная цепь этого соединения имеет общую структуру $(\text{Glc})_3(\text{Man})_6(\text{GlcNAc})_2\text{—R}$, где $\text{R} = \text{P—P-Dol}$. Сахара сначала собираются на пирофосфорил-долихоловом остове, а затем олигосахаридная цепь переносится целиком к соответствующим Asn-остаткам акцепторных апогликопротеинов в ходе их синтеза на мембраносвязанных полирибосомах. При образовании олигосахаридной цепи сложного типа удаляются остатки Glc и 6 остатков Man и возникает пентасахаридное ядро $(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ (рис. 54.4.). Далее под

действием индивидуальных гликозилтрансфераз, локализованных главным образом в комплексе Гольджи, происходит присоединение сахаров, характерных для сложных цепей (GlcNAc, Gal, NeuAc). При образовании **высокоманнозных** цепей удаляются только остатки Glc с некоторыми периферическими остатками Man или без них. Феномен, при котором гликановые цепи N-связанных гликопротеинов сначала подвергаются частичной деградации, а затем строятся заново, носит название «процессинг олигосахаридов». Неожиданно оказалось, что начальные этапы биосинтеза N-связанных и O-связанных гликопротеинов существенно различаются между собой. В первом случае в процессе участвует олигосахарид-пирофосфорил-долихол, а во втором это соединение роли не играет.

Процесс может быть разделен на 2 этапа: 1) сборка и перенос олигосахарид-пирофосфорил-долихола и 2) процессинг олигосахаридной цепи.

1. Сборка и перенос олигосахарид-пирофосфорил-долихола. Полиизопреноловые соединения присутствуют и у бактерий, и в тканях эукариот. Они участвуют в биосинтезе стенок бактериальных клеток и в биосинтезе N-связанных гликопротеинов. Полиизопренолы эукариотических тканей представлены долихолом, который, подобно каучуку, является самым длинным из природных углеводородов, построенных из одинаковых повторяющихся компонентов. Долихол состоит из 17—20 повторяющихся изопреноидных компонентов (рис. 54.5).

До включения в процесс биосинтеза олигосахарид-пирофосфорил-долихола долихол должен сначала подвергнуться фосфорилированию с образованием долихолфосфата (Dol-P) в реакции, катализируемой **долихолкиназой** при использовании АТФ в качестве донора фосфата.

GlcNAc-пирофосфорил-долихол (GlcNAc-P—P-Dol) является ключевым липидом, действующим в качестве акцептора других сахаров при сборке олигосахарид-пирофосфорил-долихола. Он синтезируется в мембранах эндоплазматического ретикула из Dol-P и UDPGlcNAc в следующей реакции:
 $\text{Dol-P} + \text{UDPGlcNAc} \longrightarrow \text{GlcNAc-P—P-Dol} + \text{UMP}$.
 Эта реакция, представляющая собой первый этап сборки олигосахарид-пирофосфорил-долихола,

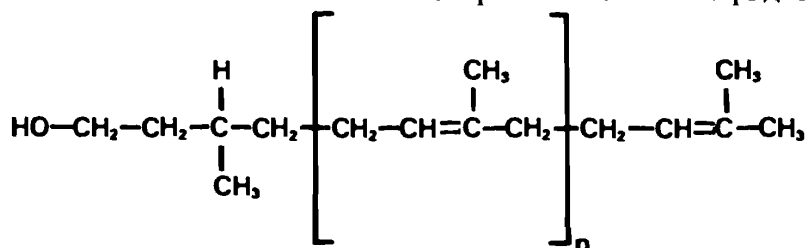


Рис. 54.5. Структура долихола. Фосфат в долихолфосфате присоединяется к первичной спиртовой группе в левом конце молекулы. Группа в скобках — изопреновый компонент (n-17—20 изопреноидных единиц).

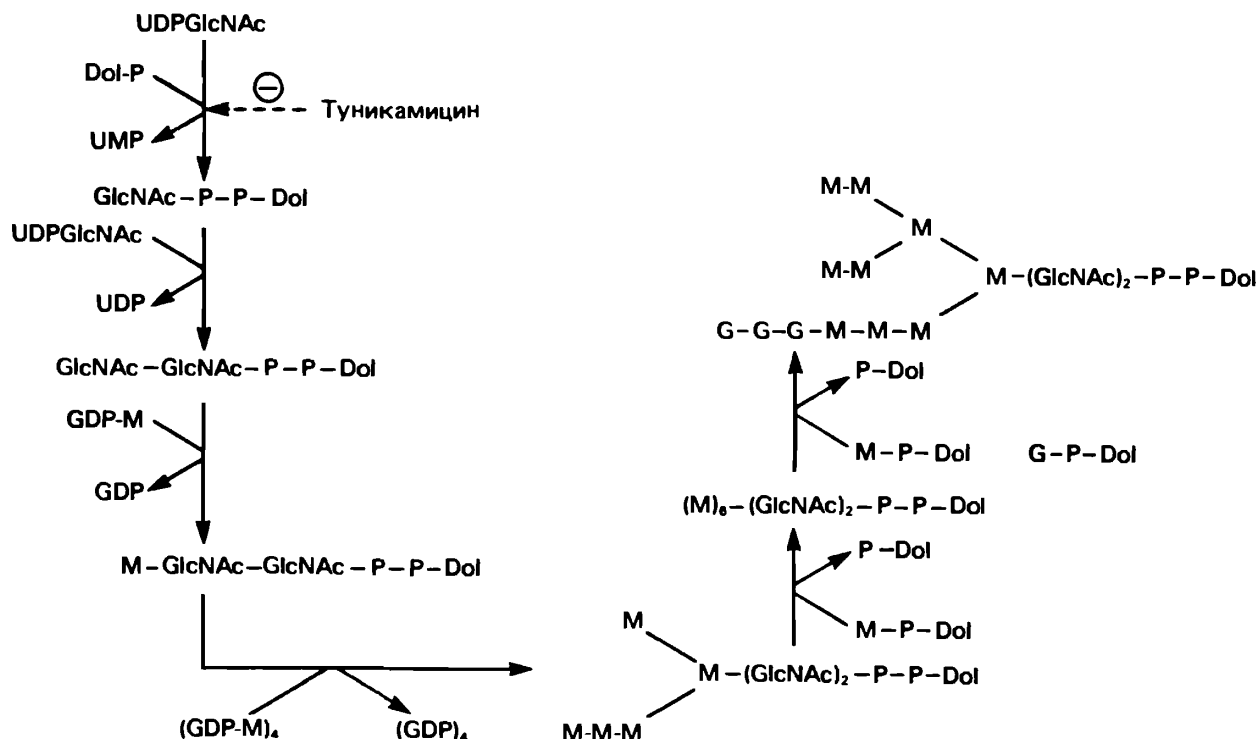


Рис. 54.6. Путь биосинтеза долихол-Р-Р-олигосахарида. Образующиеся специфические связи показаны на рис 54.7. Отметим, что внутренние маннозные остатки происходят из GDP-маннозы, тогда как донорами маннозных остатков, занимающих более наружное положение, и глюкозных остатков являются долихол-Р-манноза и долихол-Р-глюкоза. UDP — уридиндифосфат; Dol — долихол; P — фосфат; UMP — уридинмонофосфат; GDP — гуанозиндифосфат; M — манноза; G — глюкоза.

а также другие реакции, протекающие позднее, суммированы на рис. 54.6.

Суть последующих этапов сборки олигосахарид-пирофосфорил-долихола можно свести к следующему:

- второй остаток **GlcNAc** присоединяется к первому; донором и в этом случае служит UDPGlcNAc;
- происходит присоединение **пяти остатков Man** с использованием в качестве донора GDP-маннозы;
- присоединяются еще **четыре дополнительных остатка Man**, при этом донором служит Dol-P-Man, который образуется в ходе реакции



- наконец, образуются **три периферических остатка глюкозы**, их донором является Dol-P-Glc, образующийся в реакции, аналогичной представленной выше, за тем исключением, что в качестве субстратов здесь выступают Dol-P и UDPGlc.

Следует отметить, что роль доноров первых 7 сахаров (2 остатка GlcNAc и 5 остатков Man) выполняют нуклеотидсахара, а последних 7 сахаров (4 остатка Man и 3 остатка Glc) — долихолсахара. Итогом всех описанных реакций является сборка соединения, представленного на рис. 54.7 и кратко обозначенного как $(\text{Glc})_3 (\text{Man})_9 (\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$.

Олигосахарид, присоединенный к долихолу-

P—P, переносится целиком с образованием N-гликозидной связи с одним или несколькими специфическими остатками Asn акцепторного белка. Реакция катализируется мембраносвязанным ферментом **олигосахарид-трансферазой**. Трансфераза узнает и переносит любой гликолипид с общей структурой $\text{R}-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$. Гликозилирование происходит по остатку Asn трипептидной последовательности Asn-X-Ser/Thr , где X — любая аминокислота, за исключением, вероятно, пролина или аспартата. При этом предпочтительно используется трипептид, содержащийся в β -спирали. Лишь треть остатков Asn, являющихся потенциальными акцепторными центрами, реально подвергаются гликозилированию. Акцепторные белки могут принадлежать и к секреторному, и к общему мембранному классу. Цитозольные белки гликозилируются редко. Реакция переноса и последующие процессы в ходе гликозилирования N-связанных гликопротеинов, а также их субклеточная локализация представлены на рис. 54.8.

Другим продуктом олигосахарид-трансферазной реакции является долихол-Р-Р, который затем превращается в долихол-Р под действием фосфатазы. Долихол-Р может вновь служить акцептором для синтеза следующей молекулы олигосахарид-Р-Р-долихола.

2. Процессинг олигосахаридной цепи

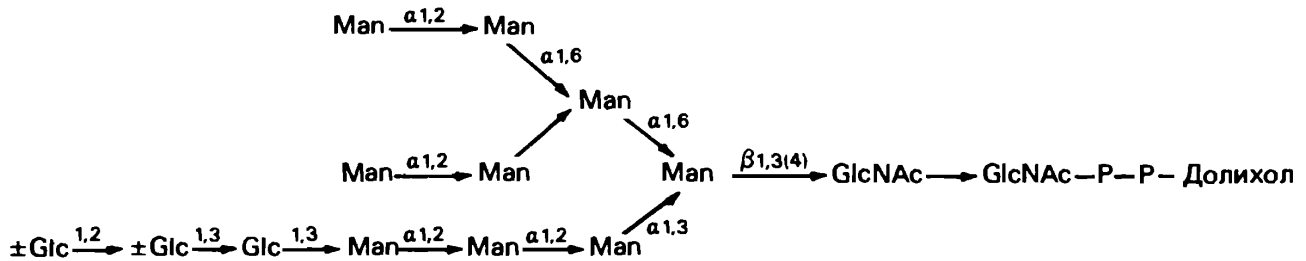
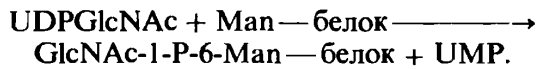


Рис. 54.7. Структура долихол-Р-Р-олигосахарида. (Reproduced, with permission, from Lennarz W. J. The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Plenum Press, 1980.)

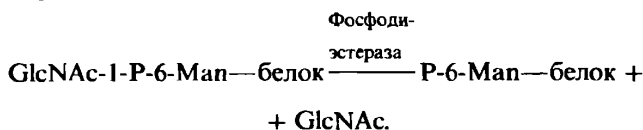
а) Ранняя стадия. Различные реакции, участвующие в этом процессинге, представлены на рис. 54.8. Олигосахарид-трансфераза катализирует реакцию 1 (см. выше). Реакции 2 и 3 сводятся к удалению одного концевых и двух соседних остатков Glc под действием глюкозидазы I и глюкозидазы II соответственно. В случае богатых маннозой гликопротеинов процесс на этом может либо остановиться, либо будут отщепляться еще и остатки Man (числом до 4-х). Однако для образования сложных цепей необходимы дополнительные стадии. Четыре внешних остатка Man должны удалиться в реакциях 4 и 5 при участии двух различных маннозидаз. В реакции 6 остаток GlcNAc присоединяется к одному из остатков Man под действием GlcNAc-трансферазы I. В результате становится возможной реакция 7, которая катализируется другой маннозидазой (α -маннозидазой II Гольджи). Она приводит к уменьшению числа остатков Man до 3 (рис. 54.4).

Важный дополнительный путь представлен на рис. 54.8 (реакции I и II). Он включает ферменты, предназначенные для лизосом и направляемые в них специфическим химическим маркером. В реакции I остаток GlcNAc-1-P присоединяется к 6-му атому углерода одного или нескольких специфических остатков Man этих ферментов. Реакция катализируется GlcNAc-фосфотрансферазой, использующей UDPGlcNAc в роли донора и генерирующей в качестве второго продукта UMP:

GlcNAc-фосфотрансфераза



В реакции II GlcNAc удаляется под действием фосфодиэстеразы, а остатки Man остаются фосфорилированными в 6-м положении:



Рецепторы Man-6-P, локализованные в комплексе Гольджи, связывают остаток Man-6-P этих ферментов и направляют их в лизосомы. Фибробласты

больных с I-клеточной болезнью (см. ниже) характеризуются резким дефицитом активности GlcNAc-фосфотрансферазы.

б) Поздняя стадия. Для сборки типичной сложной олигосахаридной цепи необходимо, чтобы к структуре, образовавшейся в реакции 7, были присоединены дополнительные сахара. Так, в реакции 8 к периферическому остатку Man второй ветви биантенной структуры, представленной на рис. 54.8, присоединяется второй остаток GlcNAc; фермент, катализирующий эту реакцию — GlcNAc-трансфераза II. Реакции 9, 10 и 11 состоят в присоединении к указанным местам остатков Fuc, Gal и NeuAc и катализируются соответственно фукозил-, галактозил- и сиалил-трансферазами.

Субклеточная локализация. Как показано на рис. 54.8, главными структурами, участвующими в процессах гликозилирования, являются эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи. Присоединение олигосахарида протекает в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме во время или после трансляции. Удаление Glc и некоторых из периферических остатков Man также происходит в эндоплазматическом ретикулуме. Комплекс Гольджи состоит из *цис*-, медиальной и *транс*-цистерн; они могут быть разделены с помощью соответствующих методов центрифугирования. Везикулы, содержащие гликопротеины, по-видимому, формируются в эндоплазматическом ретикулуме и переносятся в *цис*-цистерну Гольджи. В ряде исследований показано, что ферменты, участвующие в биосинтезе гликопротеинов, обладают различной локализацией в цистернах Гольджи. Как видно из рис. 54.8, α -маннозидаза I (катализирующая реакцию 5) присутствует главным образом в *цис*-цистернах, а фукозил-, галактозил- и сиалил-трансферазы (катализирующие реакции 9, 10 и 11) — в *транс*-цистернах комплекса Гольджи.

Регуляция гликозилирования гликопротеинов

Гликозилирование гликопротеинов — это сложный процесс, в котором принимает участие большое количество ферментов. В настоящее время уже описано 7 отдельных GlcNAc-трансфераз, а теорети-

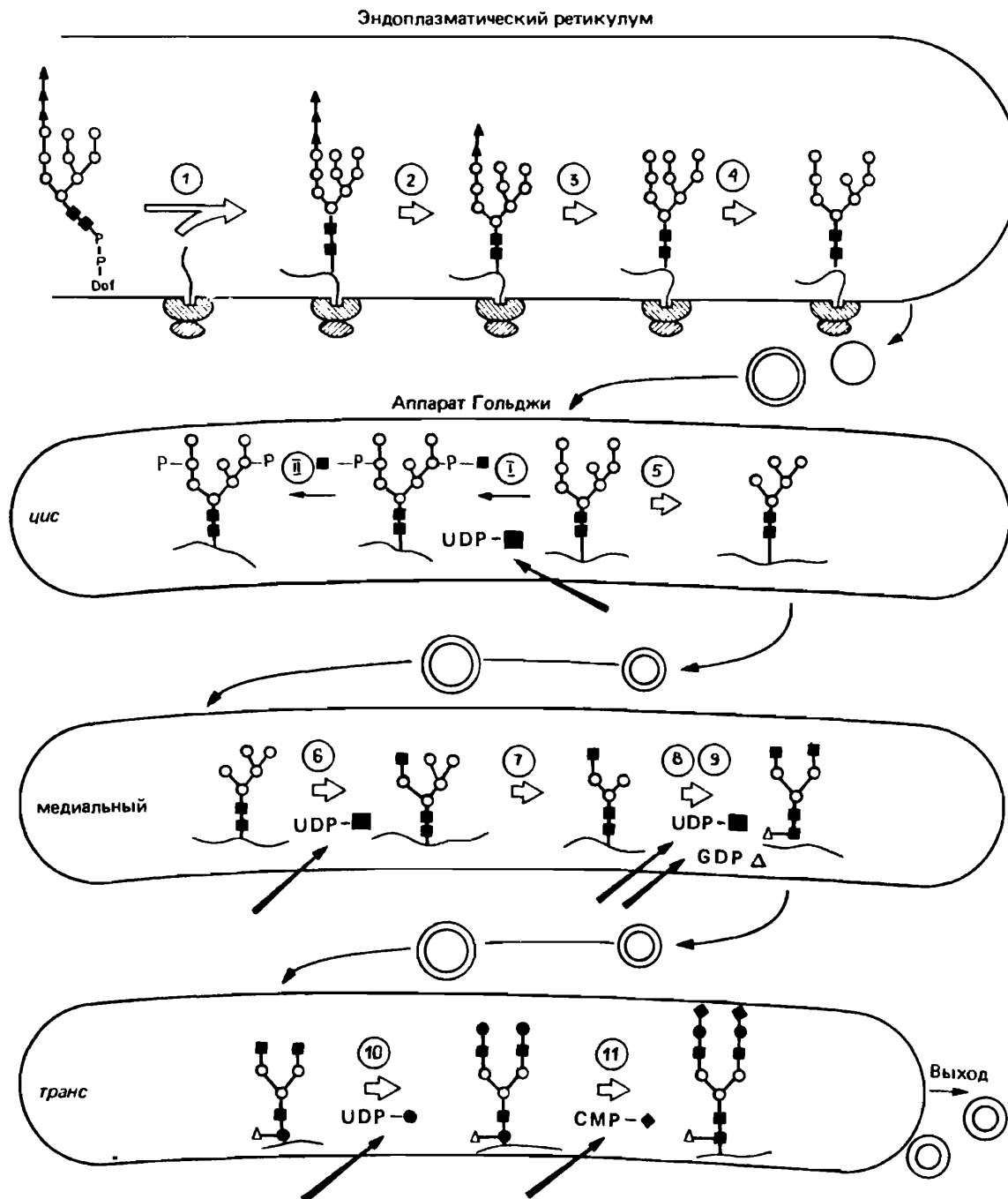


Рис. 54.8. Схема процессинга олигосахаридов. Реакция катализируется следующими ферментами: 1 — олигосахаридтрансферазой; 2 — α -глюкозидазой I; 3 — α -глюкозидазой II; 4 — ферментами эндоплазматического ретикулума — α 1,2-маннозидазой, N-ацетилглюкозаминилфосфотрансферазой, N-ацетилглюкозамин-1-фосфодиэфир- α -N-ацетилглюкозамининазой; 5 — α -маннозидазой I комплекса Гольджи; 6 — N-ацетилглюкозаминилтрансферазой I; 7 — α -маннозидазой II комплекса Гольджи; 8 — N-ацетилглюкозаминилтрансферазой II; 9 — фукозилтрансферазой; 10 — галактозилтрансферазой; 11 — сиалилтрансферазой. ■ — N-ацетилглюкозамин; ○ — манноза; ▲ — глюкоза; △ — фукоза; ● — галактоза; ◆ — сиаловая кислота. (Reproduced, with permission, from Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem., 1985, 54, 631.)

чески их может быть еще больше. Существует также множество других видов гликозилтрансфераз (например, сиалилтрансферазы). К регуляторным факторам первой стадии (т. е. сборки и переноса олигосахаридов) биосинтеза N-связанных гликопротеинов относят 1) наличие соответствующих акцепторных

центров в белках; 2) уровень Dol-P в гкани; 3) активность олигосахаридтрансферазы.

В регуляции процессинга участвуют многие факторы:

1) различные гидролазы и трансферазы играют важную роль в определении типа образующихся

олигосахаридных цепей (например, сложных или высокоманнозных). Очевидно, что в отсутствие какой-нибудь трансферазы в ткани не может синтезироваться соответствующая сахарная связь;

2) некоторые ферменты могут проявлять свою активность только после предварительного действия другого фермента. Например, для функционирования α -маннозидазы II комплекса Гольджи необходимо предварительное действие GlcNAc-трансферазы I (рис. 54.8);

3) активность различных трансфераз может периодически увеличиваться и уменьшаться в ходе развития, что отчасти объясняет, каким образом на разных стадиях жизненного цикла организма могут образовываться различные олигосахариды;

4) определенную регуляторную роль играет разная внутриклеточная локализация отдельных гликозилтрансфераз. Например, если белок предназначен для включения в мембраны эндоплазматического ретикулума [например, гидроксиметилглутарил (ГМГ)-СоА-редуктаза] он никогда не поступит в цистерны комплекса Гольджи и не будет взаимодействовать с локализованными там ферментами процессинга. В связи с этим не удивительно, что ГМГ-СоА-редуктаза принадлежит к высокоманнозным гликопротеинам;

5) еще один важный фактор — это конформация белка. Близкородственные гликопротеины вирусов, растущих в одних и тех же клетках, обладают различными типами олигосахаридных цепей. Наилучшее объяснение этого факта состоит, по-видимому, в том, что такие белки должны иметь различную конформацию, определяющую степень процессинга;

6) существуют значительные различия в наборе ферментов процессинга в клетках разных видов. Олигосахариды вируса Sindbis варьируют (от богатых маннозой до сложных) в зависимости от типа клетки хозяина, в которой растет этот вирус;

7) в настоящее время большое внимание привлекают исследования активности ферментов процессинга гликопротеинов в различных типах раковых клеток. Показано, например, что данные клетки синтезируют олигосахаридные цепи, отличающиеся от таковых в здоровых клетках (обладающие высокой разветвленностью). Особый интерес представляет корреляция активности отдельных ферментов процессинга с метастатическими свойствами некоторых типов опухолевых клеток (см. гл. 57).

Ингибиторы процессов, участвующих в гликозилировании

Известен ряд соединений, ингибирующих различные реакции процессинга гликопротеинов. Наиболее известные среди них — туникамицин, дезоксиноджимицин и свайнсонин. Ингибируемые ими реакции указаны в табл. 54.6. Перечисленные агенты могут

Таблица 54.6. Три ингибитора ферментов, участвующих в гликозилировании гликопротеинов, и место их действия

Ингибитор	Место действия
Туникамицин	Ингибирует катализируемое ферментом присоединение GlcNAc к долихолу-Р, первый этап в биосинтезе олигосахарид-Р—Р-долихола
Дезоксиноджимицин	Ингибитор глюкозидаз I и II
Свайнсонин	Ингибитор маннозидазы II

быть использованы в эксперименте для подавления различных стадий биосинтеза гликопротеинов и изучения влияния на него специфических сдвигов, вызываемых этими соединениями. Например, если клетки растут в присутствии туникамицина, гликозилирование их N-связанных гликопротеинов не происходит. В некоторых случаях отмечается увеличение чувствительности таких белков к протеолизу. Ингибирование гликозилирования, по-видимому, не оказывает существенного влияния на секрецию гликопротеинов, которая остается нормальной.

I-КЛЕТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ

Как отмечалось выше, одна из функций Man-6-P — распознавать и направлять ферменты лизосом к этим органеллам. Этот факт был установлен при изучении культивируемых фибробластов, полученных от пациентов с I-клеточной болезнью (клетки с включениями — inclusion cell). I-Клеточная болезнь — это редкое нарушение, при котором в культивируемых клетках отсутствуют почти все обычные для них лизосомные ферменты и вследствие этого накапливается множество различных видов недеградированных молекул. В то же время в пробах сыворотки больных I-клеточной болезнью можно обнаружить высокую активность лизосомных ферментов, откуда следует, что их синтез при данном заболевании происходит, но они не достигают предназначенных для них внутриклеточных органелл. Культивируемые клетки больных способны поглощать добавляемые в культуру лизосомные ферменты, следовательно, в таких клетках присутствует нормальный рецептор для них. Установлено, что у больных I-клеточной болезнью лизосомные ферменты не распознаются, между тем у здоровых лиц функцию распознавания выполняет Man-6-P. Для культивируемых клеток больных характерна недостаточная активность GlcNAc-фосфотрансферазы, что объясняет отсутствие в лизосомных ферментах соответствующих клеток маркера Man-6-P. Таким образом, биохимические исследования данного заболевания не только позволили объяснить его природу, но также

значительно обогатили наши знания о том, каким образом вновь синтезированные белки достигают специфических органелл, в данном случае лизосом.

АНТИГЕНЫ ГРУПП КРОВИ

Антигены группы крови—это олигосахариды, представляющие особый интерес для медицины. Их структуру и синтез следует рассмотреть подробно. В 1900 г. Ландштейнер описал группы крови АВО. На сегодняшний день известно более 20 систем групп крови, экспрессирующих более 160 различных антигенов. В наибольшей степени изучены группы крови АВН(О) и система Льюиса (Le). Эти антигены связаны в эритроцитах со специфическими мембранными белками О-гликозидными связями; самым проксимальным сахарным остатком является при этом GalNAc. Специфические олигосахариды, образующие данные антигены, присутствуют в 3-х формах: 1) в виде гликофинголипидов и гликопротеинов на поверхности эритроцитов и других клеток; 2) в виде олигосахаридов в молоке и моче и 3) в виде олигосахаридов, связанных с муцинами, секретируемыми в желудочно-кишечном, мочеполовом и дыхательном трактах.

Существуют 4 независимые системы генов, связанные с экспрессией этих олигосахаридных антигенов (табл. 54.7); здесь будут рассмотрены только 3 из них.

Н-ЛОКУС

Н-локус кодирует в гематопозитических тканях фукозилтрансферазу, присоединяющую остаток фукозы через α-1, 2-связь к остатку Gal, который в свою очередь присоединяется к олигосахариду при помощи β 1,4-или β 1,3-связи. Фукозилтрансфераза катализирует реакцию



Таблица 54.7. Четыре независимые системы генов, обуславливающие экспрессию антигенов групп крови АВН(О) и Льюиса (Le)

Генетический локус	Аллели
Н	H,h
Секреторный	Se,se
АВО	A,B,O
Льюиса	Le,le

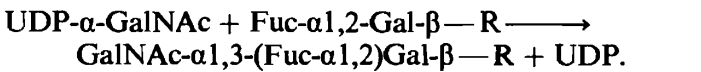
Продукт этой реакции—Fuc-α1,2-Gal-β— R —служит предшественником как А-, так и В-олигосахаридных антигенов эритроцитов. Аллель h Н-локуса кодирует неактивную фукозилтрансферазу; следовательно, у лиц с генотипом hh этот необходимый предшественник не образуется и они имеют группу крови О, хотя гены активных А- или В-гликозилтрансфераз у таких индивидов могут присутствовать.

СЕКРЕТОРНЫЙ ЛОКУС

Секреторный локус (Se) кодирует специфическую Fuc-трансферазу в секреторных органах, таких, как экзокринные железы, но не в эритроцитах. В соответствии с этим, например, у лиц с генотипом SeSe или Sese в слюнных экзокринных железах будет синтезироваться предшественник А- и В-антигенов и при наличии специфических А- или В-трансфераз у них будут секретироваться антигены А или В (или те и другие) (табл. 54.8). У лиц с генотипом sese секрета А- или В-антигенов не будет иметь места, но при наличии Н-аллеля и аллелей А или В их эритроциты смогут экспрессировать А, В или оба антигена.

ЛОКУС АВО

Локус АВО кодирует 2 специфические трансферазы, функция которых состоит в переносе определенных компонентов Gal к олигосахаридному предшественнику Fuc-α1,2-Gal-β— R, образуемому при действии фукозилтрансферазы, кодируемой аллелями Н или Se. А-специфическая трансфераза осуществляет реакцию



В-специфическая трансфераза катализирует реакцию

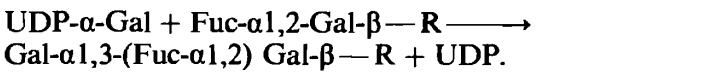


Таблица 54.8. Экспрессия антигенов А,В

Генотипы			Фенотипы	
Локус АВО	Локус Н	Секреторный локус	Эритроциты	Секреты
ОО	Любой	Любой	О	О
А и (или) В	НН или Нh	SeSe или Sese	А и (или)В	А и (или) В
А и (или) В	НН или Нh	sese	А и (или) В	О
А и (или) В	h h	Любой	О	О

В соответствии с этим у лиц, имеющих в генотипе А-аллель, компонент GalNAc будет присоединяться к предшественнику, генерируемому 1,2-Фус-трансферазой, а у индивидов, несущих В-аллель, на тот же самый предшественник будет переноситься компонент Gal. Лица, в генотипе которых присутствуют оба аллеля, способны синтезировать оба олигосахарида: один с GalNAc, а другой — с Gal-остатками на невосстанавливаемом конце. У лиц, лишенных и А-, и В-аллелей (гомозиготы ОО), не будет происходить присоединения к предшественнику ни GalNAc, ни Gal. Анти-А-антисыворотка, впервые описанная Ландштейнером, распознает специфический олигосахарид, содержащий GalNAc на невосстанавливаемом конце. Анти-В-антисыворотка распознает близкородственный олигосахарид, содержащий на невосстанавливаемом конце остаток Gal. При отсутствии на невосстанавливаемом конце олигосахарида обоих остатков (и GalNAc, и Gal) он не будет идентифицирован ни одной из указанных антисывороток, и антиген группы крови классифицируют как тип О. Очевидно, что для лиц с генотипом hh, исключая присоединение остатка Fuc к соответствующему Gal-β — R-олигосахариду, характерна неспособность к экспрессии А- или В-антигенных детерминант, и они также обладают группой крови О.

ПРОТЕОГЛИКАНЫ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ

Протеогликаны и гликопротеины — это молекулы, состоящие из белков с ковалентно присоединенными к ним олигосахаридными или полисахаридными цепями. Различие между протеогликанами и гликопротеинами состоит в химической природе присоединенных к белку полисахаридов. В протеогликанах каждый полисахарид состоит из **повторяющихся дисахаридных единиц, в которых всегда присутствуют Д-глюкозамин или Д-галактозамин**. Каждый дисахаридный компонент протеогликановых полисахаридов (за исключением кератансульфата) содержит уроновую кислоту — **Л-глюкуроновую кислоту (GlcUA) или ее 5-эпимер, Л-идуруновую кислоту (IdUA)**. За исключением гиалуриновой кислоты, все полисахариды протеогликанов содержат **сульфатные группы** в виде или О-эфиров, или N-сульфата (в гепарине или гепаринсульфате).

Существуют 3 типа связей протеогликановых полисахаридов с их полипептидной цепью:

1) О-гликозидная связь между Xyl и Ser, **характерная только для протеогликанов**; 2) О-гликозидная связь между GalNAc и Ser(Thr), присутствующая в кератансульфате II; 3) N-гликозиламинная связь между GlcNAc и амидным азотом Asn.

Пути образования полисахаридных цепей полностью идентичны путям, по которым происходит рост олигосахаридных цепей гликопротеинов. UDP-Xyl-трансфераза присоединяет Xyl нуклеотидного сахара к Ser с возникновением Xyl-Ser-О-гликозидной связи. Образование О-гликозидной связи между GalNAc и Ser (или Thr), вероятно, осуществляется аналогичной UDPGalNAc-трансферазой. N-гликозидная связь между GlcNAc и амидным азотом Asn почти наверняка образуется при участии липид-связанного полисахарида, долинх-Р — Р-полисахарида, который, как отмечалось выше, ответствен за транспорт преобразованного олиго- или полисахарида в процессе образования гликопротеинов. Однако детали этой реакции в ходе синтеза протеогликанов пока не установлены.

Процесс элонгации цепи протекает при участии нуклеотидсахаров, действующих в качестве доноров. Реакции регулируются в первую очередь субстратной специфичностью отдельных гликозилтрансфераз. Здесь вновь проявляется принцип «один фермент — одна связь». Специфичность реакций зависит от нуклеотидсахарного донора, акцепторного олигосахарида и от аномерной конфигурации и положения связи. Ферментативные системы, участвующие в элонгации цепи, обладают способностью очень точно воспроизводить сложные полисахариды.

Завершение роста полисахаридной цепи является результатом следующих феноменов: 1) кэпирующего эффекта **сиалилирования** специфическими сиалилтрансферазами; 2) сульфирования, в особенности в 4-м положении сахаров; 3) удаления данного полисахарида с того места на мембране, где протекает катализ.

После образования полисахаридной цепи происходят многочисленные химические модификации, такие, как включение сульфатных групп в GalNAc-компоненты хондроитинсульфата и дерматансульфата и эимеризация остатка GlcUA в остаток IdUA в гепарине и гепарансульфате.

Важным аспектом метаболизма протеогликанов является их **деградация**. Наследственные дефекты деградации полисахаридных цепей протеогликанов лежат в основе группы заболеваний, известных как **мукополисахаридозы и муколипидозы**, которые обсуждаются ниже и в гл. 14. Эти нарушения катаболизма способствовали изучению специфических ферментов деградации и их субстратов. Существует ряд экзогликозидаз, осуществляющих ступенчатое отщепление сульфатных компонентов и гликозильных групп. Кроме того, имеются эндогликозидазы, которые присутствуют в нормальных условиях и обладают различной специфичностью. Например, широко распространенный фермент **гиалурионидаза** расщепляет N-ацетилгексозаминовые связи в гиалуриновой кислоте и хондроитинсульфатах.

Известно **7 типов полисахаридов** (гликозамино-

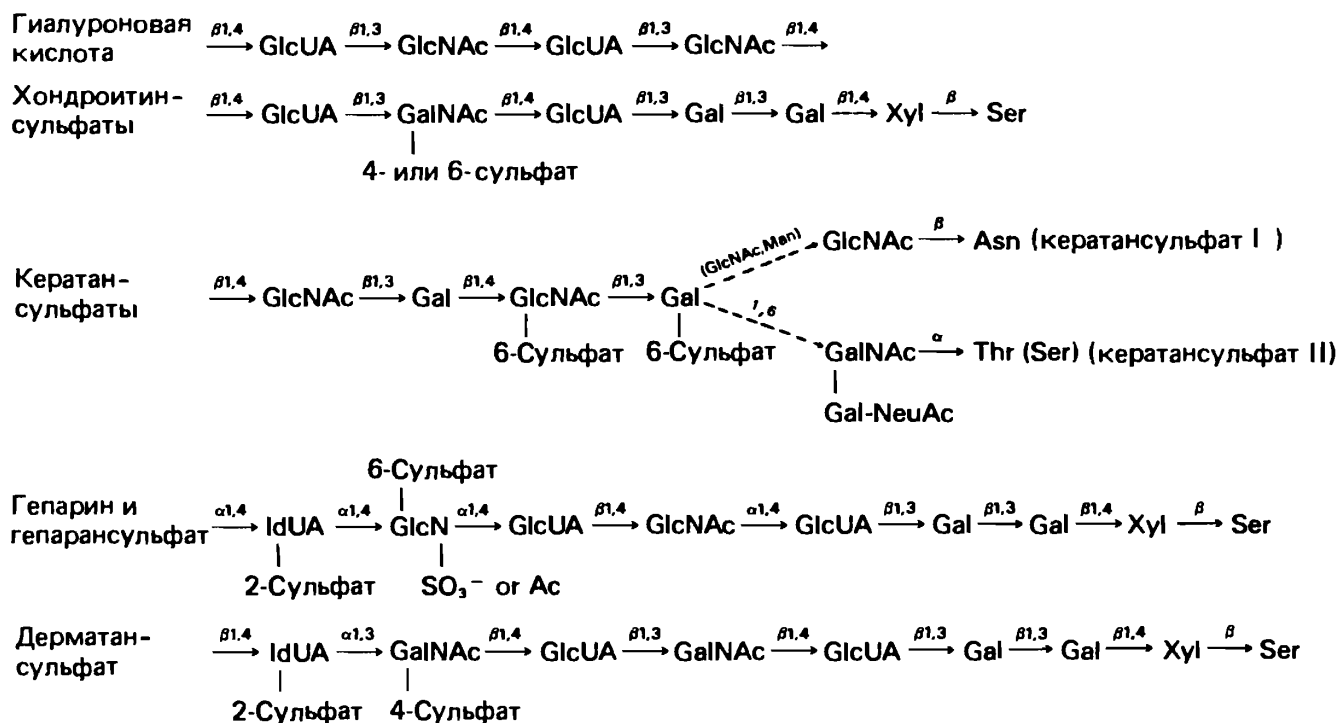


Рис. 54.9. Обобщенная структура протеогликанов и гликозаминогликанов (GlcUA—D-глюкуроновая кислота; IdUA—L-идуронозная кислота; GlcN—D-глюкозамин; GalN—D-галактозамин; Ac—ацетил; Gal—D-галактоза; Xyl—D-ксилоза; Ser—L-серин; Thr—L-треонин; Asn—L-аспарагин; Man—D-манноза; NeuAc—N-ацетилнейраминная кислота). Схема носит качественный характер и не отражает, например, состав уроновых кислот гибридных полисахаридов, таких, как гепарин и дерматансульфат, которые содержат и L-идуриновую, и D-глюкуроновую кислоты. Нельзя считать, что указанные заместители непременно присутствуют во всех случаях: так, в гепарине большинство остатков идуриновой кислоты несут 2-сульфатную группу, тогда как в дерматансульфате сульфирована значительно меньшая доля этих остатков. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Lennarz W. J. The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, 1980.)

гликанов), соединяющихся с белками в составе протеогликанов. Шесть из них обладают родственной структурой и содержат остатки уроновой кислоты и гексозамина, которые перемежаются в повторяющихся дисахаридных компонентах; исключение составляет кератансульфат, лишенный уроновой кислоты. Все они, кроме гиалуроновой кислоты, содержат сульфированные сахара и ковалентно присоединены к белкам. Указанные 7 типов полисахаридов могут различаться по составу входящих в них мономеров, гликозидным связям, а также по количеству и локализации сульфатных заместителей.

Все гликозаминогликаны являются полианионами благодаря присутствию в их структурах кислых сульфатных групп или карбоксильных групп уроновых кислот. С этой особенностью гликозаминогликанов связаны многие их функциональные свойства.

Структуры 7 гликозаминогликанов, входящих в состав протеогликановых молекул, представлены на рис. 54.9.

Гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота представляет собой неразветвленную цепь из повторяющихся дисахаридных ком-

понентов, содержащих GlcUA и GlcNAc. Твердые доказательства связи гиалуроновой кислоты с молекулой белка (которые имеются для других полисахаридов соединительной ткани) отсутствуют, но, вероятно, эта кислота подобно другим гликозаминогликанам, синтезируется в составе протеогликанов. Гиалуроновая кислота присутствует у бактерий и широко распространена в различных тканях животных, включая синовиальную жидкость, стекловидное тело глаза и рыхлую соединительную ткань.

Хондроитинсульфаты

Хондроитинсульфаты—это протеогликаны, являющиеся важнейшим компонентом хряща. Полисахарид связывается с белком О-гликозидной связью Xyl-Ser. Данные о структуре хондроитинсульфатов суммированы на рис. 54.9. Повторяющийся дисахаридный компонент очень сходен с таковым в гиалуроновой кислоте, за тем исключением, что гексозамин представлен GalNAc, а не GlcNAc. Однако и в хондроитинсульфатах, и в гиалуроновой кислоте уроновая кислота представлена GlcUA, а положения связей и аномерные конфигурации у них одни и те же. GalNAc хондроитинсульфатов содержит суль-



Рис. 54.10. Электронная микрофотография протеогликанового агрегата средней величины; особенно хорошо видны субъединицы протеогликана и волокнистая основа. (Reproduced, with permission, from Rosenberg L., Hellman W., Kleinschmidt A. K. Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 1877.)

фатный заместитель в положении 4 или 6. Как правило, оба заместителя присутствуют в одной и той же молекуле, но при разных моносахаридных остатках. На дисахаридную единицу приходится в среднем примерно один сульфатный заместитель. Каждая полисахаридная цепь содержит около 40 повторяющихся дисахаридных компонентов и имеет молекулярную массу, близкую к 20 000. В результате связывания множества таких цепей с одной белковой молекулой образуются высокомолекулярные протеогликаны. Молекулярная масса хондроитинсульфата носового хряща составляет около $2,5 \times 10^6$.

Хондроитинсульфаты прочно связываются с гиалуроновой кислотой при помощи двух **связывающих белков**, образуя в соединительной ткани очень большие агрегаты. Эти агрегаты можно наблюдать в электронном микроскопе (рис. 54.10); на рис. 54.11 дано их схематическое изображение.

Связывающие белки обладают сильной гидрофобностью и взаимодействуют и с гиалуроновой кислотой, и с протеогликаном.

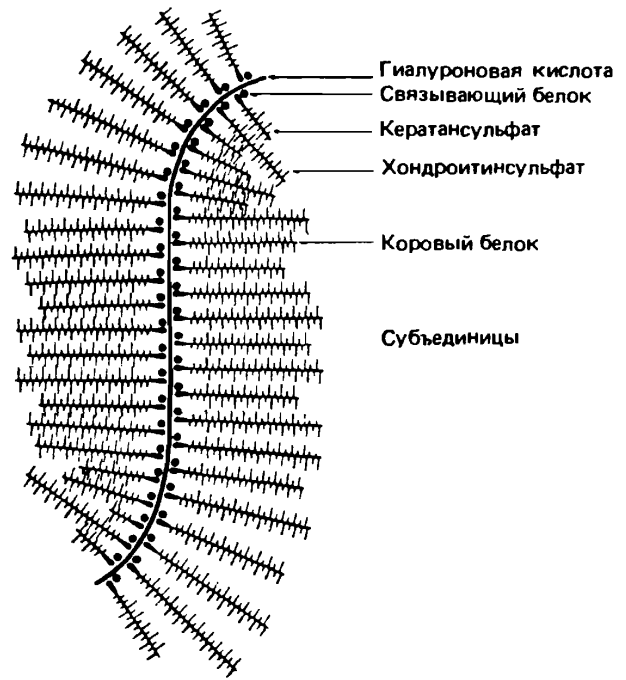


Рис. 54.11. Схематическое изображение протеогликанового агрегата. (Reproduced, with permission, from Lennarz W. J. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980.)

Хондроитинсульфаты содержат 6 типов межсахаридных связей, и их синтез поэтому протекает с участием 6 различных гликозилтрансфераз — по одному ферменту для каждого типа связей. Кроме того, имеются 2 вида сульфатных эфиров с сульфатными группами в 4- или 6-м положениях. Процессы эстерификации осуществляются двумя сульфотрансферазами, сульфат-содержащим субстратом которых служит 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС).

Кератансульфат I и кератансульфат II

Как показано на рис. 54.9, кератансульфаты состоят из повторяющихся дисахаридных компонентов **Gal-GlcNAc** и содержат сульфаты в 6-м положении остатков GlcNAc и иногда — Gal. Полисахарид в кератансульфате I присоединен к полипептидной цепи связью **GlcNAc-Asp**. Большие количества этого кератансульфата присутствуют в роговице.

Кератансульфат II — протеогликан скелета, содержащийся в нем вместе с хондроитинсульфатом, связан с гиалуроновой кислотой рыхлой соединительной ткани. Его полисахаридные цепи присоединяются к полипептидной цепи с помощью связи **GalNAc-Thr(Ser)**.

Гепарин

Гепарин представляет собой классический протеогликан, в котором несколько полисахаридных це-

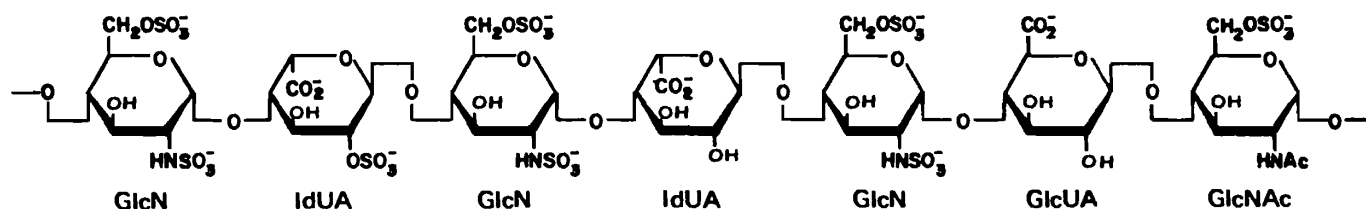


Рис. 54.12. Структура гепарина. Отрезок полимера иллюстрирует типичные структурные особенности гепарина, однако последовательность различным образом замещенных повторяющихся дисахаридных компонентов выбрана произвольно. Кроме того, могут присутствовать не-О-сульфированные или 3-О-сульфированные глюкозаминовые остатки. (Modified redrawn, and reproduced with permission, from Lindahl U. et al. Structure and biosynthesis of heparin-like polysaccharides. *Fed. Proc.*, 1977, 36, 19.)

пей связаны с общим белковым ядром. Он обнаруживается в гранулах тучных клеток и, таким образом, локализован **внутриклеточно**. Гепарин обладает и другими структурными и функциональными особенностями, и некоторые из них имеют значение для медицины. Характерные особенности структуры гепарина представлены на рис. 54.12. Повторяющийся дисахаридный компонент содержит **глюкозамин (GlcN)** и **уроновую кислоту**. Большинство аминогрупп остатков GlcN присутствует в N-сульфированной форме, но имеется и небольшое количество **ацетилированных** аминогрупп. GlcN содержит также C₆-сульфатный эфир.

Около 90% уроновой кислоты — это IdUA и лишь 10% приходится на GlcUA. Первоначально остатки уроновой кислоты представлены в виде GlcUA, но в дальнейшем, после образования полисахарида 5-эпимераза превращает почти 90% остатков GlcUA в остатки IdUA, последние часто подвергаются сульфированию во 2-м положении.

Белковая молекула протеогликана гепарина уникальна в том отношении, что она состоит только из сериновых и глициновых остатков. Приблизительно две трети сериновых остатков соединены с полисахаридными цепями; их молекулярная масса составляет обычно 5000—15 000, но иногда достигает 100 000.

Полисахаридные цепи гепариновых протеогликанов после полимеризации претерпевают ряд модификаций:

- 1) первичный продукт не сульфировается, но полностью N-ацетируется с образованием полимера (GlcUA-GlcNAc)_n;
- 2) около 50% остатков GlcNAc подвергаются N-деацетилированию;
- 3) свободные аминогруппы GlcN сульфировются; затем происходит дальнейшее деацетилирование примерно половины остальных групп GlcNAc;
- 4) N-сульфированный полимер становится субстратом для 5-эпимеразы, которая превращает около 90% остатков GlcUA в IdUA;
- 5) вновь образованные остатки IdUA далее подвергаются О-сульфированию в положениях C-2;
- 6) модификация завершается О-сульфированием компонентов GlcN в G-6-положениях.

Гепарансульфат

Гепарансульфат присутствует на клеточных поверхностях, представляя собой внеклеточный протеогликан. Полипептидный остов гепарансульфатного протеогликана содержит дополнительный аминокислотный компонент, отличный от такового в гепарине. В процессе модификации его полисахаридных цепей деацетилирование остатков GlcNAc происходит слабее, и поэтому он содержит меньше N-сульфатов. Поскольку 5-эпимераза (как отмечалось выше при описании модификаций гепарина) использует в качестве субстрата N-сульфатные заместители, гепарансульфат отличается от гепарина меньшим количеством остатков IdUA и большим содержанием GlcUA. В соответствии с этим преобладающей уроновой кислотой в гепарансульфате является GlcUA, а в гепарине — IdUA.

Дерматансульфат

Дерматансульфат представляет собой протеогликан, широко распространенный в тканях животных. По структуре он сходен и с хондроитинсульфатом, и с гепарансульфатом. Его отличие от хондроитинсульфата состоит в том, что вместо GlcUA, соединенной с GalNAc β-1,3-связью, он содержит IdUA, соединенную с GalNAc α-1,3-связью. Образование IdUA, как и в случае гепарина и гепарансульфата, происходит путем 5-эпимеризации GlcUA. Как и при образовании гепарина, реакция эпимеризации тесно сопряжена с сульфированием гексамина. Таким образом, дерматансульфат содержит 2 вида повторяющихся дисахаридных единиц: IdUA—GalNAc и GlcUA—GalNAc.

ДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЛИКОПРОТЕИНОВ И ПРОТЕОГЛИКАНОВ

Выяснению путей деградации (распада) гликопротеинов, протеогликанов и гликозаминогликанов в большой степени способствовало открытие недостаточности отдельных ферментов при врожденных

Таблица 54.9. Биохимические дефекты и диагностические тесты при мукополисахаридозах, муколипидозах и близких к ним нарушениях

Название	Альтернативное обозначение	Дефект фермента	Материал, используемый для определения фермента	Уровень аномального ³⁵ S-мукополисахарида в фибробластах	Метаболиты в моче
Мукополисахаридозы Хурлера, Шейе, Хурлера/Шейе Хантера	МПС I	α -L-идуронидаза	Фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости	+	ДС, ГС
	МПС II	Идуронатсульфатаза	Сыворотка, фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости, амниотическая жидкость	+	ДС, ГС
Санфилиппо А	МПС IIIА	ГС-N-сульфатаза (сульфамидаза)	Фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости	+ —	ГС(±)
Санфилиппо В	МПС IIIВ	α -N-ацетилглюкозаминидаза	Сыворотка, фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости	+	ГС
Санфилиппо С Моркио	МПС IIIС	Ацетилтрансфераза	Фибробласты	+	ГС
	МПС IV	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза	Фибробласты	—	КС
Моркио-подобный Марото-Лами	Нет	β -Галактозидаза	Фибробласты	—	КС
	МПС VI	N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (арилсульфатаза В)	Фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости	+	ДС
Недостаточность β -глюкуронидазы	МПС VII	β -Глюкуронидаза	Сыворотка, фибробласты, лейкоциты, клетки амниотической жидкости	+	ДС ГС (±)
«Безымянное» нарушение	МПС VIII	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза	Фибробласты	+	ГС, КС
Муколипидозы и близкие к ним нарушения Сиалидоз	МЛ I	Сиалидаза (нейраминидаза)	Фибробласты, лейкоциты	—	ФГ
I-клеточная болезнь	МЛ II	UDP-N-ацетилглюкозамин: гликопротеин N-ацетилглюкозаминилфосфотрансфераза (кислые гидролазы, таким образом, лишаются фосфоманнозильного остатка)	Сыворотка, фибробласты, клетки амниотической жидкости	+	ФГ
Псевдохурлеровская полидистрофия	МЛ III	Подобен таковому в случае МЛII, но недостаточность неполная	Сыворотка, фибробласты, клетки амниотической жидкости	+ —	ФГ
Множественная недостаточность сульфатаз	Нет	Арилсульфатаза А и другие сульфатазы	Сыворотка, фибробласты, лейкоциты, ткани, клетки амниотической жидкости	+	ДС, ГС
Маннозидоз	Нет	α -Маннозидаза	Сыворотка, фибробласты, лейкоциты, клетки амниотической жидкости	—	ФГ

МПС — мукополисахаридоз; МЛ — муколипидоз; ДС — дерматансульфат; КС — кератансульфат; ГС — гепарансульфат; ФГ — фрагменты гликопротеинов.

нарушениях обмена веществ у человека. Значительный вклад в понимание этой проблемы внесло изучение двух групп болезней — мукополисахаридозов и муколипидозов (соединения, которые мы теперь называем протеогликанами, многие годы носили название «мукополисахариды»). В табл. 54.9 перечислены биохимические нарушения при мукополисахаридозах, муколипидозах и сходных заболеваниях.

Деградация полисахаридных цепей осуществляется **эндогликозидазами, экзогликозидазами и сульфатазами**. Каждая из этих групп ферментов обладает субстратной специфичностью, что позволяет предсказать, какая из полисахаридных цепей явится объектом разрушающего действия данной гликозидазы или сульфатазы.

Гиалуронидаза — широко распространенная эндогликозидаза, расщепляющая гексозаминидные связи. Она образует из гиалуроновой кислоты тетрасахарид со структурой $(\text{GlcUA}-\beta 1,3-\text{GlcNAc}-\beta 1,4)_2$. Гиалуронидаза действует и на **гиалуроновую кислоту**, и на **хондроитинсульфат**. Указанный выше тетрасахарид может подвергаться дальнейшей деградации под действием β -глюкуронидазы и β -N-ацетилгексозаминидазы.

β -Глюкуронидаза представляет собой экзогликозидазу, удаляющую GlcUA и IdUA с нередуцирующих концов тетрасахаридов или полисахаридов большого размера. Дисахариды, как правило, плохие субстраты для β -глюкуронидазы. Сама β -глюкуронидаза — это гликопротеин, локализуемый в лизосомах и микросомах многих клеток млекопитающих. В число ее субстратов входят **дерматансульфат, гепарансульфат, хондроитинсульфат и гиалуроновая кислота**. При наследственной недостаточности β -глюкуронидазы у больных отмечается выделение с мочой дерматансульфата, гепарансульфата и хондроитинсульфата, но не гиалуроновой кислоты. Очевидно, существуют другие пути, по которым может происходить расщепление тетрасахарида, образующегося из гиалуроновой кислоты под действием гиалуронидазы.

β -D-ацетилгексозаминидаза — экзогликозидаза, присутствующая во многих тканях млекопитающих. Она отщепляет от нередуцирующих концов полисахаридов связанные β -связью GlcNAc и GalNAc . Перечень субстратов β -D-ацетилгексозаминидазы включает **ганглиозиды и хондроитинсульфаты, гиалуроновую кислоту, дерматансульфаты и кератансульфаты I и II**. Существуют два изофермента β -D-ацетилгексозаминидазы. Изофермент А состоит из двух различных субъединиц α и β ($\alpha\beta$); в состав изофермента В входят только β -субъединицы, ($\beta\beta$). При **болезни Тей-Сакса** имеет место дефект α -субъединицы, и поэтому неактивен только изофермент А. **Болезнь Зандхоффа** характеризуется дефектом β -субъединицы, что обуславливает недостаточность обоих изотимов.

β -Галактозидазы присутствуют в животных тканях в нескольких формах. И хондроитинсульфат, и кератансульфат содержат β -галактозиды и поэтому служат субстратами для кислых галактозидаз. При недостаточности кислой β -галактозидазы наряду с G_{M1} -ганглиозидами накапливаются кератансульфат и фрагменты гликопротеинов (см. гл. 25).

α -L-идуронидаза является лизосомной гидролазой, которая удаляет остатки IdUA с нередуцирующего конца полисахаридных цепей. Недостаточность этого фермента имеет место при **синдроме Хурлера**.

В тканях млекопитающих содержатся специфические для гепарина и гепарансульфата эндогликозидазы, в первую очередь **эндоглюкуронидаза**, присутствующая в печени, слизистой кишечника, тромбоцитах и лизосомах.

Существует целый ряд специфических **сульфатаз**, которые катализируют удаление сульфатных заместителей, в том числе три арилсульфатазы: А, В и С. **Арилсульфатаза А** отщепляет Gal-3-сульфат от сульфатидов. **Арилсульфатаза В** удаляет 4-сульфат из хондроитинсульфата и дерматансульфата. Однако у больных с врожденной недостаточностью 4-сульфатазы (синдром Марото — Лами) с мочой выделяется только дерматансульфат. Существует также отличающийся от арилсульфатаз А и В фермент, который отщепляет 6-сульфат от GalNAc-6-сульфата . Дефицит этой сульфатазы имеет место у больных с синдромом Моркио. В норме она отщепляет сульфатные группы от Gal-6-сульфата и GalNAc-6-сульфата , и поэтому у больных с синдромом Моркио в моче можно обнаружить кератан- 6-сульфат и хондроитин- 6-сульфат .

Недостаточность **N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы** наблюдается при мукополисахаридозе А. Этот фермент может использовать в качестве субстратов GlcNAc-сульфат и Glc-6-сульфат .

Идуронатсульфатаза — специфический экзофермент, отщепляющий C-2-сульфат от остатков IdUA с нередуцирующих концов гепарина, гепарансульфата и дерматансульфата. Фермент присутствует в норме в сыворотке, лимфоцитах, фибробластах и амниотической жидкости. Врожденный дефицит идуронатсульфатазы вызывает **синдром Хантера**.

Специфическая **α -N-ацетилглюкозаминазидаза** может удалять α -связанные остатки GlcNAc , присутствующие в гепарине и гепарансульфате. Фермент в норме обнаруживается в фибробластах, но отсутствует при **синдроме Санфилиппо В**.

Гепаринсульфатаза (гепаран-N-сульфатаза) содержится в селезенке, легких и подвздошной кишке. Фермент отщепляет сульфат от GlcN-сульфатов с нередуцирующего конца гепарина и гепарансульфата. Фермент отсутствует при **синдроме Санфилиппо А**. После удаления сульфатов остается α -глюкозамин (GlcN) со свободной аминогруппой, ко-

торый не является субстратом для α -N-ацетилглюкозаминидазы, описанной выше. Фермент α -глюкозамин: N-ацетилтрансфераза осуществляет **реацетилирование** свободной аминогруппы GlcN с нередуцирующего конца; донором ацетила служит ацетил-CoA. В результате образуется продукт, чувствительный к действию α -N-ацетилглюкозаминидазы. При **синдроме Санфилиппо С** ацетилтрансферазная активность отсутствует.

ФУНКЦИИ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ И ПРОТЕОГЛИКАНОВ

Связывание гликозоаминогликанов с другими внеклеточными макромолекулами вносит значительный вклад в структурную организацию соединительнотканного матрикса. Гликозоаминогликаны могут взаимодействовать с внеклеточными макромолекулами, белками плазмы, компонентами клеточной поверхности и внутриклеточными макромолекулами.

Связывание гликозаминогликанов имеет обычно электростатический характер, обусловленный их выраженной полианионной природой, однако некоторые реакции связывания являются более специфичными. В целом гликозаминогликаны, содержащие IdUA, такие, как дерматансульфат и гепарансульфат, связывают белки с большим сродством, чем содержащие GlcUA в качестве единственной урановой кислоты.

Взаимодействие с внеклеточными макромолекулами

Все гликозаминогликаны, за исключением тех, в которых отсутствуют сульфатные (гиалуронат) или карбоксильные группы (кератансульфаты), при нейтральных значениях pH электростатически связываются с коллагеном. Присутствие IdUA способствует более прочному связыванию, и протеогликаны взаимодействуют с коллагеном сильнее, чем соответствующие гликозаминогликаны. С каждым коллагеновым мономером связывается от 2 до 5 полисахаридных цепей. Все растворимые коллагены (типы I, II и III) связывают хондроитинсульфатные протеогликаны.

Хондроитинсульфат и гепарансульфат специфически связываются с эластином.

Как отмечалось выше, хондроитинсульфатные и кератансульфатные цепи в составе соответствующих протеогликанов при посредстве связывающих белков образуют агрегаты с гиалуроновой кислотой. С одной молекулой гиалуроната может связываться до 100 протеогликановых молекул.

Взаимодействия с белками плазмы

В состав артериальной стенки входят протеогликаны, содержащие гиалуронат, хондроитинсульфат, дерматансульфат и гепарансульфат. Из них **в связь с липопротеинами плазмы вступает дерматансульфат**. Кроме того, дерматансульфат, по-видимому, является главным гликозаминогликаном, синтезируемым **гладкомышечными клетками артерий**. Поскольку именно эти клетки пролиферируют при атеросклеротических поражениях артерий, дерматансульфат может играть значительную роль в образовании атеросклеротических бляшек.

Хотя гепарин синтезируется и запасается в тучных клетках, он всегда тесно связан с кровеносными сосудами. В силу своего высокого отрицательного заряда (обусловленного остатками IdUA и сульфата) гепарин интенсивно взаимодействует с некоторыми компонентами плазмы. Он специфически связывает факторы свертывания крови IX и XI. Более важной для **антикоагулянтной активности** гепарина является его способность взаимодействовать с α_2 -гликопротеином плазмы, называемым антитромбином III. Стехиометрическое связывание с гепарином (1:1) значительно усиливает инактивирующее действие антитромбина III на сериновые протеазы, в частности на тромбин. Связывание гепарина с остатками Lys антитромбина III, по-видимому, вызывает конформационные изменения, благоприятствующие взаимодействию последнего с сериновыми протеазами. Эти процессы схематически изображены на рис. 54.13.

Имеющийся в продаже гепарин содержит 2 компонента — высокоаффинный и низкоаффинный, которые, вероятно, связываются с одной и той же областью молекул антитромбина III. Однако высокоаффинный гепарин обладает в 10 раз большей антикоагулянтной активностью, а также более высокой константой связывания, чем низкоаффинный. N-Десульфирование или модификация IdUA-остатков гепарина снижает его антикоагулянтную активность.

Гепарансульфат, сходный по структуре с гепарином, также обладает способностью ускорять действие антитромбина III, но по эффекту значительно уступает гепарину.

Гепарин может специфически связываться с **липопротеинлипазой**, присутствующей в стенке капилляров, и вызывать высвобождение этого фермента в кровоток. Сходным образом связывается с гепарином и поступает в кровоток печеночная липаза, но это связывание происходит с меньшим сродством, чем в случае липопротеинлипазы. Частично N-десульфированный гепарин связывается с липопротеинлипазой интенсивнее, чем с антитромбином III.

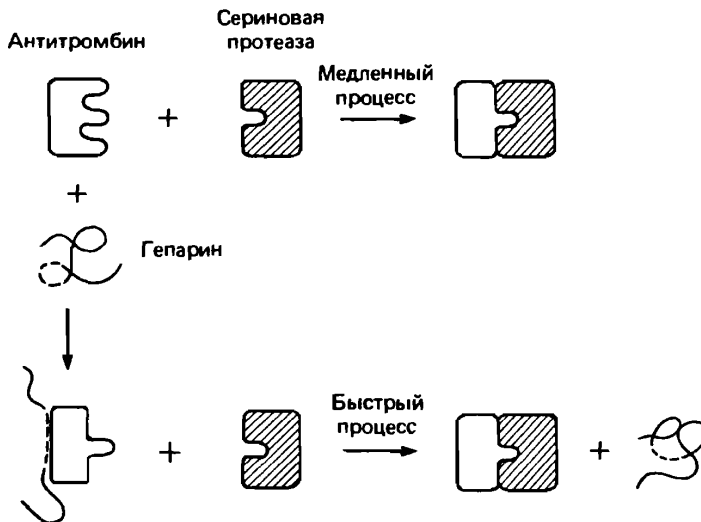


Рис. 54.13. Схематическое изображение процесса инактивации антитромбином сериновых протеаз (например, тромбина), участвующих в свертывании крови. Гепарин, по-видимому, ускоряет инактивацию, связываясь с антитромбином и вызывая в нем такие конформационные изменения, которые ускоряют взаимодействие антитромбина с тромбином. (Не исключено также связывание гепарина с тромбином.) Взаимодействие требует присутствия специфического связывающего центра (-----) в полисахаридной цепи. (Reproduced, with permission, from Lennarz W.J. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980.)

Гликозаминогликаны и молекулы клеточной поверхности

Гепарин обладает способностью связываться со многими типами клеток, включая тромбоциты, клетки эндотелия артерий и печеночные клетки. Хондроитинсульфат, дерматансульфат и гепарансульфат связываются с разными участками клеточной поверхности, например фибробластов. Именно в этих участках гликозаминогликаны и протеогликины подвергаются деградации.

Гиалуронат откладывается клетками, растущими на пластиковых подложках. Кроме того, гиалуронат, по-видимому, участвует в процессах слипания клеток друг с другом, что играет столь важную роль в росте и развитии многоклеточных организмов.

Некоторые протеогликины, вероятно, служат рецепторами и переносчиками макромолекул, в том числе липопротеинов, липаз и антитромбина. Протеогликины могут принимать участие в регуляции роста клеток, в межклеточных взаимодействиях и защите рецепторов клеточной поверхности.

Гликозаминогликаны и внутриклеточные макромолекулы

Протеогликины и их гликозаминогликановые компоненты кроме взаимодействия с ферментами, участвующими в их биосинтезе и деградации, оказы-

вают влияние на синтез белка и внутриядерные функции. В частности, гепарин может действовать на структуру хроматина и активировать ДНК-полимеразу *in vitro*. В какой степени эти эффекты являются физиологическими, неясно. Гликозаминогликаны присутствуют в значительных количествах в ядрах различных типов клеток, и существуют данные, подтверждающие роль гепарансульфата в развитии эмбрионов морского ежа.

Хондроитинсульфаты, дерматансульфаты и гепарин могут активировать или ингибировать кислые гидролазы лизосом. Эти ферменты способны формировать природные комплексы с гликозаминогликанами с образованием защищенных или неактивных форм.

Многочисленные гранулы, служащие для запасаения или секреции продуктов, такие, как хромоаффинные гранулы мозгового слоя надпочечников, пролактиновые секреторные гранулы гипофиза и базофильные гранулы тучных клеток, содержат сульфированные гликозаминогликаны. Гликозаминогликан-пептидные комплексы, присутствующие в этих гранулах, могут играть роль в высвобождении биогенных аминов.

ЛИТЕРАТУРА

- Buckwalter J. A., Rosenberg L. C. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 9830.
- DiNatale P., Neufeld E. F. The biochemical diagnosis of mucopolysaccharidoses, mucopolipidosis and related disorders. In: *Perspectives in Inherited Metabolic Diseases*, Vol. 2, Barra B. et al. (eds.), Editiones Ermes (Milan), 1979.
- Höök M. et al. Cell-surface glycosaminoglycans, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 847.
- Hubbard S. C., Ivatt R. J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 555.
- Jagues L. B. Heparin: an old drug with a new paradigm. *Science*, 1979, **206**, 528.
- Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 631.
- Kornfeld S., Sly W. S. Lysosomal storage defects, *Hosp. Pract.* (Aug), 1985, **20**, 71.
- Lennarz W. J. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum Press, 1980.
- Poole A. R. et al. Proteoglycans from bovine nasal cartilage: Immunochemical studies of link protein, *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 9295.
- Reitman M. L. et al. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity, *J. Clin. Invest.*, 1981, **67**, 1574.
- Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and heterogeneity of protein-bound oligosaccharides, *Biochem. Cell Biol.*, 1986, **64**, 163.
- Snider M. D., Rogers O. C. Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis, *Cell*, 1984, **36**, 753.

Плазма крови и процесс свертывания

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Кровь — это ткань, клетки которой циркулируют в фактически замкнутой системе кровеносных сосудов. Кровь состоит из твердых элементов — красных (эритроцитов) и белых (лейкоцитов) кровяных клеток и тромбоцитов, взвешенных в жидкой среде, называемой плазмой. В дальнейшем мы рассмотрим важнейшие функции крови (в особенности плазмы), обеспечивающие нормальную жизнедеятельность организма.

Кровь обладает способностью свертываться (коагулировать); остающаяся при этом жидкая фаза называется сывороткой. Плазма содержит ряд факторов, которые расходуются в процессе свертывания и поэтому в сыворотке отсутствуют. Сыворотка содержит продукты деградации этих факторов свертывания, а в плазме этих продуктов в норме нет.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Фундаментальная роль крови, состоящая в поддержании гомеостаза, а также доступность этой ткани для исследований — сделали кровь важнейшим объектом биохимии. Наиболее изученные компоненты крови — это гемоглобин, альбумин, иммуноглобулины, а также разнообразные факторы свертывания. При различных заболеваниях наблюдаются изменения в уровне белков в плазме; эти изменения можно обнаружить при электрофорезе. Важным диагностическим признаком при некоторых патологических состояниях (см. приложение) является нарушение активности ряда ферментов. Лечение больных, страдающих геморрагиями и тромбозами, требует ясного понимания процессов свертывания крови и фибринолиза.

ФУНКЦИИ КРОВИ

Почти все функции крови (за исключением специфических клеточных, таких, как перенос кислорода или иммунологическая защита) осуществляются плазмой или ее компонентами. Основные функции

крови следующие: 1) дыхание — транспорт кислорода от легких к тканям и перенос CO_2 от тканей к легким; 2) питание — транспорт поглощенных питательных веществ; 3) выделение — перенос конечных продуктов метаболизма в почки, легкие, кожу, кишечник для последующего их выведения; 4) поддержание в организме нормального кислотно-щелочного равновесия; 5) регуляция водного баланса (кровь влияет на обмен воды между циркулирующей жидкостью и тканевой жидкостью); 6) регуляция температуры тела путем распределения тепла; 7) защита от инфекций (осуществляется лейкоцитами и циркулирующими в плазме антителами); 8) транспорт гормонов и регуляция метаболизма; 9) транспорт различных метаболитов.

Плазма содержит воду, электролиты, метаболиты, питательные вещества, белки и гормоны. Содержание воды и электролитов в плазме практически такое же, как и во всех внеклеточных жидкостях.

БЕЛКИ ПЛАЗМЫ

Общее количество белков в плазме — 7—7,5 г/дл (г%). Таким образом, белки составляют основную часть твердых веществ плазмы. Белки плазмы — это очень сложная смесь, включающая не только простые белки, но и смешанные или конъюгированные молекулы, например гликопротеины и различные типы липопротеинов.

Разделение сложной смеси белков на индивидуальные белки осуществляется при помощи растворителей и (или) электролитов; при этом выделяют различные белковые фракции в зависимости от их растворимости. Это свойство белков лежит в основе так называемых методов высаливания, часто используемых в клинических лабораториях. Белки плазмы осаждают при различных концентрациях сульфата натрия или сульфата аммония. При этом белки разделяют на три основные группы: фибриноген, альбумин и глобулин.

Плазма крови — это по определению внутрисосудистая жидкость. В артериальной области крово-

обращения внутрисосудистое гидростатическое давление, создаваемое сердцем и крупными сосудами, на 20—25 мм рт. ст. превышает гидростатическое давление в тканях. Выходу слишком большого количества жидкости из сосудов во внесосудистое тканевое пространство противодействует внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление, создаваемое белками плазмы.

Альбумин

Концентрация альбумина в плазме выше, чем концентрация двух других главных белков, а его молекулярная масса наименьшая (рис. 55.1). Именно этот белок вносит основной вклад во внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление. Альбумин синтезируется в печени, и его единственная цепь состоит из 610 аминокислот. Наряду с участием в поддержании коллоидно-осмотического давления альбумин служит еще молекулой-переносчиком. Он транспортирует билирубин, жирные кислоты, многие лекарственные вещества и элементы, содержащиеся в плазме в следовых концентрациях. Некоторые из его лиганд-связывающих участков являются высокоспецифичными и насыщаемыми, другие же обладают этими свойствами в значительно меньшей степени. При гипоальбуминемии (низкой концентрации альбумина в сыворотке), которая сопровождается заболеванием печени и почек, наблюдается отек

мягких тканей. Это связано с понижением внутрисосудистого коллоидно-осмотического давления.

Глобулины

Как отмечалось в гл. 5, глобулины — это белки, нерастворимые в воде, но растворимые в растворах солей. Глобулины сыворотки — это гетерогенная сложная смесь белковых молекул, обычно называемых α -, β - и γ -глобулинами (иногда дополнительно вводят цифровые обозначения); данная классификация основана на электрофоретической подвижности (рис. 55.2). Более рациональная классификация базируется на структуре и функциях глобулинов.

Гликопротеины содержат ковалентно связанные фрагменты олигосахаридов (см. гл. 54). Эти белки обнаруживаются во фракциях α_1 - и α_2 -глобулинов. Среди гликопротеинов имеется много специализированных белков с функциями, которые изучены в различной степени.

Липопротеины содержат липиды, обычно нековалентно связанные с белковой молекулой (см. гл. 26). Липопротеины мигрируют при электрофорезе вместе с α - или β -глобулинами. Чем выше содержание липидов и чем ниже содержание белков в липопротеинах, тем ниже их удельный вес. Липопротеины служат переносчиками различных липидов и соединений, растворяющихся в них, но не в водной фазе плазмы.

Некоторые белки, связывающие металлы (металл-связывающие белки), например трансферрин, обладают свойствами глобулинов и переносят элементы, находящиеся в плазме в следовых количествах.

Плазма в норме содержит ряд ферментов, в частности фосфатазы, липазы, лактатдегидрогеназу, амилазу и ферроксидазу (церулоплазмин). При разрушении тканей или при нарушении структуры мембран внутриклеточные ферменты высвобождаются во внутриваскулярное пространство. В таких случаях их каталитическая активность может служить и количественным показателем степени повреждения тканей. В клинической медицине особенно важным является определение в сыворотке трансаминаз, креатинкиназ и кислых фосфатаз.

В плазме циркулируют полипептидные гормоны. Гидрофобные стероиды и 1,25-дигидроксивитамин D₃ циркулируют в связанном виде (т. е. транспортируются специфическими переносчиками).

Важными компонентами плазмы являются иммуноглобулины, выполняющие роль эффекторов гуморальной иммунной системы, и фибриноген — предшественник фибрина, образующего кровяные сгустки. Оба этих класса плазменных белков будут рассмотрены более подробно.

Липопротеины плазмы обсуждаются в гл. 26.



Рис. 55.1. Относительные размеры и молекулярные массы молекул белков крови (Oncley).

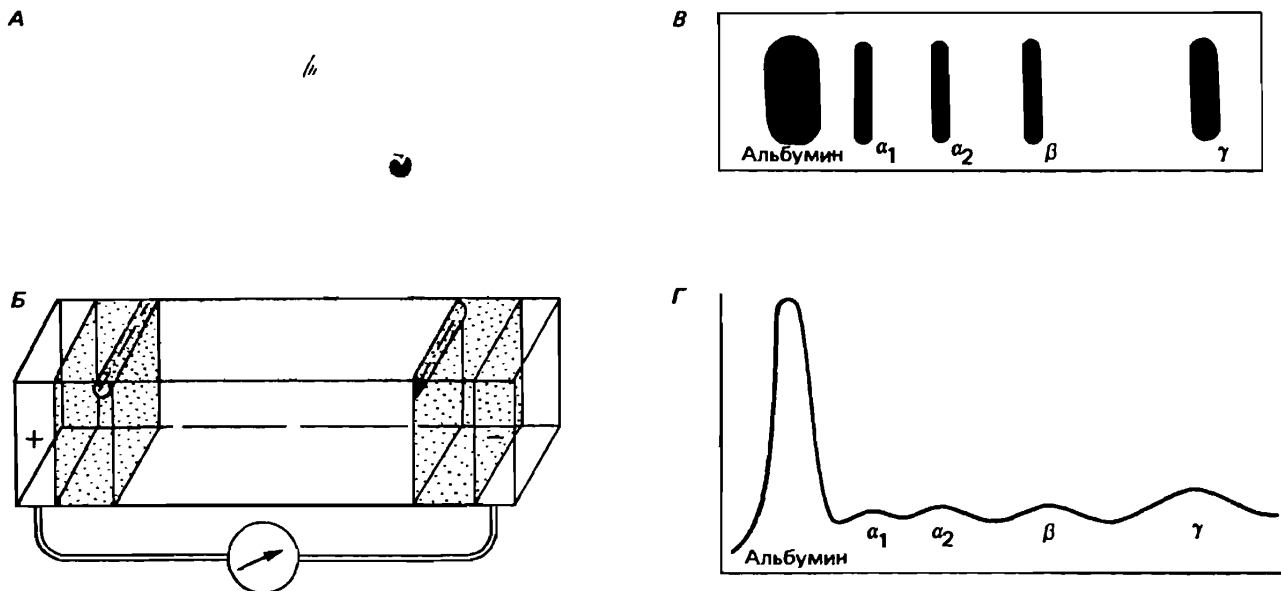


Рис. 55.2. Метод зонального электрофореза в ацетате целлюлозы. *А.* Небольшое количество сыворотки или другой жидкости наносят на полоску ацетата целлюлозы. *Б.* Проводят электрофорез образца в буферном растворе. *В.* Белковые полосы становятся видимыми после окрашивания. *Г.* В результате денситометрического сканирования полоски ацетата целлюлозы на денситограмме видны пики альбумина, α_1 -глобулина, α_2 -глобулина, β -глобулина и γ -глобулина. (Reproduced, with permission, from Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V. (eds). Basic and Clinical Immunology, 6th ed. Appleton and Lange, 1987.)

Иммуноглобулины

Иммуноглобулины, или **антитела**, синтезируются В-лимфоцитами или образующимися из них плазматическими клетками. Антитела с удивительной специфичностью **связываются с антигенными детерминантами** других молекул.

Все молекулы иммуноглобулинов состоят из двух идентичных легких (L) цепей (мол. масса 23 000) и двух идентичных тяжелых (H) цепей (мол. масса 53 000—75 000), образующих тетрамер (L_2H_2) при помощи дисульфидных связей (рис. 55.3). Каждая цепь может быть условно разделена на специфические **домены** или области, имеющие определенное структурное и функциональное значение. Половину легкой цепи, включающую карбоксильный конец, называют **константной областью** (C_L), а N-концевую половину легкой цепи — **вариабельной областью** (V_L). Примерно четвертую часть тяжелой цепи, включающую N-конец, относят к вариабельной области H-цепи (V_H), остальные 3/4 ее длины — это константные области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Участок иммуноглобулина, связывающийся со специфическим антигеном, формируется N-концевыми вариабельными областями легких и тяжелых цепей, т.е. V_H и V_L -доменами. Эти домены не являются просто линейными последовательностями аминокислот, они формируют глобулярные образования с вторичной и третичной структурой, обеспечивающие эффективное связывание со специфическими антигенами. Как показано на рис. 55.3, при ферментативном расщеплении молекулы иммуноглобулина папаином обра-

зуются два антиген-связывающих фрагмента (**Fab**) и один кристаллизуемый фрагмент (**Fc**). Участок молекулы, расположенный между C_{H1} - и C_{H2} -доменами, носит название **шарнирной области**.

Существуют два основных типа легких цепей — каппа (κ) и лямбда (λ), различающихся структурой в области C_L (табл. 55.1). Индивидуальная молекула иммуноглобулина содержит либо две κ -, либо две λ -цепи, но никогда не содержит одновременно и κ -, и λ -цепи. В состав иммуноглобулинов человека чаще входят κ -цепи.

У человека обнаружено пять классов тяжелых (H) цепей (табл. 55.1), различающихся C_H -областями. Эти классы обозначают греческими буквами γ , α , μ , δ и ϵ ; их мол. масса варьирует от 50 000 до 75 000 (табл. 55.1). μ - и ϵ -Цепи содержат по четыре константные области, в составе других цепей таких областей три. Тип тяжелой цепи определяет класс иммуноглобулина и, следовательно, его эффекторные функции. Имеется пять классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Как видно из табл. 55.1, несколько классов H-цепей могут быть разделены на подклассы на основе небольших различий в C_H -областях.

Вариабельные области иммуноглобулинов, состоящие из V_L - и V_H -доменов, весьма гетерогенны. Действительно, нет двух вариабельных областей (у разных индивидов), которые были бы идентичны по аминокислотной последовательности. Имеются, однако, сходные по структуре участки. Их можно разделить на три группы в зависимости от степени го-

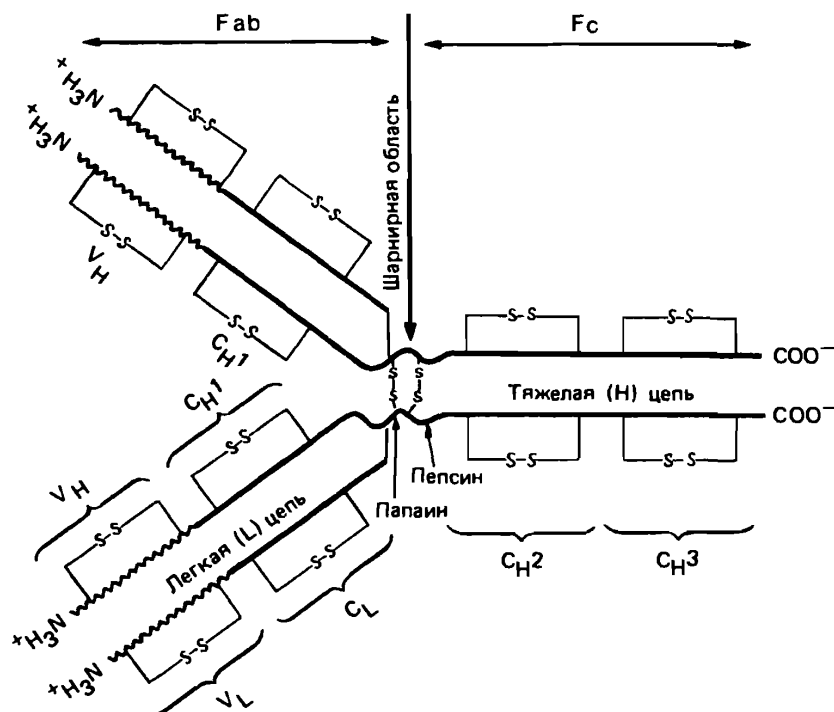


Рис. 55.3. Упрощенная модель молекулы IgG антител человека: представлена четырехцепочечная основная структура и домены. V — варибельная область; C — константная область; вертикальная стрелка — шарнирная область. Жирными линиями обозначены H- и L-цепи; тонкими линиями — дисульфидные связи. (Modified and reproduced, with permission, from Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V. (eds.). Basic and Clinical Immunology, 6th ed. Appleton and Lange, 1987.)

Таблица 55.1. Свойства цепей иммуноглобулинов человека. (Reproduced, with permission, from Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V. (editors). Basic and Clinical Immunology, 6th ed., Appleton and Lange, 1987.)

Обозначение	Тяжелые цепи (H)					Легкие цепи (L)		Секреторный компонент	J-цепь
Классы, в которых имеются соответствующие цепи	γ IgG	α IgA	μ IgM	δ IgD	ϵ IgE	κ Все классы	λ Все классы	СК IgA	J IgA, IgM
Подклассы или подтипы	1, 2, 3, 4	1, 2	1, 2	...	...	...	1, 2, 3, 4	...	...
Аллотипические варианты	$G_m(1)-(25)$	A 2m(1), (2)	...	...	...	$K_m(1)-(3)^{1)}$	...	...	...
Молекулярная масса (приблизительно)	50 000 ²⁾	55 000	70 000	62 000	70 000	23 000	23 000	70 000	15 000
Подгруппы V-области		$V_{H1}-V_{H4}$				$V_{\kappa1}-V_{\kappa4}$	$V_{\lambda1}-V_{\lambda6}$		
Углеводы (средний процент)	4	10	15	18	18	0	0	16	8
Количество олигосахаридов	1	2 или 3	5	?	5	0	0	7	1

¹⁾ Прежде Inv (1)–(3).

²⁾ Для γ 3–60 000.

мологии аминокислотной последовательности: V_k -группа для κ -цепей, V_λ группа для λ -цепей и V_H -группа для H-цепей. При большем «разрешении» в каждой из этих трех групп можно выделить подгруппы. Итак, в структуре вариабельных областей имеется несколько относительно постоянных участков. При сравнении **вариабельных областей** различных легких или тяжелых цепей установлено, что среди относительно невариабельных районов (определяющих группы и подгруппы) встречаются **гипервариабельные участки** (рис. 55.4). В составе легких цепей таких участков три, тяжелые цепи имеют четыре гипервариабельных участка.

Константные области молекул иммуноглобулинов, особенно C_{H2} и C_{H3} (а также C_{H4} в IgM и IgE), образующие Fc-фрагмент, ответственны за эффекторные функции иммуноглобулинов, специфические для данного класса (табл. 55.2). Некоторые иммуноглобулины, например IgG, существуют только в тетрамерной форме. Другие иммуноглобулины (IgA и IgM) могут формировать олигомеры более высокого порядка, включающие два или три (IgA) или пять (IgM) тетрамеров (рис. 55.5).

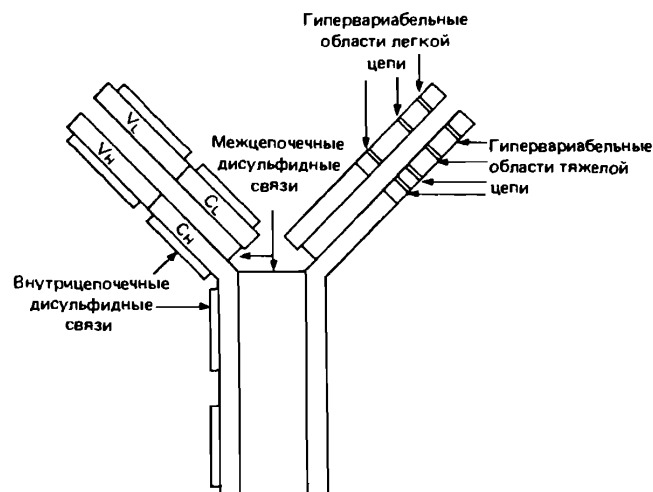


Рис. 55.4. Схематическая модель молекулы IgG, показывающая примерное расположение гипервариабельных областей в тяжелых и легких цепях. (Modified and reproduced, with permission, from Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V. (eds.). Basic and Clinical Immunology, 6th ed. Appleton and Lange, 1987.)

Таблица 55.2. Свойства иммуноглобулинов человека. (Reproduced, with permission, from Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V. (editors): Basic and Clinical Immunology, 6th, ed. Appleton and Lange, 1987.)

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Класс тяжелой цепи	γ	α	μ	δ	ϵ
Подкласс тяжелой цепи	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$	$\mu 1, \mu 2$		
Тип легкой цепи	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Молекулярная формула	$\gamma_2 L_2$	$\alpha_2 L_2$ ⁺ $(\alpha_2 L_2)_2 CK^{\S} J^+$	$(\alpha_2 L_2)_5 J^+$	$\delta_2 L_2$	$\epsilon_2 L_2$
Коэффициент седиментации (S)	6–7	7	19	7 8	8
Молекулярная масса (приблизительно)	150 000	160 000 ⁺ 400 000 ^{**}	900 000	180 000	190 000
Электрофоретическая подвижность	γ	Быстрый $\gamma - \beta$	Быстрый $\alpha - \beta$	Быстрый γ	Быстрый γ
Реакция связывания комплемента (классическая)	+	0	++++	0	0
Концентрация в сыворотке (мг %) (приблизительно)	1000	200	120	3	0,05
Перенос через плаценту	+	0	0	0	0
Реакция на реагин	?	0	0	0	++++
Лизис бактерий	+	+	+++	?	?
Антивирусная активность	+	+++	+	?	?

⁺ Для мономерного IgA сыворотки

⁺ J цепь

[§] Секреторный компонент

^{**} Для секреторного IgA

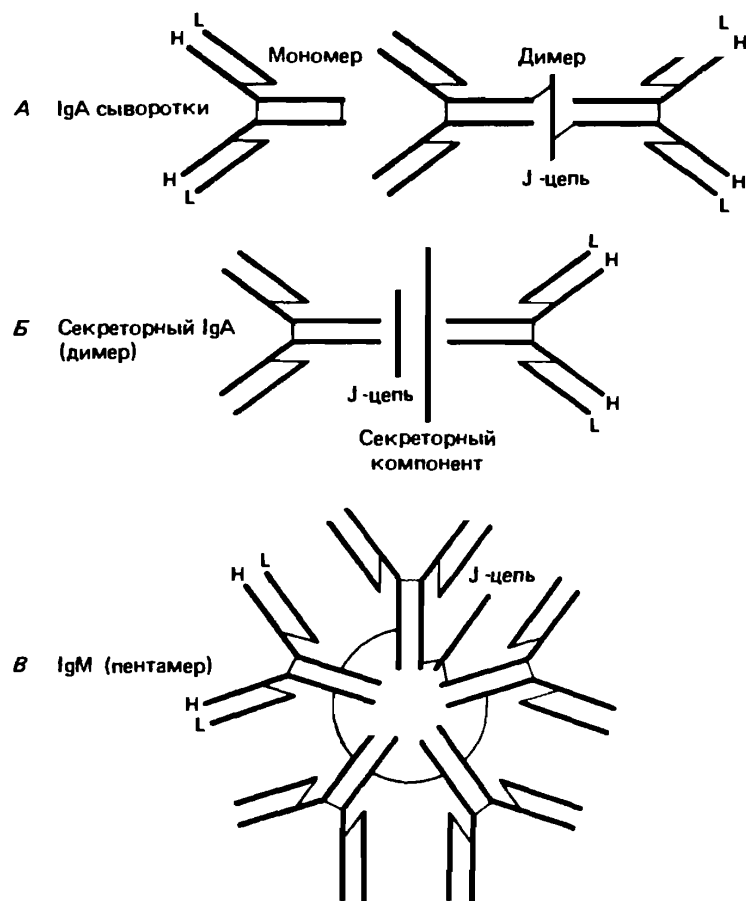


Рис. 55.5. Схематическое изображение полимерных молекул иммуноглобулинов человека. Полипептидные связи обозначены жирными линиями; межцепочечные дисульфидные связи — тонкими линиями. (Reproduced, with permission, from Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V. (eds.). *Basic and Clinical Immunology*, 6th ed. Appleton and Lange, 1987.)

Тяжелые и легкие цепи синтезируются в виде отдельных молекул, и затем в В-клетках или плазматических клетках из них образуются зрелые иммуноглобулины, являющиеся (без исключения) гликопротеинами (табл. 55.1).

Каждая легкая цепь иммуноглобулина — это продукт по крайней мере трех отдельных структурных генов: гена варибельной области (V_L), гена соединяющей области (J) (не имеющей отношения к J-цепи IgA или IgM) и гена константной области (C_L). Каждая тяжелая цепь является продуктом по крайней мере четырех различных генов: гена варибельной области (V_H), гена разнообразия (D), гена соединяющей области (J) и гена константной области (C_H). Таким образом, классическая схема «один ген — один белок» в данном случае не применима. Молекулярные механизмы, ответственные за синтез отдельных цепей иммуноглобулинов несколькими структурными генами, обсуждаются в гл. 38 и 41.

Каждый индивид способен синтезировать антитела против примерно одного миллиона различных антигенов. Такое разнообразие антител определяется комбинациями различных структурных генов,

участвующих в образовании каждой из цепей иммуноглобулинов, а также высокой частотой соматических мутаций в генах V_H и V_L -областей.

В большинстве иммунных ответных реакций антитела идентичной специфичности, но разных классов образуются в ответ на введение иммуногена (иммунизирующего антигена) в строго хронологическом порядке. Один тип антиген-специфичной легкой цепи иммуноглобулина может соединиться с антиген-специфичной μ -тяжелой цепью с образованием молекулы IgM. Позднее та же антиген-специфичная легкая цепь соединяется с γ -тяжелой цепью, имеющей идентичную варибельную V_H -область, с образованием молекулы иммуноглобулина IgG с антигенной специфичностью такой же, что и у молекул IgM. Далее та же легкая цепь может связаться с тяжелой α -цепью, содержащей идентичную V_H . При этом образуется молекула IgA, у которой антигенная специфичность аналогична той, которую имела молекула IgG. Эти три класса иммуноглобулинов (IgM, IgG и IgA), синтезирующихся в ответ на один и тот же антиген, обладают идентичными варибельными доменами в легких (V_L) и тяжелых (V_H) це-

пях; их называют идиотипическими (идиотипы). О различных классах изотипов говорят в том случае, когда различные C_H -области комбинируются с одной и той же антиген-специфичной V_H -областью. В гл. 41 обсуждаются механизмы генетической регуляции, ответственной за переключение генов C_H -области.

Известны заболевания, при которых увеличивается продукция определенных классов или даже определенных молекул иммуноглобулинов. Например, именно так обстоит дело при возникновении клональной опухоли плазматических клеток (так называемой **миеломы**). Напротив, при **гипогаммаглобулинемии** снижается синтез либо какого-то одного класса иммуноглобулинов (например, IgA или IgG), либо всех вместе (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Почти во всех случаях изменения в уровне иммуноглобулинов обусловлены нарушением либо скорости синтеза этих молекул, либо их секреции. Причины таких изменений весьма многочисленны.

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Прекращение кровотечения после травматического повреждения кровеносных сосудов называется гемостазом. Выделяют четыре фазы гемостаза: **первая фаза** — **сокращение** поврежденного сосуда. При этом уменьшается кровоснабжение дистальной от травмы области. **Вторая фаза** — образование в месте повреждения рыхлой **тромбоцитарной пробки** или белого тромба. Имеющийся в участке повреждения коллаген служит связывающим центром для тромбоцитов; у последних в результате связывания разрушается их внутренняя структура и высвобождаются тромбоксан и ADP. Они в свою очередь индуцируют присоединение новых тромбоцитов и таким образом образуется рыхлая временная пробка. Длительность данной фазы гемостаза определяют по продолжительности кровотечения. **Третья фаза** — формирование красного тромба (**кровяного сгустка**). **Четвертая фаза** — частичное или полное растворение сгустка.

Различают три типа тромбов или сгустков. **Белый тромб** образуется из тромбоцитов и фибрина; в нем относительно мало эритроцитов. Формируется он в местах повреждения или на патологически измененной стенке сосуда в условиях высокой скорости кровотока (в артериях). Второго вида тромбов — это диссеминированные отложения фибрина в очень мелких сосудах (капиллярах).

Третий вид тромбов — **красный тромб** — состоит из эритроцитов и фибрина. Морфология красного тромба сходна с морфологией сгустков, образующихся в пробирке. Красные тромбы формируются *in vivo* в областях замедленного кровотока при отсутствии патологических изменений в стенке сосуда, в месте повреждения или на измененной стенке сосу-

да вслед за инициирующей тромбоцитарной пробкой. Инициация образования сгустка в ответ на повреждение ткани осуществляется по **внешнему пути свертывания**. Инициация формирования красного тромба в области замедленного кровотока или на аномальной сосудистой стенке при отсутствии повреждения ткани происходит по **внутреннему пути свертывания**. Внешний и внутренний пути свертывания завершаются **общим конечным путем**. На этом этапе происходит переход протромбина в тромбин и катализируемое тромбином превращение фибриногена в фибрин тромба.

Превращение фибриногена в фибрин, катализируемое тромбином

Фибриноген¹ (фактор I, см. рис. 55.1 и табл. 55.3) — это растворимый гликопротеин плазмы, синтезируемый в печени; длина его молекулы 46 нм, мол. масса 340 000. Молекула состоит из шести полипептидных цепей (две Aα-цепи, 2Bβ-цепи и две γ-цепи). Структура фибриногена — Aα₂Bβ₂γ₂. Bβ- и γ-цепи содержат сложные олигосахариды, связанные с остатками Asp. Все три гена, кодирующие Aα-, Bβ- и γ-цепи, сцеплены; их активность у человека коор-

Таблица 55.3. Система нумерации факторов свертывания крови. Номера не отражают последовательности действия факторов

Фактор	Название
I	Фибриноген
II	Протромбин
IV	Кальций
V	Лабильный фактор, проакселерин, Ас-глобулин
VII	Проконвертин, ускоритель превращения сыровоточного протромбина, котромбопластин, аутопротромбин I
VIII	Антигемофильный фактор, антигемофильный глобулин
IX	Тромбопластиновый компонент плазмы (фактор Кристмаса)
X	Фактор Стюарта-Провера
XI	Предшественник тромбопластина плазмы
XII	Фактор Хагемана
XIII	Фактор Лаки-Лоранда

динированно регулируется. Концы молекул фибриногена обладают сильным отрицательным зарядом; это обусловлено присутствием большого количества остатков аспартата и глутамата в A-области цепи Aα и B-области цепи Bβ (рис. 55.6). Помимо этого B-область цепи Bβ содержит необычный отрицательно заряженный остаток тирозин-О-сульфата. Отрица-

¹ Все факторы свертывания (за исключением фибриногена, протромбина и продуктов их активации, а также ионов Ca²⁺) обозначены римскими цифрами (табл. 55.3).

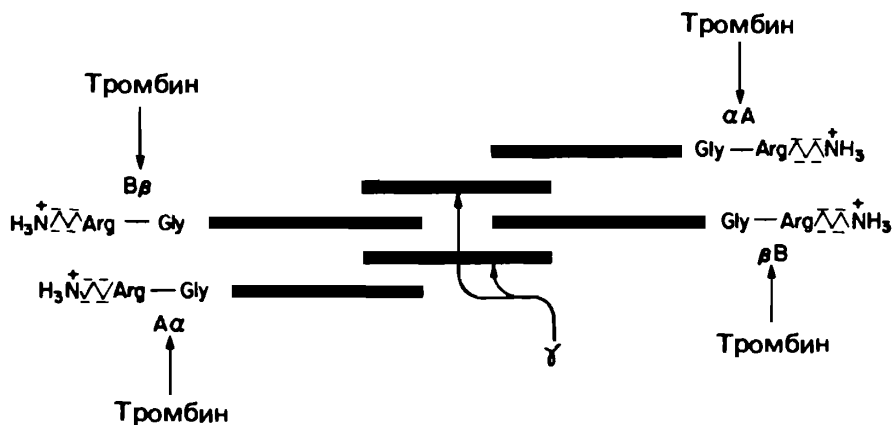


Рис. 55.6. Схематическое изображение фибриногена, его структуры $(A\alpha B\beta\gamma)_2$, заряженных концов, сайтов расщепления тромбином (стрелки) четырех пептидных связей Arg-Gly.

тельно заряженные концы молекул фибриногена не только способствуют растворимости последних в воде, они отталкивают концы других молекул фибриногена, что предотвращает агрегацию последних.

Тромбин — это сериновая протеаза с мол. массой 34 000, состоящая из двух полипептидных цепей. Тромбин гидролизует четыре пептидные связи Arg-Gly в фибриногене (рис. 55.6). Из этих четырех связей две соединяют области А и α, а другие две — области В и β в цепях Aα и Bβ соответственно. Удаляемые из молекулы фибриногена фрагменты А и В являются отрицательно заряженными **фибринопептидами**, в результате образуется **мономер фибрина**, имеющий структуру $(\alpha\beta\gamma)_2$. Длинные нерастворимые момеры фибрина спонтанно ассоциируют в регулярные зигзагообразные структуры; в результате образуется **нерастворимый полимерный фибриновый сгусток**. Он захватывает эритроциты, тромбоциты и другие компоненты крови, в результате чего образуется красный тромб или белый тромб (тромбоцитарная пробка). На ранней стадии фибриновый сгусток представляет собой весьма рыхлое образование, удерживающееся лишь нековалентно связанной системой нерастворимых фибриновых мономеров.

Функция тромбина помимо превращения фибриногена в фибрин заключается в переводе фактора XIII в его активную форму ($XIII_a$). Фактор XIII_a (трансглютаминаза) «сшивает» момеры фибрина путем образования специфической изопептидной связи между γ-карбоксамидной группой глутаминина и ε-аминогруппой лизина (рис. 55.7). Такая стабилизация фибринового сгустка способствует его ретракции, что можно наблюдать в пробирке. Повышенная кровоточивость, наблюдаемая у пациентов с наследственной недостаточностью фактора XIII, объясняется невозможностью образования стабильного фибринового сгустка.

Известно, что внезапный тромбоз сосудов может иметь опасные и даже катастрофические последствия. Вот почему активность тромбина должна в организме тщательно контролироваться. Такой контроль осуществляется двумя механизмами. Один из них опосредован функцией антагониста тромбина — антитромбина III (см. ниже). Вторым механизмом состоит в том, что в организме синтезируется и циркулирует каталитически **неактивный зимоген тромбина — протромбин**. Протромбин, или фактор II, синтезируется в печени и содержит остатки γ-карбоксиглутамата (Gla). Протромбин представляет

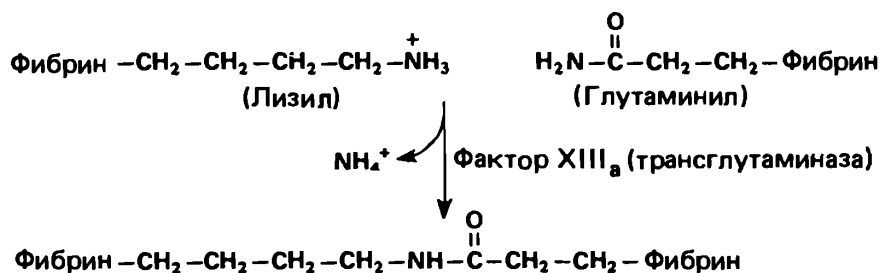


Рис. 55.7. Поперечная сшивка фибриновых молекул при действии активированного фактора XIII

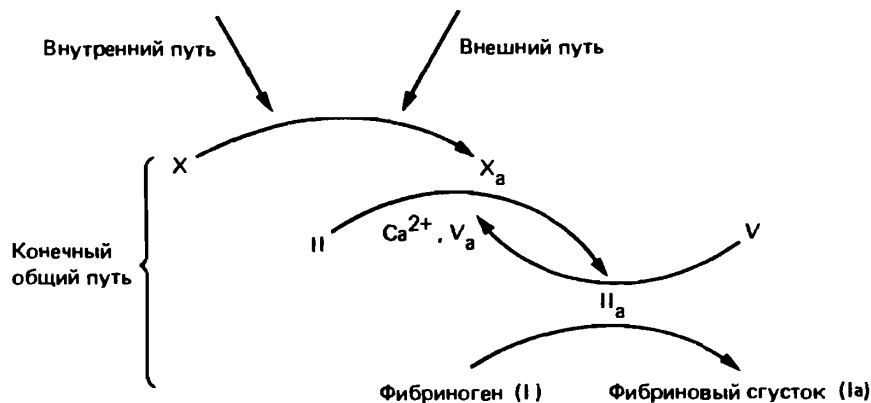


Рис. 55.10. Взаимосвязь внутреннего, внешнего и конечного общего пути в процессе свертывания крови.

пути, который быстро включается после повреждения ткани. Предшественник фактора VII_a — фактор VII (еще один Gla-содержащий гликопротеин) — синтезируется в печени и может активироваться тромбином или фактором X_a. Фактор VII — это зимоген, однако он обладает относительно высокой эндогенной активностью. Тканевый фактор, ускоряющий действие факторов VII или VII_a на фактор X, в большем количестве содержится в плаценте, легких и мозге.

В 1 мл плазмы содержится примерно 3 мг фибриногена и только 0,01 мг фактора X. Это означает, что в системе свертывания должна иметь место амплификация. И действительно, превращение фактора X в X_a — аутокаталитический процесс, который можно рассматривать как амплификацию. В рассмотренной группе реакций нелегко понять, что является первичным — «курица или яйцо»; в данном случае — фактор II_a (тромбин) или фактор X_a (рис. 55.10).

Внутренний путь образования фактора X_a

Внутренний путь образования фактора X_a начинается с взаимодействия *in vivo* прекалликреина, высокомолекулярного кининогена, факторов XII и XI на активирующей поверхности, вероятно на коллагене (рис. 55.11). Активирующей поверхностью внутреннего пути в опытах *in vitro* служит стекло и каолин. Взаимодействие фактора XII с активирующей поверхностью делает его более доступным для протеолитической атаки калликреином. В результате действия калликреина образуется фактор XII_a, который в свою очередь индуцирует переход прекалликреина в калликреин. Таким образом, имеет место реципрокная активация. Фактор XII_a высвобождает из высокомолекулярного кининогена брадикинин и активирует фактор XI в XI_a. Фактор XI_a в результате двух последовательных реакций активирует фак-

тор IX (Gla-содержащий зимоген). Фактор IX_a в присутствии ионов Ca²⁺ и кислых фосфолипидов медленно активирует фактор X; активация происходит путем расщепления той же связи Arg—Ile, которую расщепляет фактор VII_a на внешнем пути. Скорость активации фактора X фактором IX_a увеличивается в 500 раз в присутствии фактора VIII (или VIII_a). Для активации фактора VIII, по-видимому, необходимо небольшое количество тромбина. Фактор VIII не является протеазой; вероятно, он служит рецептором для фактора IX_a при расщеплении последним связи Arg—Ile в факторе X. Внутренний путь свертывания крови — медленный процесс, поскольку в нем участвует большое число факторов. Все вместе они образуют каскадный механизм, генерирующий фактор X_a (рис. 55.11).

В табл. 55.4 представлен целый ряд наследственных болезней человека, обусловленных недостаточностью различных компонентов системы свертывания. Наиболее часто наблюдается недостаточность фактора VIII, детерминирующая гемофилию А (соответствующий ген локализован в 10-й хромосоме человека). Эта болезнь сыграла значительную роль в истории королевских династий в Европе.

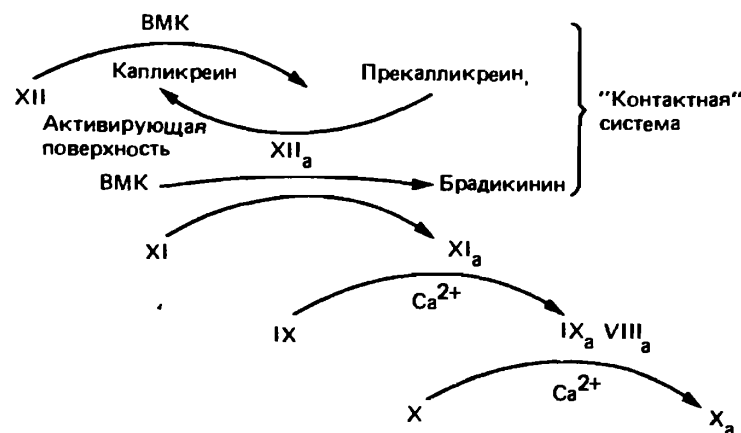


Рис. 55.11. Внутренний путь активации фактора X в X_a. ВМК — высокомолекулярный кининоген.

Таблица 55.4. Геморрагические заболевания и связанные с ними нарушения

Фактор	Заболевание	Продолжительность кровотечения	Время свертывания	Активированное частичное тромбопластиновое время	Протромбиновое время
I	Афибриногенемия	Варьирует	Свертывание не происходит	Свертывание не происходит	Свертывание не происходит
II	Гипопротромбинемия	Нормальная	Нормальное — продолжительное	Варьирует	Длительное
V	Парагемофилия	Нормальная	Продолжительное	Продолжительное	Продолжительное
VII	Недостаточность фактора VII	Нормальная	Нормальное	Нормальное	Продолжительное
VIII	Гемофилия A	Нормальная	Нормальное — продолжительное	Продолжительное	Нормальное
VIII	Болезнь Виллебранда	Продолжительная	Варьирует	Варьирует	Нормальное
IX	Болезнь Кристмаса, гемофилия B	Нормальная	Нормальное — продолжительное	Продолжительное	Нормальное
X	Недостаточность фактора Стюарта	Нормальная	Нормальное — продолжительное	Продолжительное	Продолжительное
XI	Недостаточность фактора XI	Варьирует	Нормальное — продолжительное	Продолжительное	Нормальное
XII	Симптом Хагемана	Нормальная	Продолжительное	Продолжительное	Нормальное
XIII	Недостаточность фактора, стабилизирующего фибрин	Нормальная	Нормальное	Нормальное	Нормальное
Прекалликреин	Симптом Флетчера	Нормальная	Продолжительное	Продолжительное	Нормальное
Высокомолекулярный кининоген	Симптом Фитцджеральда	Нормальная	Продолжительное	Продолжительное	Нормальное

У пациентов с аутосомно-доминантной болезнью **Виллебранда** помимо недостаточности фактора VIII имеется нарушение в адгезии тромбоцитов. Между тем у больных гемофилией A отсутствует только свертывающая активность фактора VIII, при этом адгезия тромбоцитов не нарушена. Фактор адгезии тромбоцитов (**фактор Виллебранда**) синтезируется клетками эндотелия сосудов и мегакариоцитами (клетками-предшественниками тромбоцитов); он представляет собой крупный гликопротеин с мол. массой более 200 000. Фактор Виллебранда обнаруживается в плазме и тромбоцитах в составе комплекса с молекулой фактора VIII. По-видимому, на поверхности тромбоцитов имеется рецептор гликопротеиновой природы, связывающий комплекс фактора Виллебранда с фактором VIII. Фактор Виллебранда, вероятно, стабилизирует прокоагулянтную активность фактора VIII. Болезнь Виллебранда может быть результатом наследуемого дефекта в олигосахаридном фрагменте гликопротеинового фактора Виллебранда. Аномальный олигосахарид может препятствовать адгезии тромбоцитов и дестабилизировать фактор VIII. При гемофилии A имеется дефект фактора VIII; при этом нарушается его свертывающая

активность, в то же время адгезия тромбоцитов, определяемая фактором Виллебранда, не меняется. Фактор VIII представляет собой гликопротеин, содержащий 2300 аминокислот; его молекула обнаруживает частичную гомологию с церулоплазмином и фактором V. Синтезируется этот фактор в печени, селезенке и почках.

Тесты на свертывание крови

Для ознакомления с различными методиками, позволяющими оценить функционирование системы свертывания крови, рекомендуем читателю обратиться к соответствующим разделам учебников по физиологии или гематологии.

Антикоагулянты

Нормальная плазма характеризуется несколькими видами антитромбиновой активности. Небольшой вклад в нее вносит α_1 -антитрипсин. На долю специфического α_2 -глобулина приходится около 25% всей антитромбиновой активности плазмы. Он образует необратимый комплекс с тромбином и другими

протеазами, препятствуя таким образом связыванию этих ферментов с их природными субстратами. α_2 -Глобулин рассматривается как α_2 -ингибитор плазмينا, поскольку он инактивирует также плазмин, являющийся сериновой протеазой с фибринолитической активностью.

Наибольшая антитромбиновая активность при- суща антитромбину III. Антитромбин III обладает незначительной эндогенной активностью и сильно активируется в присутствии гепарина, обладающего большим отрицательным зарядом. Гепарин, по- видимому, связывается со специфическим катион- ным участком антитромбина III, вызывая конфор- мационное изменение его молекулы. В результате этого изменения антитромбин III приобретает воз- можность связываться со всеми сериновыми протеа- зами, включая трипсин, химотрипсин и плазмин. В системе свертывания крови антитромбин III инги- бирует активность тромбина, факторов IX_a, X_a, XI_a и XII_a. У индивидов с наследственной недостаточ- ностью антитромбина наблюдается склонность к обра- зованию тромбов. Отсюда можно сделать вывод, что антитромбин выполняет физиологические функ- ции и что в норме процесс свертывания крови у че- ловека представляет собой очень динамичную сис- тему.

Гепарин часто используется в клинической практи- ке в качестве препарата, предотвращающего свертыва- ние крови. Главным фактором, определяющим противосвертывающую активность гепарина, являет- ся активация им антитромбина III, который в свою очередь ингибирует рассмотренные выше сериновые протеазы. Известно, что небольшое количество гепа- рина находится на стенках сосудов, вследствие этого снижается активация внутреннего пути. Противос- вертывающую активность гепарина можно пода- вить сильно катионными полипептидами (например, протамином). Такие полипептиды конкурируют с катионными участками антитромбина III за связывание с полианионным гепарином.

Препараты группы кумарина ингибируют вита- мин-К-зависимое карбоксилирование остатков Glu, приводящее к образованию Gla в N-концевой части молекулы факторов II, VII, IX и X. Все эти факторы синтезируются в печени, и образование остатков Gla необходимо для их созревания и, следовательно, для нормального функционирования внутреннего, внеш- него и общего конечного путей свертывания. По- видимому, препараты кумарина ингибируют восста- новление хиноновых производных витамина К в ак- тивные гидрохиноновые формы. Введение витамина К снимает блок, вызываемый кумарином, и обеспе- чивает созревание в печени Gla-зависимых факторов свертывания. Обращение действия кумарина вита- мином К наблюдается только через 12—24 ч; обра- щение же противосвертывающей активности гепари-

на протамином происходит практически сразу; это различие обусловлено природой антагонистических механизмов.

Фибринолиз

Имеются убедительные данные, свидетельствующие о том, что система свертывания крови в норме находится в динамическом равновесии, при котором фибриновые сгустки постоянно образуются, а затем растворяются. Плазмин представляет собой серино- вую протеазу, способную гидролизовать фибрино- ген и фибрин, факторы V и VIII, факторы компле- мента и различные полипептидные гормоны. В нор- ме плазмин содержится в плазме в форме неактивно- го профермента (плазминогена). В большинстве тка- ней организма имеются активаторы плазминогена различных типов. Тканевый активатор плазминоге- на — это сериновая протеаза, каталитически неак- тивная в отсутствие контакта с фибрином. Находясь в контакте с фибрином, активатор плазминогена способен расщеплять молекулу плазминогена с образованием плазмينا. Когда плазмин гидроли- зует фибрин, активатор плазминогена теряет свою активность и протеолиз затухает. Таким образом, обеспечивается эффективная регуляция процесса фи- бринолиза. Весьма перспективным представляется использование в терапевтических целях тканевого активатора плазминогена (ТАП), получаемого мето- дами генной инженерии. ТАП способствует восста- новлению проходимости коронарных артерий, сни- жая, таким образом, повреждение миокарда, проис- ходящее при остром инфаркте коронарных сосудов. Еще один активатор плазминогена — протеолити- ческий фермент урокиназа — содержится в моче. Урокиназа — это тоже сериновая протеиназа; она может активировать плазминоген, расщепляя его в двух местах.

Плазминоген в норме соосаждается с фибрином и, следовательно, входит в состав фибринового сгустка. Образующийся в результате активации плазмин расщепляет молекулы фибрина на раство- римые фрагменты, и сгусток исчезает (растворя- ется). Фибриновые сгустки с поперечными сшивка- ми, труднее растворяются плазмином.

Концентрация активаторов плазминогена повы- шается при ряде заболеваний, в том числе при неко- торых формах рака и при шоке. Антиплазминовая активность, обусловленная α_1 -антитрипсином и α_2 -ингибитором плазмينا, может снижаться при циррозе печени. Некоторые бактериальные продук- ты, например стрептокиназа, способны активировать плазминоген без расщепления его молекулы и могут быть ответственны за диффузные кровоизлияния, наблюдаемые иногда у больных с диссеминиро- ванными бактериальными инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА

- Deykin D.* Thrombogenesis, N. Engl. J. Med., 1967, **276**, 622.
- Genton E. et al.* Platelet-inhibiting drugs in the prevention of clinical thrombotic disease. (2 parts), N. Engl. J. Med., 1975, **293**, 1236, 1296.
- George J. N., Nurden A. T., Phillips D. R.* Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall, N. Engl. J. Med., 1984, **311**, 1084.
- Gitschier J. et al.* Characterization of the human factor VIII gene, Nature, 1984, **312**, 326.
- Heimark R. L. et al.* Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation, Nature, 1980, **286**, 456.
- Jackson C. M., Nemerson Y.* Blood coagulation, Annu. Rev. Biochem., 1980, **49**, 767.
- Kane W. H. et al.* Factor V_a-dependent binding of factor X_a to human platelets, J. Biol. Chem., 1980, **255**, 1170.
- McKee P. A.* Hemostasis and disorders of blood coagulation. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., Stanbury J. B. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1983.
- Stenflo J., Suttie J. W.* Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 157.
- Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V.* Basic and Clinical Immunology, 6th ed., Appleton and Lange, 1987.
- Weiss H. J.* Platelet physiology and abnormalities of platelet function (2 parts), N. Engl. J. Med., 1975, **293**, 531, 580.

Сократительные и структурные белки

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Белковые молекулы могут выполнять в биологических системах помимо каталитической и другие важнейшие функции. Роль этих молекул в регуляции, передаче и распознавании сигналов освещена в предшествующих главах. Белковым молекулам в биологических системах принадлежат также важные преобразующие и структурные функции. Некоторые из них, основанные на волокнистой природе отдельных белков, рассматриваются в данной главе.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Успешное клонирование гена мышечной дистрофии Дюшенна, осуществленное в 1986 г., во-первых, расширило наши представления о молекулярной природе генетических дефектов структурных и сократительных белков, а во-вторых, открыло перспективу лечения данной болезни. Известно, что многие молекулярные дефекты белков являются результатом мутаций в соответствующих структурных генах. Заметим, однако, что посттрансляционная модификация белка создает дополнительные возможности возникновения таких дефектов. Например, некоторые болезни человека связаны с генетически обусловленными нарушениями в процессинге незрелых предшественников коллагена. Во многих случаях это отражает нарушения связывания фибрилл друг с другом, что препятствует образованию стабильной тройной спирали коллагена. Однако не все коллагеновые болезни являются генетическими. Гидроксипролиловые и гидроксизилиловые остатки образуются при посттрансляционном гидроксировании остатков пролина и лизила в составе пептида. Необходимый кофактор этой реакции — аскорбат (витамин С). Гидроксированные остатки служат сайтами гликолизирования и участвуют в поперечном сшивании фибрилл. Таким образом, характерный для клинической картины цинги симптом

размягчения соединительной ткани легко объясняется биохимически.

МЫШЦЫ

Мышцы — главный биохимический преобразователь потенциальной (химической) энергии в кинетическую (механическую). Мышечная ткань занимает первое место по объему среди других тканей человека; на ее долю при рождении приходится чуть меньше 25%, у людей среднего возраста — более 40%, а у пожилых — чуть меньше 30% общей массы тела.

Эффективное преобразование химической энергии в механическую возможно при соблюдении ряда условий: 1) должно быть обеспечено постоянное снабжение химической энергией. В мышцах позвоночных химическая энергия заключена в молекулах АТФ и креатинфосфата; 2) должны существовать средства регуляции механической активности, т.е. в случае мышц — скорости, длительности и силы сокращения; 3) процесс преобразования должен находиться под контролем оператора, в данном случае его функцию выполняет нервная система; 4) для того чтобы «машина» преобразования энергии могла использоваться многократно, необходим механизм возврата системы в исходное состояние.

Мышцу можно сравнивать с машиной, которая «тянет», но не «толкает», следовательно, каждая мышца должна находиться под антагонистическим воздействием другой группы мышц или какой-либо иной силы, такой, как сила тяжести или эластичная отдача.

В организме позвоночных существуют три типа мышц: скелетные, сердечные и гладкие. **Скелетные и сердечные мышцы** при микроскопическом исследовании обнаруживают **поперечную исчерченность**; в **гладких мышцах** такая **исчерченность отсутствует**. В то время как скелетные мышцы находятся под **волевым** нервным контролем, сердечная и гладкая мышцы функционируют **непроизвольно**.

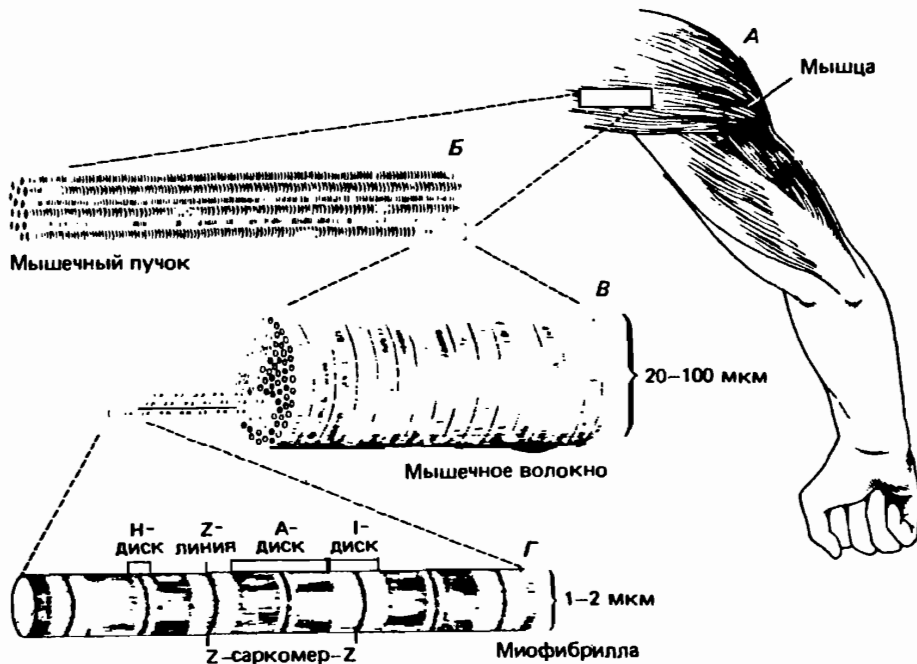


Рис. 56.1. Структура поперечнополосатой мышцы. (Drawing by Sylvia Colard Keene. Reproduced, with permission, from Bloom W., Fawcett D. W. A Textbook of Histology, 10th ed. Saunders, 1975.)

Структура мышц

Поперечнополосатая мышца состоит из многоядерных клеток (мышечных волокон), окруженных электровозбудимой мембраной — **сарколеммой**. При микроскопическом исследовании отдельной мышечной клетки, которая может быть вытянута во всю длину мышцы, в ней обнаруживается пучок, состоящий из множества параллельно расположенных **миофибрилл**; они погружены во внутриклеточную жидкость, называемую **саркоплазмой**. Эта жидкость содержит гликоген, макроэргические соединения (АТФ и фосфокреатин) и ферменты гликолиза.

Саркомер — это функциональная единица мышцы. Саркомеры следуют друг за другом вдоль оси фибриллы, повторяясь через каждые 1500—2300 нм (рис. 56.1). При исследовании миофибриллы в электронном микроскопе выявляется чередование темных и светлых дисков (диски А и I). Центральная область диска А (зона Н) выглядит менее плотной, чем остальная его часть. Диск I делит пополам очень плотная и узкая линия Z. Эти детали мышечной структуры представлены на рис. 56.2.

Исчерченность мышц, видимая под световым микроскопом, — это результат высокой степени их организации, когда большинство мышечных клеток выстраивается таким образом, что их саркомеры располагаются параллельно (рис. 56.1).

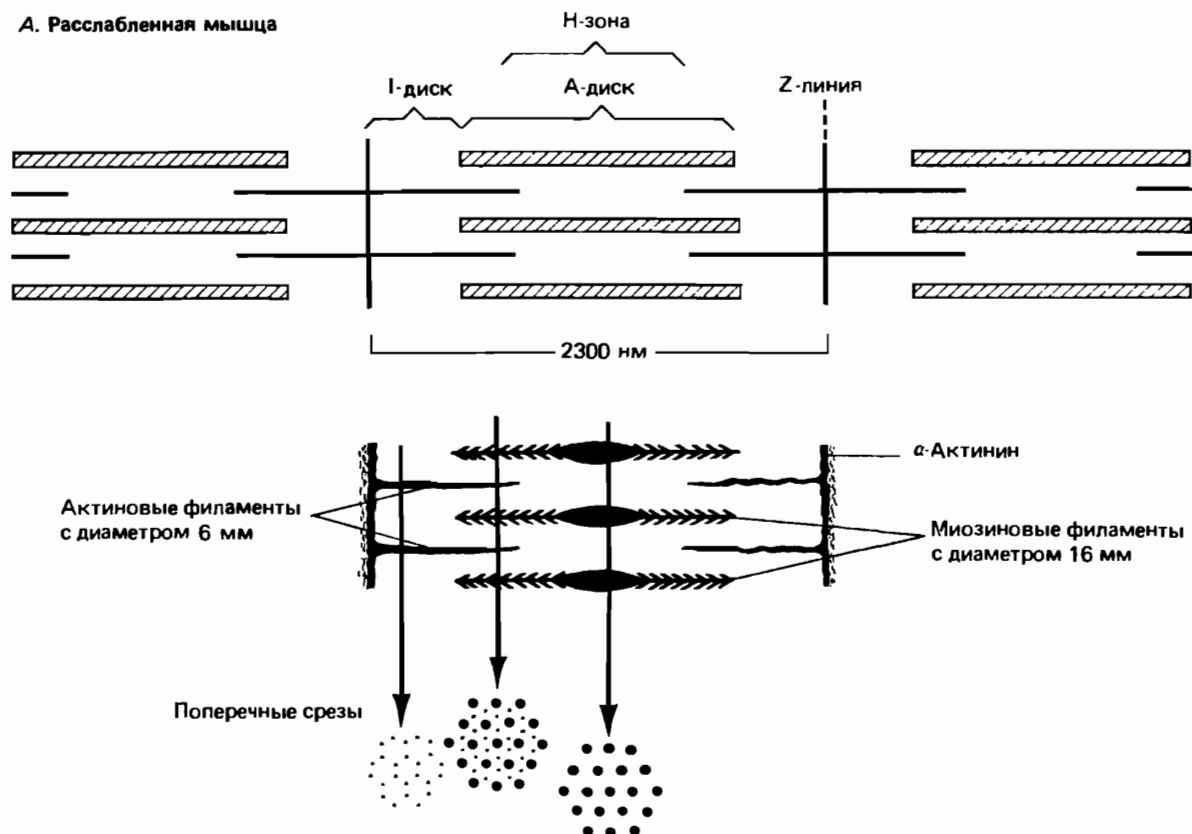
Исследование **поперечных срезов** миофибрилл в электронном микроскопе показывает, что каждая миофибрилла состоит из двух типов продольных филаментов (нитей). Первый тип («толстые» нити)

ограничены А-диском, они состоят главным образом из белка **миозина**, имеют около 16 нм в диаметре и образуют на поперечном срезе шестиугольник (рис. 56.2). Второй тип филаментов («тонкие» нити) занимает I-диск, распространяется на диск А, но не достигает его Н-зоны (рис. 56.2). Диаметр тонких нитей составляет около 6 нм. Они содержат белки **актин**, **тропомиозин** и **тропонин**. В диске А тонкие нити располагаются вокруг толстого (миозинового) филамента в виде второго шестиугольника. Таким образом, каждый тонкий филамент занимает симметричное положение между тремя толстыми филаментами, а каждый толстый филамент симметрично окружен шестью тонкими филаментами (рис. 56.2).

Толстые и тонкие филаменты взаимодействуют при посредстве поперечных мостиков, расположенных вдоль толстого филамента с промежутками в 14 нм. Как показано на рис. 56.2, поперечные мостики, или «наконечники», толстых филаментов имеют противоположные полярности на двух концах филамента. Эти полярные концы разделены сегментом (полосой М) длиной 150 нм, не содержащим выростов.

Во время сокращения мышцы длина толстых и тонких филаментов не меняется, но Н-зона и I-диски укорачиваются, следовательно, переплетающиеся филаменты должны скользить относительно друг друга. Напряжение, развивающееся при сокращении мышцы, пропорционально степени перекрытия филаментов и, следовательно, числу поперечных мостиков. «Головка» каждого поперечного мостика соединена с толстым филаментом гибким во-

А. Расслабленная мышца



Б. Сокращенная мышца

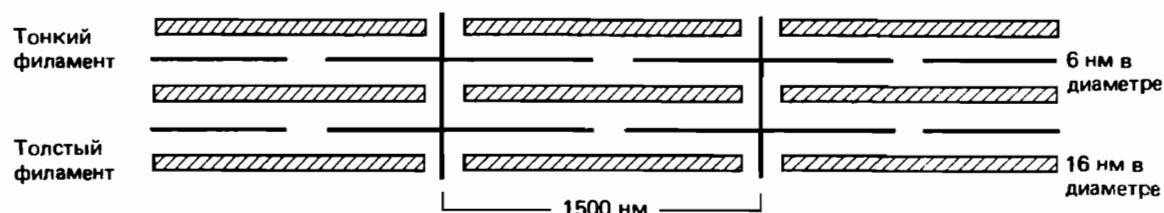


Рис. 56.2. Расположение филаментов в поперечнополосатой мышце. А. Расслабленная мышца. Б. Сокращенная мышца.

локнистым сегментом, который может изгибаться, регулируя пространство между филаментами.

Мышечные белки

Масса свежих мышечных волокон на 75% состоит из воды и содержит более 20% белка. Два главных мышечных белка — актин и миозин.

Мономерный (глобулярный) актин (G-актин) — это глобулярный белок с мол. массой 43 000, на долю которого приходится 25% общей массы мышечного белка. При физиологической величине ионной силы и в присутствии магния G-актин подвергается нековалентной **полимеризации** с образованием нерастворимого двойного спирального филамента, получившего название F-актин (рис. 56.3). Волокно F-актина имеет толщину 6—7 нм и через каждые 35,5 нм — повторяющиеся структурные

элементы. Ни G-, ни F-актин не обладают каталитической активностью.

В поперечнополосатых мышцах присутствуют еще четыре белка, минорных в плане их вклада в массу мышечной ткани, но выполняющих важную функцию. **Тропомиозин** представляет собой вытянутую в виде тяжа молекулу, состоящую из двух цепей, α и β , и примыкающую к F-актину в щели между двумя полимерами (рис. 56.3). Этот белок имеется во всех мышцах и подобных им структурах. Характерной особенностью именно поперечнополосатых мышц является наличие в них тропониновой системы, включающей три разных белка. **Тропонин Т (TnT)** так же, как и два других тропониновых компонента, связывается с тропомиозином (рис. 56.3). **Тропонин I (TnI)** ингибирует взаимодействие между F-актином и миозином и также связывается с другими компонентами тропонина. **Тропонин С (TnC)** —

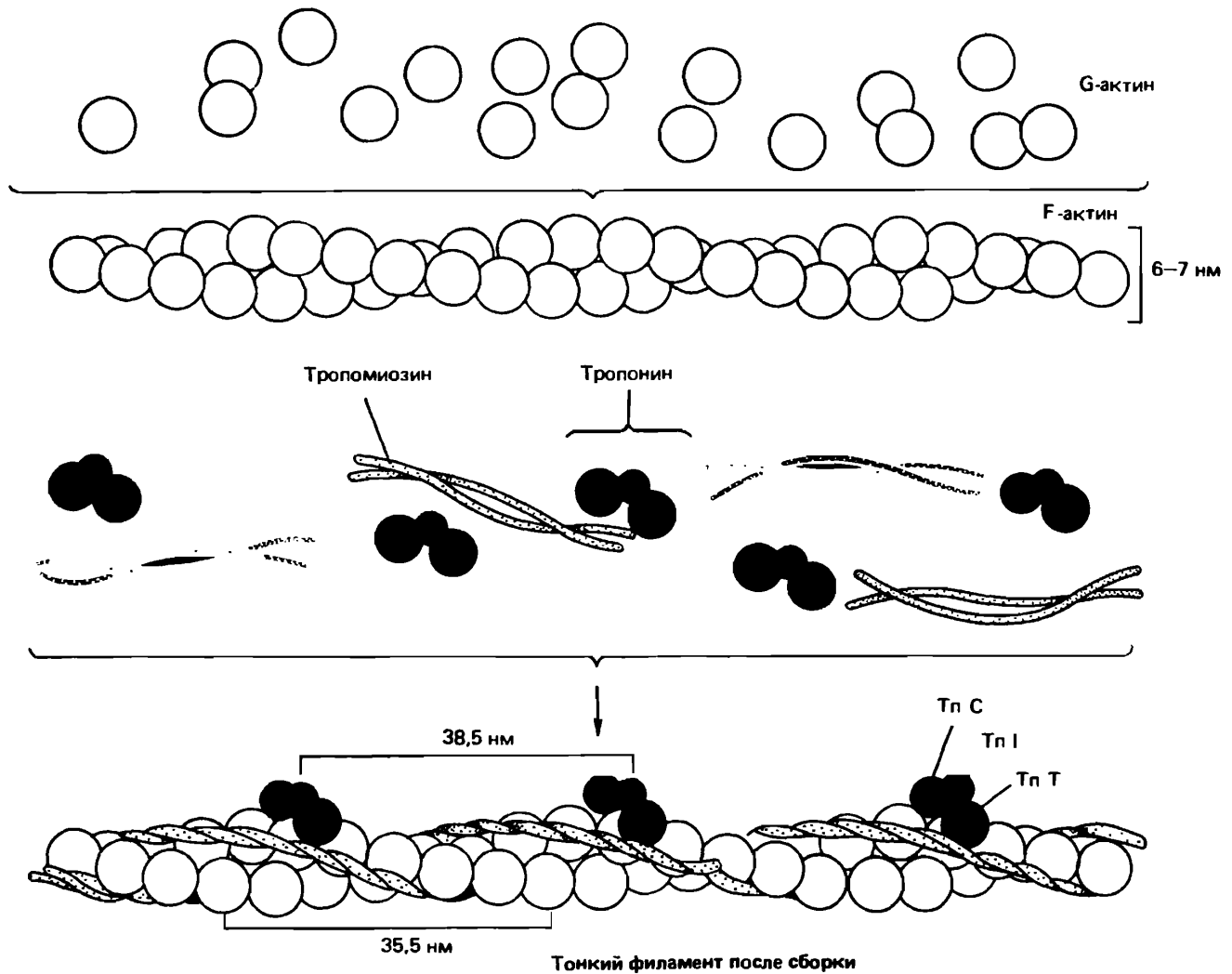


Рис. 56.3. Схематическое изображение тонкого филамента. Показана пространственная конфигурация трех главных белковых компонентов: актина, тропомиозина и тропонина.

кальций-связывающий белок, первичная и вторичная структура, а также функция которого, совершенно аналогичны соответствующим характеристикам широко распространенного в природе белка — **кальмодулина**. И тропонин С, и кальмодулин связывают четыре иона кальция на молекулу белка и имеют мол. массу 17 000. Тонкий филамент поперечнополосатой мышцы состоит из F-актина, тропомиозина и трех тропониновых компонентов: ТnC, ТnI и ТnT (рис. 56.3). Тропомиозин и тропониновая система чередуются через каждые 38,5 нм.

Миозин по массе составляет 55% мышечного белка и образует толстые филаменты (нити). Он представляет собой асимметричный гексамер с мол. массой 460 000. В миозине различают **фибриллярную часть**, состоящую из двух переплетенных спиралей, каждая из которых имеет на одном конце **глобулярную «головку»** (рис. 56.4). Гексамер включает одну

пару тяжелых цепей (мол. масса 200 000) и две пары легких цепей (мол. масса 15 000 — 27 000). Миозин скелетных мышц обладает **АТР-гидролизующей (АТР-азной) активностью** и связывается с нерастворимой молекулой — F-актином.

Большая часть сведений о миозине получена при изучении продуктов его частичного гидролиза. Обработка миозина трипсином приводит к образованию двух фрагментов — меромиозинов. **Легкий меромиозин (ЛММ)** состоит из агрегированных нерастворимых α -спиральных фибрилл (рис. 56.5). Он не обладает АТР-азной активностью и не связывается с F-актином.

Тяжелый меромиозин (ТММ) представляет собой растворимый белок с мол. массой 340 000, содержащий и фибриллярный, и глобулярный фрагменты (рис. 56.5). Он обладает **АТР-азной активностью** и связывается с F-актином. При гидролизе ТММ па-

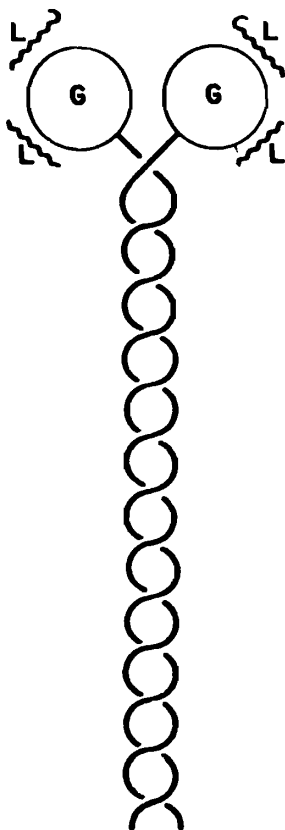


Рис. 56.4. Схема молекулы миозина с двумя переплетенными α -спиралями (фибриллярная часть), глобулярной областью (G) и легкими цепями (L).

паином образуются два субфрагмента, S-1 и S-2. S-2 имеет фибриллярную структуру, не проявляет АТРазной активности и не связывает F-актин.

S-1 характеризуется мол. массой 115 000, проявляет АТРазную активность и в отсутствие АТРа связывает актин, снабжая его «наконечниками» (рис. 56.6). Хотя и S-1, и ТММ сами обладают АТРазной активностью, но при добавлении F-актина эта активность возрастает в 100—200 раз. Показано, что F-актин резко ускоряет освобождение продуктов действия миозиновой АТРазы — АDР и неорганического фосфата. Таким образом, хотя F-актин сам по себе не влияет на гидролиз АТРа, его способность стимулировать освобождение продуктов АТРазной реакции обеспечивает значительное увеличение общей скорости катализа.

α -Актинин — это обнаруживаемая в зоне Z-линии белковая молекула, к которой присоединяются концы F-актиновых молекул тонких филаментов (рис. 56.2).

Молекулярная функция мышц

Вопрос о связи структуры и функции мышц может быть сформулирован в биохимических терминах следующим образом: **каким образом гидролиз АТРа приводит к видимому невооруженным глазом движению?** Как отмечалось выше, мышечное сокращение состоит из циклов присоединения и отсоединения глобулярной «головки» миозина от нити F-актина. Присоединение сопровождается изменением актин —

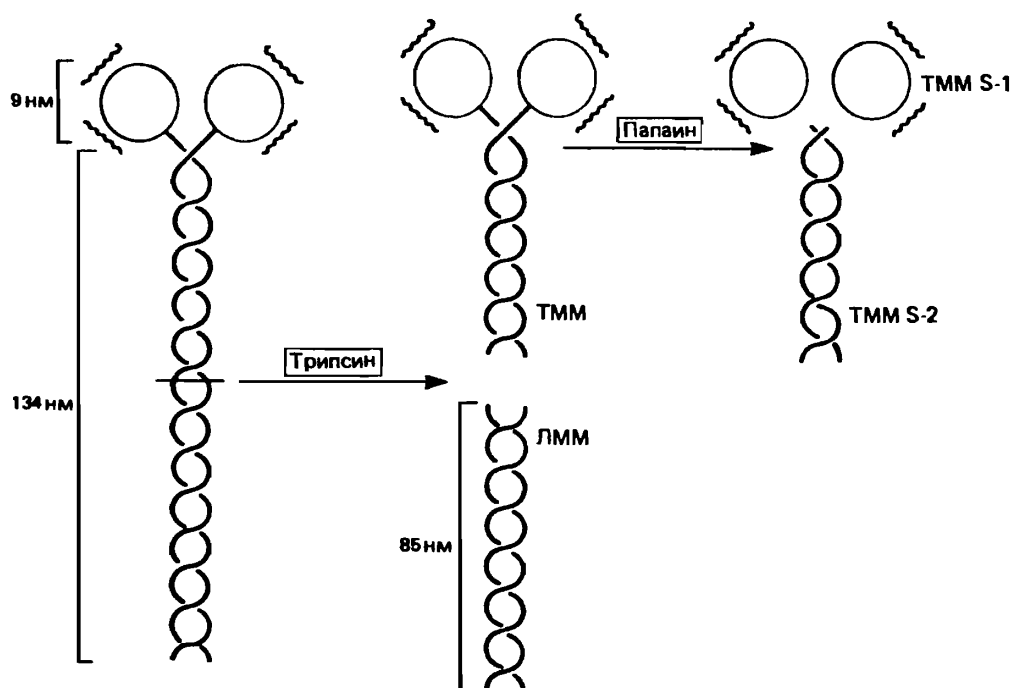


Рис. 56.5. Ферментативное расщепление миозина. ТММ — тяжелый меромиозин; ЛММ — легкий меромиозин; S-1 — фрагмент 1; S-2 — фрагмент 2.



Рис. 56.6. Образование «наконечников» при связывании актиновых филаментов с S-1-фрагментами миозина. (Courtesy of Professor James Spudis, Stanford University.)

миозинового взаимодействия, так что актиновые и миозиновые филаменты скользят относительно друг друга. Энергия для этого скольжения поставляется за счет гидролиза АТФ. Гидролиз АТФ миозиновой АТФазой значительно ускоряется при связывании миозиновой «головки» с F-актином. Биохимический цикл мышечного сокращения состоит из пяти стадий (рис. 56.7).

1) Миозиновая головка сама по себе может гидролизовать АТФ до АДФ и неорганического фосфата, но не обеспечивает освобождение продуктов гидролиза. Следовательно, этот процесс носит скорее стехиометрический, чем каталитический характер.

2) Миозиновая головка, содержащая АДФ и неорганический фосфат, может свободно вращаться под

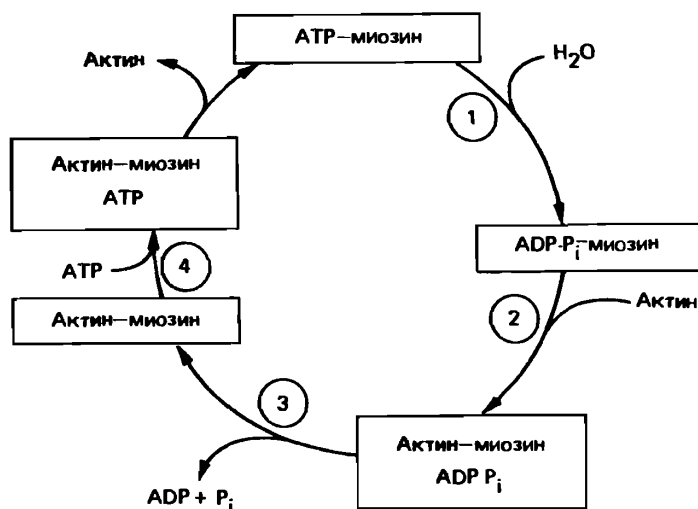


Рис. 56.7. Гидролиз АТФ запускает цикл ассоциации и диссоциации актина и миозина в пяти реакциях, описанных в тексте; P_i — неорганический фосфат. (Modified from Stryer L. Biochemistry, 2nd ed. Freeman, 1981.)

большими углами и (при достижении нужного положения) связываться с F-актином, образуя с осью фибриллы угол около 90° .

3) Это взаимодействие обеспечивает высвобождение АДФ и неорганического фосфата из актин—миозинового комплекса. Поскольку наименьшую энергию актомиозиновая связь имеет при величине угла 45° , миозин изменяет свой угол с осью фибриллы с 90° на примерно 45° , продвигая актин (на 10—15 нм) в направлении центра саркомера.

4) Новая молекула АТФ связывается с комплексом миозин—F-актин.

5) Комплекс миозин—АТФ обладает низким сродством к актину и поэтому происходит отделение миозиновой (АТФ) головки от F-актина. Последняя стадия и есть собственно расслабление, которое таким образом отчетливо зависит от связывания АТФ с актин—миозиновым комплексом. АТФ вновь гидролизует миозиновой головкой без высвобождения АДФ и неорганического фосфата, и цикл возобновляется.

Таким образом, АТФ отсоединяет миозиновую головку от тонкой нити и является движущей силой сокращения. Эффективность такого сокращения — около 50%; эффективность двигателя внутреннего сгорания — менее 20%.

Регуляция сокращения и расслабления мышц

Сокращение любых мышц протекает по общему механизму, описанному выше. Мышечные волокна разных организмов и даже разных тканей одного организма могут обладать различными молекулярными механизмами регуляции их сокращения и расслабления. Заметим, что во всех случаях ключевая регуляторная роль принадлежит ионам Ca^{2+} . Существуют два главных механизма регуляции мышечного сокращения: актиновый и миозиновый.

Актиновая регуляция

Актиновая регуляция характерна для поперечнополосатых мышц позвоночных — скелетных и сердечной. Согласно общему механизму, рассмотренному выше, единственным потенциально лимитирующим фактором в цикле мышечного сокращения может быть АТФ. Скелетные мышцы ингибируются в покое и деингибируются с активацией сокращения. Роль ингибитора в поперечнополосатых мышцах выполняет тропониновая система, связанная в тонких филаментах с тропомиозином и F-актином (рис. 56.3). При отсутствии тропомиозин—тропониновой системы регуляция сокращения поперечнополосатых мышц (или АТФазы как биохимического индикатора сокращения) не осуществляется. Как отмечалось выше, тропомиозин локализуется в щели F-актина, а три компонента тропонина — TnT, TnI и TnC —

связаны с комплексом F-актин—тропомиозин. TnI предотвращает присоединение миозиновой головки к соответствующему связывающему сайту F-актина, либо изменяя конформацию F-актина (через тропомиозиновые молекулы), либо просто перемещая («вращая») тропомиозин в то положение, в котором он блокирует сайты связывания миозиновых головок на F-актине. В любом случае предотвращается активация миозиновой АТРазы, которая опосредована этим связыванием. Таким образом, система TnI блокирует цикл сокращения на стадии 2 схемы, представленной на рис. 56.7. Именно это лежит в основе ингибированного состояния расслабленной поперечнополосатой мышцы.

Мышечное сокращение опосредуется Ca^{2+} . В саркоплазме покоящейся мышцы концентрация кальция составляет 10^{-7} — 10^{-8} моль/л. Кальций попадает в саркоплазматический ретикулум в результате активного транспорта при участии Ca^{2+} -связывающего белка, называемого кальсеквестрином. Саркомер окружен возбудимой мембраной с поперечными каналами, подходящими к саркоплазматическому ретикулуму. При возбуждении мембраны саркомера, например, в случае взаимодействия ацетилхолиновых рецепторов с ацетилхолином, Ca^{2+} быстро высвобождается из саркоплазматического ретикулума в саркоплазму, так что его концентрация в ней возрастает до 10^{-5} моль/л. Ca^{2+} -связывающие сайты на TnC в тонком филаменте быстро насыщаются Ca^{2+} . Комплекс TnC- 4Ca^{2+} реагирует с TnI и TnT, влияя на их взаимодействие с тропомиозином. Последний в соответствии с этим либо просто отсоединяется, либо изменяет конформацию F-актина таким образом, что появляется возможность взаимодействия ADP- P_i -миозиновой головки с F-актином и начинается сократительный цикл.

Расслабление происходит, когда 1) содержание Ca^{2+} в саркоплазме падает ниже 10^{-7} моль/л вследствие его поглощения саркоплазматическим ретикулумом; 2) комплекс TnC- 4Ca^{2+} утрачивает свой Ca^{2+} ; 3) тропонин, реагируя с тропомиозином, ингибирует дальнейшее взаимодействие миозиновой головки с F-актином и 4) миозиновые головки в присутствии АТР отделяются от F-актина, вызывая расслабление. Таким образом, Ca^{2+} регулирует мышечное сокращение при помощи аллостерического механизма, опосредованного в мышце TnC, TnI, TnT, тропомиозином и F-актином.

В сердечной мышце основным источником ионов Ca^{2+} для возбуждения служит внеклеточная жидкость. Если Ca^{2+} во внеклеточной жидкости отсутствует, сокращения сердечной мышцы прекращаются в течение одной минуты; скелетная мышца в таких условиях может сокращаться часами.

Исчезновение АТР из саркоплазмы приводит к следующим последствиям: 1) Ca^{2+} -насос саркоплазматического ретикулума перестает поддержи-

вать низкую концентрацию Ca^{2+} в саркоплазме; при этом стимулируется взаимодействие миозиновых головок с F-актином; 2) не происходит зависящего от АТР отделения миозиновых головок от F-актина, при этом наступает трупное окоченение.

Мышечное сокращение не принадлежит к ряду феноменов «все или ничего», как может показаться читателю. Оно представляет собой тонкое динамическое равновесие между процессами присоединения и отделения миозиновых головок от F-актина. Система находится под сложным регуляторным влиянием со стороны нервной системы.

Миозиновая регуляция сокращения

Как отмечалось выше, во всех мышцах присутствуют актин, миозин и тропомиозин, но тропонинную систему содержат только поперечнополосатые мышцы позвоночных. Следовательно, механизмы регуляции сокращения в разных сократительных системах должны различаться.

Молекулярные структуры гладких мышц весьма сходны с соответствующими структурами поперечнополосатых мышц, но расположение саркомеров в них не дает характерную для поперечнополосатых мышц картину исчерченности. Подобно скелетным мышцам, гладкие мышцы содержат молекулы α -актина и тропомиозина, но не обладают тропонинной системой; кроме того, легкие цепи миозиновых молекул гладких мышц отличаются от аналогичных цепей поперечнополосатых мышц. Тем не менее сокращение гладких мышц, как и сокращение поперечнополосатых, регулируется Ca^{2+} .

Когда миозин гладких мышц связывается с F-актином в отсутствие других мышечных белков, таких, как тропомиозин, образующийся комплекс лишен заметной АТРазной активности. Это резко отличается от ситуации, характерной для взаимодействия с F-актином миозина поперечнополосатых мышц, когда регистрируется высокая активность АТРазы. Миозин гладкой мускулатуры содержит легкую цепь (р-легкую цепь), предотвращающую связывание миозиновых головок с F-актином. Для того чтобы эта легкая цепь не препятствовала активации миозиновой АТРазы при взаимодействии с F-актином, она должна предварительно подвергнуться фосфорилированию. Фосфорилирование легкой цепи р запускает процессы ассоциации—диссоциации в сократительном цикле гладкой мускулатуры.

В саркоплазме гладких мышц присутствует киназа легких цепей миозина, зависящая от кальция. Для активации этого фермента кальцием требуется связывание его субъединицы, имеющей молекулярную массу 105 000, с кальмодулином- 4Ca^{2+} (рис. 56.8). Активированная кальмодулином- 4Ca^{2+} киназа легких цепей фосфорилирует легкую цепь р, которая при этом перестает ингибировать взаимодействие

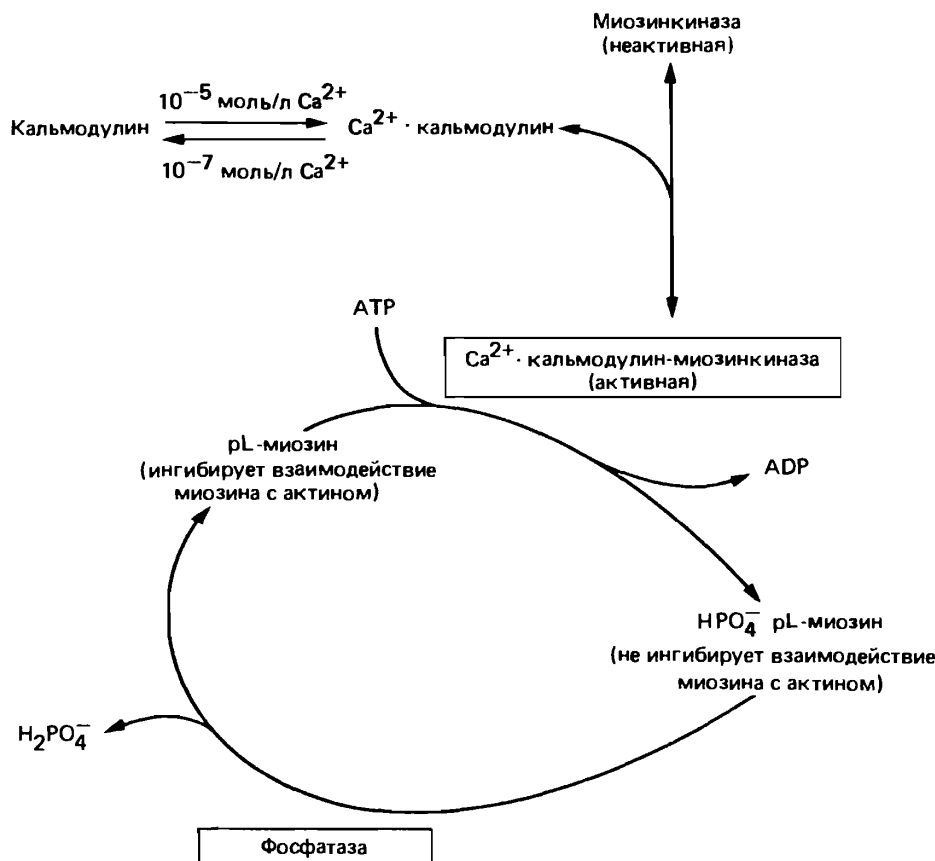


Рис. 56.8. Кальциевая регуляция сокращения гладких мышц. (Adapted from Adelstein R. S., Eisenberg R. Regulation and kinetics of actin—myosin ATP interaction. *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, **49**, 921.)

миозина с F-актином. Таким образом, начинается сократительный цикл (рис. 56.8).

Расслабление гладких мышц происходит, когда 1) содержание ионов Ca^{2+} в саркоплазме падает ниже 10^{-7} моль/л; 2) Ca^{2+} отсоединяется от кальмодулина, ко горый в свою очередь отделяется от киназы легкой цепи миозина, вызывая ее инактивацию; 3) нового фосфорилирования легкой цепи р не происходит, и протеинфосфатаза легкой цепи, которая постоянно активна и не зависит от кальция, отщепляет от легкой цепи р ранее присоединившиеся к ней фосфаты; 4) дефосфорилированная легкая цепь р миозина ингибирует связывание миозиновых головок с F-актином и подавляет активность АТРАЗы; 5) миозиновые головки в присутствии АТФ отделяются от F-актина, а повторное их связывание произойти не может из-за присутствия в системе дефосфорилированной легкой цепи р. В результате описанных событий происходит расслабление мышц.

В табл. 56.1 суммируются и сравниваются данные о регуляции актин—миозинового взаимодействия (активации миозиновой АТРАЗы) в поперечнополосатых и гладких мышцах.

Киназа легких цепей миозина не является прямым объектом активации со стороны сАМР. Тем не менее обычная активируемая сАМР протеинкиназа (см. гл. 44) может фосфорилировать этот фермент

(не легкую цепь р саму по себе). Фосфорилированная киназа легких цепей миозина обладает значительно меньшим сродством к кальмодулин- Ca^{2+} и потому менее чувствительна к активации. Соответственно повышение уровня сАМР уменьшает сократительную реакцию гладких мышц на увеличение содержания Ca^{2+} в саркоплазме. Описанный молекулярный механизм может объяснить расслабляющее действие на гладкие мышцы β -адренергической стимуляции. **Фенотиазины**, широко применяющиеся в качестве антипсихотических средств, связываются с кальмодулином и предотвращают его взаимодействие с кальций-зависимыми ферментами. Фенотиазины вызывают также расслабление гладкой мускулатуры.

Поперечнополосатые мышцы моллюсков, таких, как морской гребешок, обладают системой миозиновой регуляции сокращений. Миозин и F-актин гребешка, подобно этим белкам в гладких мышцах, лишены АТРАЗной активности, что обусловлено ингибиторными свойствами «регуляторной» легкой цепи миозина гребешка. Торможение актин—миозинового взаимодействия у морского гребешка снимается при прямом связывании Ca^{2+} со специфическим центром молекулы миозина. Этот регуляторный механизм не требует ковалентной модификации миозина и (или) добавления специфических белков, таких, как кальмодулин или ТnC.

Таблица 56.1. Актин –миозиновые взаимодействия в поперечнополосатых и гладких мышцах

	Поперечнополосатые мышцы	Гладкие мышцы (и немые мышечные клетки)
Белки мышечных филаментов	Актин Миозин (гексамер) Тропомиозин Тропонин (TnI, TnT, TnC) Есть	Актин Миозин (гексамер) ¹⁾ Тропомиозин
Спонтанное взаимодействие F-актина с одним миозином (спонтанная активация миозиновой АТРаза F-актином)	Есть	Нет
Ингибитор взаимодействия F-актина с миозином (ингибитор F-актин-зависимой активации АТРаза)	Тропомиозин (TnI)	Нефосфорилированная р-легкая цепь миозина
Сокращение активируется	Ca ²⁺	Ca ²⁺
Прямое действие Ca ²⁺	4Ca ²⁺ связываются с TnC	4Ca ²⁺ связываются с кальмодулином
Действие связанного с белком Ca ²⁺	TnC·4Ca ²⁺ препятствует ингибирующему эффекту TnI на взаимодействие F-актина с миозином (делает возможной активацию АТРаза F-актином)	Кальмодулин·4Ca ²⁺ активирует киназу легких цепей миозина, которая фосфорилирует р-легкую цепь миозина. Фосфорилированная р-легкая цепь перестает ингибировать взаимодействие F-актина с миозином (делает возможной активацию АТРаза F-актином)

¹⁾ Легкие цепи миозина в поперечнополосатых и гладких мышцах различаются.

Фосфорилирование мышечных белков

Фосфорилирование легкой цепи миозина гладких мышц снимает ее ингибиторное влияние на взаимодействие актина с миозином и тем самым запускает сократительный цикл. Таким образом, для начала взаимодействия актина с миозином в гладких мышцах требуется фосфорилирование.

Одна из пар легких цепей миозина скелетных мышц также может подвергаться фосфорилированию, которое, однако, не влияет на активируемую актином миозиновую АТРаза (что характерно для миозина гладких мышц). Предполагается, что фосфат на легких цепях миозина может образовывать хелат с Ca²⁺ (связанным с комплексом тропомиозин-TnC-актин), увеличивая тем самым скорость образования поперечных мостиков между миозиновыми головками и актином.

Некоторые новые данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование тяжелых цепей миозина служит необходимым условием для их сборки в толстые филаменты в скелетных мышцах, гладких мышцах и немые мышечные клетки (см. ниже).

TnI и пептидный компонент Ca²⁺-насоса саркоплазматического ретикула в сердечной мышце могут фосфорилироваться сАМР-зависимой протеинкиназой. Между фосфорилированием TnI и усилением сокращений сердечной мышцы, вызываемым катехоламинами, имеется некоторая корреляция. Этот механизм может обуславливать инотропный эффект (повышение сократимости) β-адренергических соединений на сердце.

Метаболизм мышц

АТР, необходимый в качестве постоянного источника энергии для мышечного цикла сокращения—расслабления, может образовываться за счет гликолиза, окислительного фосфорилирования, креатинфосфата или двух молекул АДФ. Запасы АТР в скелетной мышце при сокращении быстро истощаются, и их хватает менее чем на секундное сокращение. В медленных скелетных мышцах, обладающих значительными резервами O₂ в миоглобине, основной источник регенерации АТР—окислительное фосфорилирование. Быстрые скелетные мышцы регенерируют АТР главным образом в ходе гликолиза.

Фосфагены, такие как креатинфосфат, предотвращают быстрое истощение запасов АТР, поставляя легко используемый макроэргический фосфат, необходимый для ресинтеза АТР из АДФ. Креатинфосфат образуется из АТР и креатина в период расслабления мышцы, когда потребность в АТР не столь велика. Фосфорилирование креатина катализируется креатинфосфокиназой (КФК)—специфичным для мышц ферментом, который используется при диагностике острых или хронических мышечных нарушений.

Саркоплазма скелетных мышц содержит большие запасы гликогена, локализованного в гранулах, примыкающих к I-диску. Высвобождение глюкозы из гликогена зависит от специфического мышечного фермента гликогенфосфорилазы (см. гл. 19). Для того чтобы обеспечить образование глюкозо-6-фосфата, используемого в процессе гликолиза,

гликогенфосфорилаза *b* должна быть активирована в фосфорилазу *a*. Для активации требуется фосфорилирование фосфорилазы *b*, осуществляемое фосфорилаза-*b*-киназой (см. гл. 19). Активация фосфорилаза-*b*-киназы, которая также осуществляется путем фосфорилирования фермента, стимулируется Ca^{2+} . Таким образом, Ca^{2+} не только стимулирует мышечное сокращение, но и усиливает образование необходимого для этого процесса источника энергии — АТФ. Мышечная гликогенфосфорилаза *b* отсутствует при специфическом заболевании мышц (болезнь Мак-Ардуэ), которое представляет собой одну из форм гликогенозов.

АТФ в мышечной ткани образуется и в ходе окислительного фосфорилирования — процесса, требующего постоянного притока кислорода. Мышцы, характеризующиеся высокой потребностью в кислороде в связи с длительным состоянием сокращения (например, для поддержания определенной позы), обладают способностью резервировать кислород в миоглобине (см. гл. 6). Поскольку кислород связывается в миоглобине с гемом, мышцы, содержащие миоглобин, окрашены в красный цвет в отличие от не содержащих его белых скелетных мышц. В табл. 56.2 приведены сравнительные данные о некоторых свойствах быстрых (или белых) и медленных (или красных) скелетных мышц.

Миоаденилаткиназа — фермент, присутствующий в мышцах, катализирует образование одной молекулы АТФ и одной молекулы АМР из двух молекул АДФ. Эта реакция, показанная на рис. 56.9, сопряжена с гидролизом АТФ миозиновой АТФазой во время мышечного сокращения. На рисунке, кроме того, отражена связь между различными источниками АТФ и его потреблением в ходе сокращения мышцы.

У людей главным после жира источником запасенной энергии служит белок скелетных мышц. Это объясняет очень большую потерю мышечной массы (особенно у взрослых людей), наблюдающуюся при длительной калорической недостаточности.

Изучению распада тканевого белка *in vivo* препятствует тот факт, что аминокислоты, высвобождающиеся при внутриклеточной деградации белков, могут в значительной степени реутилизировать-

Таблица 56.2. Характеристика быстрых и медленных скелетных мышц

	Быстрая скелетная мышца	Медленная скелетная мышца
Активность миозиновой АТФазы	Высокая	Низкая
Утилизация энергии	Высокая	Низкая
Цвет	Белый	Красный
Миоглобин	Нет	Есть
Частота сокращений	Высокая	Низкая
Длительность сокращения	Малая	Большая

ться для синтеза белка в клетке или переноситься к другим органам и вступать там в анаболические процессы. Однако актин и миозин после синтеза их пептидных связей метилируются с образованием **3-метилгистидина**. В ходе внутриклеточного распада актина и миозина 3-метилгистидин высвобождается и выделяется с мочой. При введении метки крысам или человеку было показано, что экскреция с мочой метилированной аминокислоты служит надежным показателем скорости деградации белка миофибрилл в мышцах. Фракционная скорость распада мышечного белка у пожилых людей мало отличается от этого показателя у молодых, но, поскольку масса мышц при старении уменьшается, снижается и вклад этой ткани в общее возрастное увеличение распада белков в организме.

Как отмечалось выше, скелетные мышцы служат основным резервом белка в организме. Они обладают также высокой активностью в отношении деградации одних и синтеза других аминокислот. У млекопитающих именно мышцы являются главным местом катаболизма аминокислот с разветвленной цепью. Мышечная ткань окисляет лейцин до CO_2 и превращает углеродный скелет аспартата, аспарагина, глутамата, изолейцина и валина в интермедиаты цикла трикарбоновых кислот. Способность мышц разрушать аминокислоты с разветвленной цепью при голодании и диабете возрастает в 3—5 раз.

Мышцы также синтезируют и высвобождают большие количества аланина и глутамина. В синтезе этих соединений используются аминокислоты, которые образуются при распаде аминокислот с разветвленной цепью и затем переносятся на α -кетоглутарат и пируват в ходе реакций трансаминирования. Источником почти всего пирувата, идущего на синтез аланина, является гликолиз из экзогенной глюкозы. Эти реакции формируют так называемый глюкозо-аланиновый цикл, в котором аланин мышц используется в процессе печеночного глюконеогенеза и в то же время доставляет в печень аминокислоты, удаляемые в виде мочевины.

Углеродный скелет аминокислот, подвергшихся деградации и включившихся в цикл трикарбоновых кислот в мышечной ткани, превращается главным образом в глутамин и пируват, который далее окисляется или превращается в лактат. Таким образом, при голодании или в период после всасывания большая часть образующихся в процессе распада мышечного белка аминокислот покидает мышцы; исключением являются изолейцин, валин, глутамат, аспарат и аспарагин: они участвуют в образовании глутамина, который высвобождается мышцами и используется другими тканями.

Давно известно, что работающая мышца высвобождает аммиак. Как установлено в настоящее время, непосредственным источником аммиака в скелетной

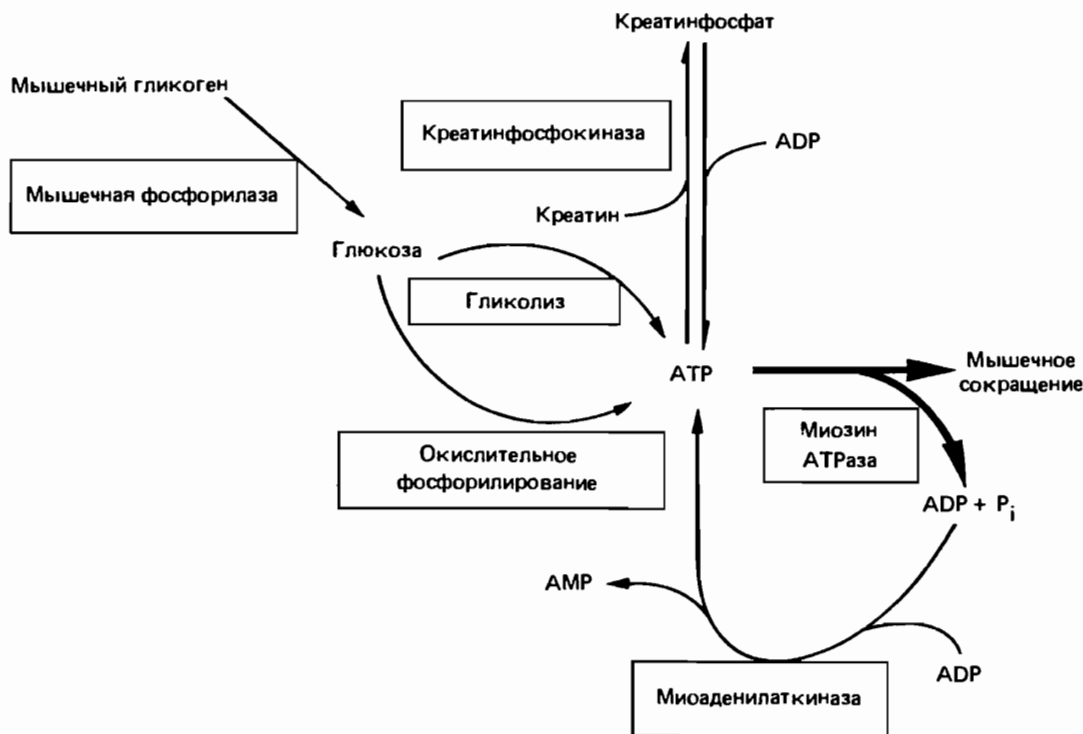


Рис. 56.9. Множественные источники АТФ в мышце.

мышце служит АМР, который дезаминируется в IMP под действием аденилатдеаминазы. IMP может вновь превращаться в АМР в ходе реакций, использующих аспартат и катализируемых аденилсукцинатсинтетазой и аденилсукциназой (см. гл. 35).

КЛЕТОЧНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И ЦИТОСКЕЛЕТ

Совершенно очевидно, что механическую работу, включающую амёбодные движения, морфогенез, деление, эндоцитоз, экзоцитоз, внутриклеточный транспорт и изменение формы, выполняют и немые мышечные клетки. Эти клеточные функции осуществляются обширной внутриклеточной сетью волокнистых структур, образующих цитоскелет. Клеточная цитоплазма — это не просто мешок с жидкостью, как думали раньше. Практически все эукариотические клетки содержат три типа волокнистых структур: **актиновые филаменты (нити)** (7—9,5 нм в диаметре), **микротрубочки** (25 нм) и **промежуточные нити** (10—12 нм). Каждый из этих типов можно отличить с помощью специфических биохимических и электронно-микроскопических методик.

Немышечный актин

Белок G-актин, выделенный из немые мышечных клеток, имеет мол. массу около 43 000 и, подобно мышечному актину (α -актину), содержит N-метилгистидиловые остатки. В присутствии магния

и хлористого калия этот актин спонтанно полимеризуется с образованием двуспиральных **F-актиновых нитей**, подобных мышечным филаментам. В немые мышечных клетках имеется по меньшей мере два типа актина: β -актин и γ -актин. Оба они могут присутствовать в одной и той же клетке и даже, вероятно, сополимеризоваться в одну и ту же нить. В цитоплазме клеток актин образует **микрофиламенты** диаметром 7—9,5 нм, которые часто имеют вид пучков спутанных сетей. Пучки микрофиламентов располагаются под плазматической мембраной покоящихся клеток и называются «**стрессовыми**» **фибриллами**. Эти фибриллы имеют структуру двойной спирали и декорированы миозиновым фрагментом S-1 (рис. 56.10). Стрессовые фибриллы исчезают при увеличении клеточной подвижности, а также при злокачественной трансформации клеток химическими агентами или онкогенными вирусами.

Микрофиламенты плотно упакованы в виде петливой сети, располагающейся под ведущим краем или «**бахромой**» подвижной клетки (рис. 56.11). Актиновые микрофиламенты обнаруживаются во всех клеточных микроотростках, таких, как филоподии и микроворсинки. Например, микроворсинки клеток слизистой кишечника содержат 20—30 актиновых микрофиламентов, расположенных продольно, как показано на рис. 56.12. Эти микрофиламенты, декорированные миозиновым фрагментом S-1, проявляют однородную полярность (рис. 56.12). В основании микроворсинок находятся миозиновые филаменты, способные втягиваться вместе с актиновыми

ственно, процесса сокращения, опосредуется фосфорилированием легкой цепи миозина.

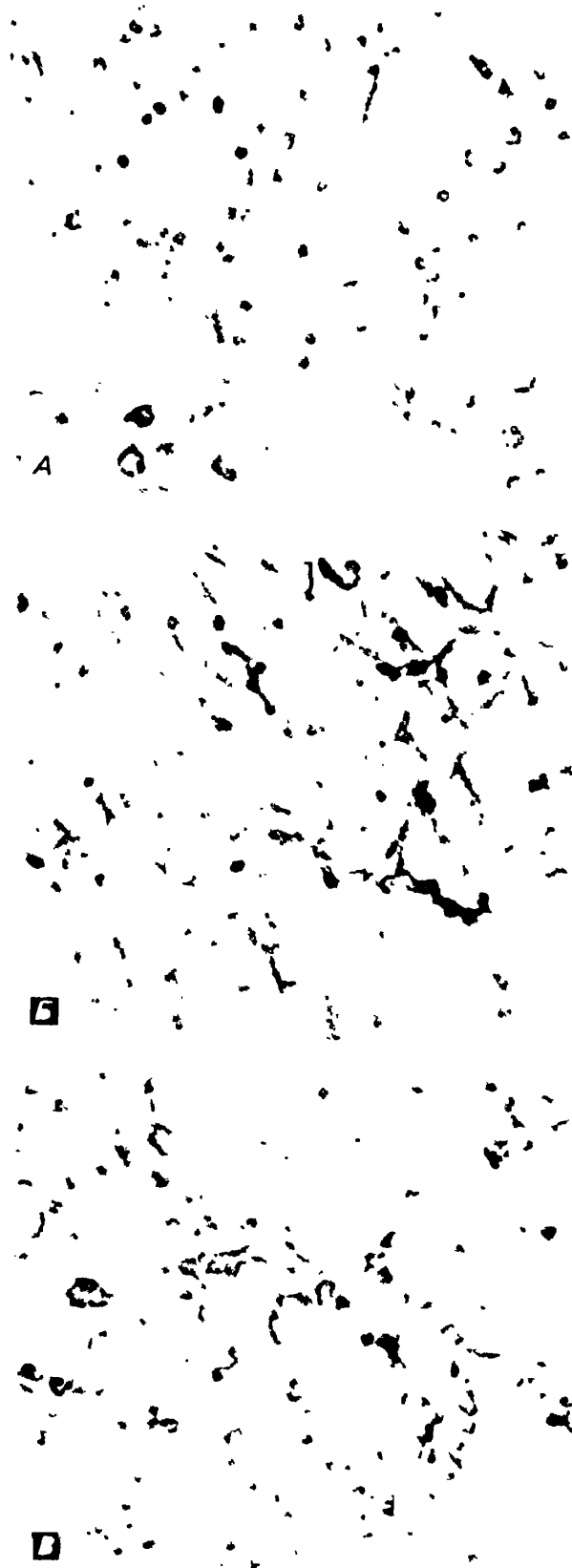
Актин и миозин обнаруживаются также между полюсами веретена и хромосомами и вдоль борозды дробления в телофазе митоза.



Рис. 56.10. Электронная микрофотография фрагмента цитоскелета, к которому перед быстрым замораживанием был добавлен миозиновый субфрагмент 1 (S-1). Почти все филаменты продольных пучков и многие лежащие между ними филаменты превратились в толстые канатоподобные структуры (в кружочке). Однако некоторые филаменты, самопроизвольно расположившиеся между пучками, остались лишенными «украшений» (стрелка); это преимущественно промежуточные филаменты. $\times 70\,000$; в кружочке $\times 200\,000$. (Reproduced, with permission, from Heuser J. E., Kirschner M. W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 1980, 86, 212.)

нитеями в микроворсинки. Процесс сокращения не сопровождается какими-либо изменениями длины актина или миозина и, таким образом, должен осуществляться, как и в мышцах, путем скольжения филаментов, т. е. с помощью механизма, сформулированного Хаксли. Как и в гладких мышцах, активация актин—миозинового взаимодействия и, соответ-

Рис. 56.11. Препараты бахромы или ламеллоподиев из фибробластов (увеличение). *А.* Полная фиксация. *Б.* Материал перед фиксацией экстрагирован тритоном. *В.* Экстракция тритоном проведена после фиксации. В первом случае (фото *А*) плазматическая мембрана интактна и внутренняя структура не видна. Во втором случае (фото *Б*) плазматическая мембрана удалена и видны лежащие под ней переплетения «кудрявых» филаментов. Фото *В* — плазматическая мембрана также удалена, но уже после фиксации альдегидом. Тонкая сеть подлежащих филаментов после химической фиксации выглядит более грубой. *А.* $\times 140\,000$; *Б* и *В.* $\times 115\,000$. (Reproduced, with permission, from Heuser J. E., Kirschner M. W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 1980, 86, 212.)



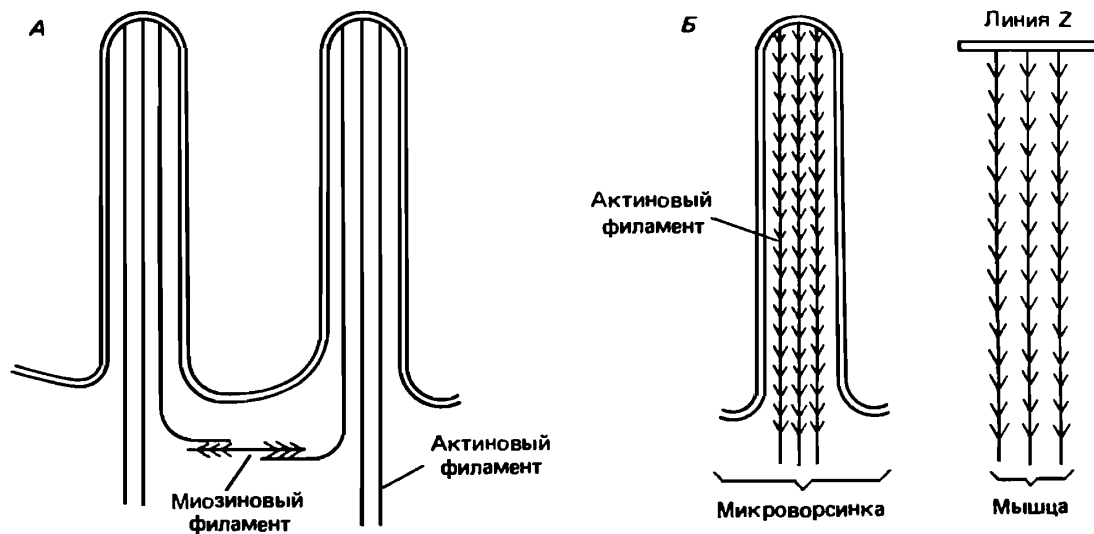


Рис. 56.12. Микроворсинки — это маленькие цитоплазматические выросты эпителиальных клеток, выстилающих тонкий кишечник и увеличивающих всасывающую поверхность. Микроворсинки содержат как актиновые, так и миозиновые филаменты и могут сокращаться подобно мышечным клеткам. Как показано на схеме А, пучки актиновых филаментов входят внутрь каждой микроворсинки; миозиновые филаменты расположены в основании микроворсинок. На схеме В ориентация актиновых филаментов определена с помощью обработки микроворсинок изолированными «головками» мышечного миозина (тяжелый меромиозин); эти фрагменты сохраняют способность связываться с актиновыми филаментами. При этом образуются комплексы в виде «наконечников стрел», указывающих направление движения филаментов. (Reproduced, with permission, from Lazarides E, Revel J. P.: The molecular bases of cell movement. Sci. Am. [May] 1979; 240, 100.)

Актиновые микрофиламенты в неммышечных клетках связаны с другими белками, подобными мышечным. На плазматических мембранах в местах прикрепления микрофиламентов и на кончиках микроворсинок присутствует **α-актинин**. Геодезические купола — «леса» цитоскелета, окружающие ядра эукариотических клеток, состоят из актина, **α-актинина** и тропомиозина. **α-Актинин** обнаруживается и в самих актиновых микрофиламентах.

Как отмечалось выше, **миозин** присутствует в основании микроворсинок в связанном с актиновыми микрофиламентами состоянии. Он выявляется также по ходу актиновых волокон, но в виде более тонких и коротких нитей, чем в мышцах. Эти нити, по-видимому, играют роль в поддержании волокнистой структуры актина.

Тропомиозин, как упоминалось выше, участвует в образовании куполов, окружающих ядра. Тропомиозин, локализуемый вдоль актиновых микрофиламентов, вероятно, выполняет структурную, а не двигательную функцию.

Функция неммышечного актина регулируется, по-видимому, несколькими специализированными белками. **Профилин** предотвращает полимеризацию G-актина даже в присутствии достаточных концентраций магния и хлористого калия. **Филамин** способствует образованию сети актиновых микрофиламентов. Тропомиозин усиливает формирование пучков стрессовых фибрилл актина. **α-Актинин** способствует прикреплению актиновых микрофиламентов к мембранам, субстрату и другим клеточным органеллам.

Природный пептид **цитохалазин** разрушает микрофиламенты и предотвращает их полимеризацию. Он часто используется для проверки присутствия микрофиламентов или тестирования их функции.

Подвижность клетки, очевидно, детерминирована **бахромчатой мембраной** или ламеллоподием, содержащим пальцеподобные выросты, называемые филоподиями. Бахрома своей верхушкой присоединяется к субстрату при помощи филоподиев, и клетка как бы перетекает вперед. Бахрома освобождается и вновь складывается на верхушке клетки, пока новые филоподии не присоединятся к субстрату (рис. 56.13).

Микротрубочки

Микротрубочки — это важнейший компонент клеточного цитоскелета. Они необходимы для образования и функционирования **митотического веретена** и, следовательно, присутствуют во всех эукариотических клетках. Эти органеллы выполняют и ряд других клеточных функций. Они определяют внутриклеточное перемещение эндоцитозных и экзоцитозных везикул (пузырьков), служат основным структурным компонентом **ресничек** и **жгутиков** и главным белковым компонентом **аксонов** и **дендритов**. Микротрубочки поддерживают их структуру и участвуют в аксоплазматическом токе веществ вдоль этих нервных отростков.

Микротрубочки представляют собой цилиндры из 13 продольно расположенных **протофиламентов**,



Рис. 56.13. Отдельная клетка тканевой культуры. Структура внизу справа — это бахрома или ламеллоподий, который указывает на ведущий край клетки. Клетка изображена под косым углом, как она движется сквозь субстрат, образуя с помощью бахромы новые точки прикрепления. (Reproduced, with permission, from Lazarides E., Revel J.P.: The molecular basis of cell movement. Sci. Am. [May] 1979; 240, 100.)

каждый из которых состоит из димеров α - и β -тубулина (рис. 56.14). α -Тубулин (мол. масса 53 000) и β -тубулин (мол. масса 55 000) являются близкородственными белками. Тубулиновые димеры собираются в протофиламенты, затем в тяжи и, наконец, в цилиндры, как показано на рис. 56.15. Для сборки тубулина в микротрубочки требуются две молекулы GTP на димер тубулина. Два белка, получившие название «высокомолекулярный белок» (ВМБ) и «таубелок», способствуют образованию микротрубочек, но не обязательны для их сборки. В сборке микротрубочек могут участвовать также кальмодулин и реакции фосфорилирования.

Многие известные алкалоиды способны предотвращать сборку микротрубочек. К ним относятся колхицин и его производное демекольцин (применяющийся для лечения острого подагрического артрита), винбластин (алкалоид Vinca, используемый для лечения рака) и гризеофульвин (противогрибковое средство).

Микротрубочки «растут» в одном направлении от специфических центров (центриолей) внутри клетки. На каждой хроматиде хромосомы (см. гл. 37) имеется кинетохор, откуда начинается рост микротрубочек. Многие нарушения в делении хромосом являются результатом аномалий в структуре или функции кинетохоров. Движение хромосом в анафазе митоза зависит от микротрубочек, но молекуляр-



Рис. 56.14. Электронная микрофотография микротрубочки с деформированной вследствие быстрого замораживания структурой. В левой половине рисунка видна наружная поверхность микротрубочки с пучками протофиламентов, отстоящими друг от друга на 55 нм. Справа микротрубочка лопнула, так что видны ее внутренние стенки и расположенные под углом полосы, разделенные промежутками в 40 нм. Считают, что ретикулум, окружающий микротрубочку, состоит из неполимеризованного тубулина и связанных с микротрубочкой белков. (Reproduced, with permission, from Heuser J. E., Kirschner M. W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. J. Cell Biol. 1980, 86, 212.)

ный механизм этого эффекта пока не расшифрован.

В основании **жгутиков** и **ресничек** эукариотических клеток расположена структура, называемая **базальным телом**; она идентична центриоле и функционирует как центр формирования девятипарной структуры микротрубочек в жгутиках и ресничках. Эти органеллы специализированы для движения. Каждый член пары (дублета) имеет со своим партнером общую стенку из трех протофиламентов; пары соединены между собой гибким белком, **нексином**. Движение осуществляется путем скольжения дублетов относительно друг друга, что вызывает волнообразные изгибы ресничек. С одним из дублетов ресничек связан большой белок **динейн**, обладающий АТФазной активностью, которая необходима для скольжения пар микротрубочек.

Промежуточные филаменты

Недавние исследования продемонстрировали существование внутриклеточной системы волокнистых филаментов. Их диаметр колеблется от 8 до 10 нм, т. е. по толщине они занимают промежуточное положение между микрофиламентами (диаметр 6 нм) и микротрубочками (диаметр 23 нм). Эти филаменты делятся на 6 основных групп, которые имеют общие антигенные детерминанты.

Промежуточные филаменты представляют собой прочные относительно стабильные компоненты цитоскелета, не подверженные быстрой сборке и распа-

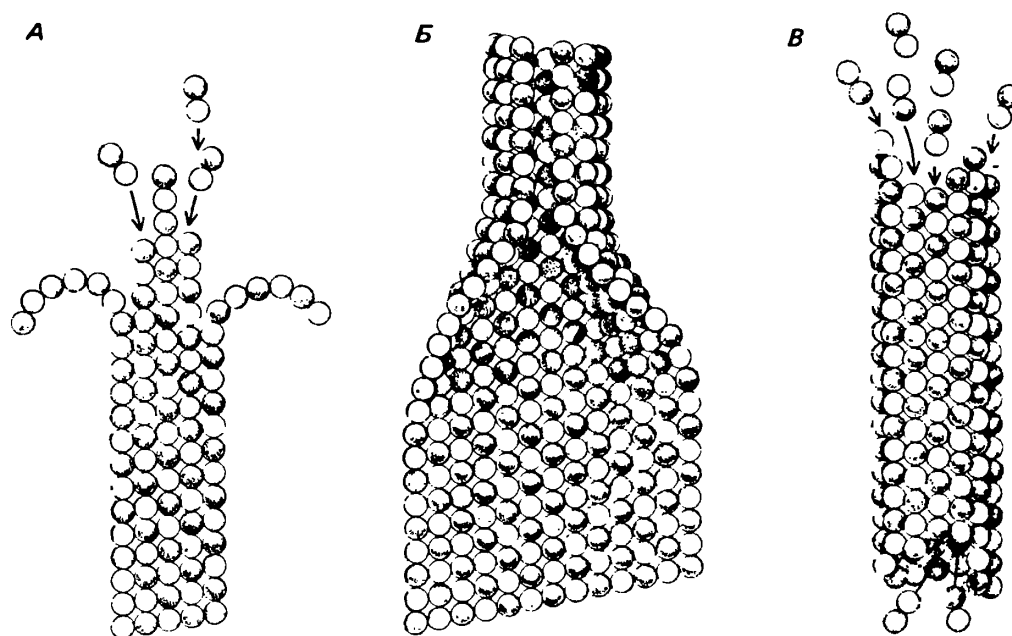


Рис. 56.15. Сборка микротрубочек *in vitro* начинается с двух белковых глобулярных молекул α - и β -тубулина. (Вероятно, они имеют более вытянутую форму, чем на рисунке.) Тубулины образуют димеры, или двойные молекулы. Если их концентрация велика, они соединяются с образованием различных промежуточных структур (двойных колец, спиралей и сочетаний колец). В зависимости от условий равновесие сдвигается либо в сторону изолированных димеров, либо промежуточных структур. Можно предположить, что дальше кольца или спирали раскрываются, образуя тяжи (протофиламенты) линейно соединенных димеров, которые смыкаются «бок в бок», формируя целый покров (А); иногда концы протофиламентов изгибаются. Если покров достаточно широк, он, вероятно, скручиваясь, образует трубку (Б). Эта трубка затем удлиняется за счет присоединения димеров преимущественно с одного конца (В). (Reproduced, with permission, from Dustin P. Microtubules. Sci. Am. [Aug] 1980, 243, 67.)

ду и не исчезающие при митозе. Данные о некоторых свойствах и локализации промежуточных филаментов суммированы в табл. 56.3.

К промежуточным филаментам относятся **кератины I и II** типа. Они состоят из 10—20 различных полипептидов, отличающихся как друг от друга, так и от полипептидов, входящих в состав остальных четырех групп белков промежуточных филаментов — десмина, виментина, нейрофиламентов и глиальных филаментов. Между последними четырьмя классами белков отмечается высокая степень гомологии. Кератиновый филамент содержит по меньшей мере два различных кератиновых полипептида, тогда как остальные четыре типа промежуточных филаментов представляют собой гомополимеры. Каждый из них состоит из четырех α -спиральных доменов, отделенных друг от друга участками β -складчатых слоев и фланкированных с обеих сторон неспиральными концевыми доменами. Неспиральные концевые домены участвуют в растяжении протофиламентов «конец в конец» и в интерпротофибриллярных взаимодействиях «бок в бок». Концы кератиновых микрофибрилл могут перекрестно соединяться дисульфидными связями с образованием нерастворимых филаментов, подобных филаментам шерсти.

Некоторые промежуточные филаменты, особен-

Таблица 56.3. Типы промежуточных филаментов и их распределение

Белки	Мол. масса (тысячи)	Диаметр (нм)	Локализация
Кератин типа I и типа II (тонофиламенты)	40–65 (10–20 главных белков)	8	Эпителиальные клетки (никогда не встречаются в клетках мезенхимального происхождения)
Десмин	50–55	10	Мышцы (линия Z)
Виментин	52	10	Мезенхимальные и немезенхимальные клетки, такие, как мышечные, глиальные, эпителиальные клетки
Нейрофиламент	200 150 70	10	Нейроны
Глиальный филамент	51	10	Глиальные клетки

но мышечного и мезенхимального происхождения, присутствуют в очень многих тканях.

КОЛЛАГЕН

Коллаген, главная макромолекула соединительной ткани, является наиболее распространенным белком в животном мире. Он обеспечивает внеклеточный каркас у всех многоклеточных и присутствует практически в любой животной ткани. В тканях млекопитающих существует не менее пяти различных типов коллагена; они образуют семейство молекул со многими общими свойствами. Наиболее характерная особенность коллагеновых молекул — это их трехспиральная структура. Каждая субъединица, или α -цепь, представляет собой левозакрученную спираль, у которой на виток приходится по три аминокислотных остатка. Три такие левые спирали закручиваются далее в правую суперспираль. В результате формируется жесткая палочковидная молекула с диаметром 1,4 нм и длиной около 300 нм. Затем эти молекулы коллагена ассоциируют в фибриллы (рис. 56.16).

Коллагеновые фибриллы образуют продольные зигзагообразные структуры длиной чуть меньше $1/4$ длины тройной спирали. Между концом одной тройной спирали и началом следующей имеется пространство, которое может служить местом отложения кристаллов гидроксилапатита при образовании кости. Диаметр коллагеновых фибрилл колеблется от 10 до 100 нм, и под микроскопом они видны в виде пучков в экстрацеллюлярном матриксе соединительной ткани.

Еще одна характерная особенность молекулы коллагена заключается в том, что каждый третий остаток тройной спирали α -цепи представляет собой глицин. Глицин — это единственная аминокислота, размер которой позволяет ей поместиться под центральным ядром тройной спиральной молекулы. Таким образом, центральное ядро этой молекулы состоит из глициновых остатков всех трех α -субъединиц. Эту повторяющуюся структуру можно представить как $(\text{Gly-X-Y})_n$, где X и Y — любые аминокислоты, кроме глицина.

В коллагене млекопитающих около 100 X-положений занято пролином и около 100 Y-положений — 4-гидроксипролином. Эти «жесткие» аминокислоты ограничивают вращение полипептидного стержня и таким образом увеличивают стабильность тройной спирали. Остатки гидроксипролина придают структуре дополнительную стабильность за счет образования большего количества внутримолекулярных водородных связей (для этого используются окружающие молекулы воды). В некоторых X-положениях коллагена содержится также 3-гидроксипролин, а в Y-положениях — 5-гидроксилизин.

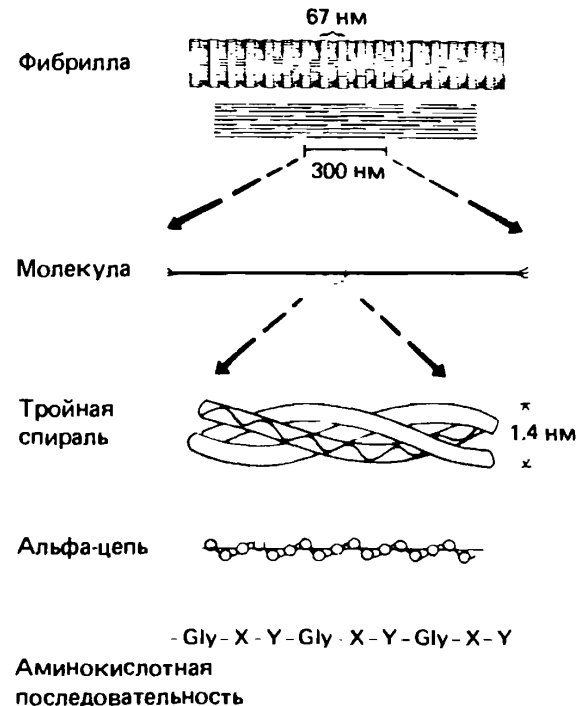


Рис. 56.16. Особенности молекулярной структуры коллагена от первичной последовательности до фибрилл. (Slightly modified and reproduced, with permission, from Eyre D. R: Collagen. Molecular diversity in the body's protein scaffold. Science 1980, 207, 1315.)

Тройная спираль коллагена стабилизируется многочисленными межцепочечными поперечными сшивками между лизиновыми и гидроксизизиновыми остатками. Химическая природа этих перекрестных связей рассматривается ниже. Зрелый коллаген представляет собой гликопротеин, содержащий сахараиды, связанные с остатками гидроксизина О-гликозидной связью.

Данные о коллагенах позвоночных, их распределении в тканях и отличительных особенностях суммированы в табл. 56.4.

Синтез коллагена

Коллаген — внеклеточный белок, но он синтезируется в виде внутриклеточной молекулы-предшественника, которая перед образованием фибрилл зрелого коллагена подвергается посттрансляционной модификации. Подобно всем секретируемым белкам, предшественник коллагена претерпевает процессинг в ходе прохождения через эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи до появления во внеклеточном пространстве. Наиболее ранним предшественником коллагена является **препроколлаген**, который содержит на N-конце лидерную, или сигнальную, последовательность примерно из 100 аминокислот. Препроколлаген образуется на рибосомах, прикрепленных к эндоплазматическому ре-

Таблица 56.4. Генетически различные коллагены позвоночных. У высших животных присутствуют по меньшей мере пять различных молекул, содержащих семь генетически различающихся α -цепей

Тип	Молекулярная формула	Нативный полимер	Распределение в тканях	Характерные особенности
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$	Фибрил-ла	Кожа, сухожилия, кости, дентин, фасции; содержится в изобилии	Низкое содержание гидроксилизина; малое количество сайтов гликозилирования; широкие фибриллы
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Фибрил-ла	Хрящ, nucleus pulposus, нотохорд, стекловидное тело	Высокое содержание гидроксилизина; сильно гликозилирован; фибриллы обычно тоньше, чем в случае типа I
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Фибрил-ла	Кожа, матка, кровеносные сосуды; вообще «ретикулиновые» волокна	Высокое содержание гидроксипролина; низкое содержание гидроксилизина; малое число сайтов гликозилирования гидроксилизина; межцепочечные дисульфидные связи между цистеинами на С-конце спирали; длинный карбоксильный телопептид
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$ (приблизительная, обсуждается)	Базальная пластина	Почечные клубочки, капсула хрусталика, мембрана Десцемета; базальная пластина всех эпителиальных и эндотелиальных клеток (?)	Очень высокое содержание гидроксилизина; почти полностью гликозилирован; относительно богат 3-гидроксипролином; низкое содержание аланина; содержит фрагменты проколлагена
V	$\alpha A(\alpha B)_2$ или $(\alpha A)_3$ и $(\alpha B)_3$	Неизвестен	Широко распространен в малых количествах; базальная пластина клеток кровеносных сосудов и гладких мышц; экзоскелет фибробластов и других мезенхимальных клеток (?)	Высокое содержание гидроксилизина; сильно гликозилирован; низкое содержание аланина; неспособен образовывать нативные фибриллы in vitro

тикулуму. Когда сигнальная последовательность проникает в везикулярное пространство эндоплазматического ретикулума, лидерная последовательность отщепляется, а N-конец проколлагена продолжает продвигаться в этом пространстве. Здесь пролиновые и лизиновые остатки в Y-положении пептида $(Gly-X-Y)_n$ подвергаются действию соответственно пролил-4-гидроксилазы и лизилгидроксилазы. Пролл-3-гидроксилаза действует на пролиловые

остатки в X-положениях, непосредственно предшествующие 4-гидроксипролину в Y-положениях.

Молекула проколлагена содержит на N- и C-концах пептиды с мол. массой соответственно 20 000 и 30 000—35 000, которые отсутствуют в зрелом коллагене. Оба этих пропептида содержат остатки цистеина. N-концевой пропептид образует только внутрицепочечные дисульфидные связи, C-концевые пептиды образуют и внутри- и межцепочечные ди-

сульфидные связи. Вслед за образованием этих связей молекулы проколлагена собираются в тройную спираль.

После формирования тройной спирали дальнейшее гидроксилирование пролиловых и лизиловых остатков становится *невозможным*. Гликозилтрансфераза, которая переносит глюкозу или галактозу на остатки гидроксилизина, также может действовать только на α -цепи проколлагена, не имеющие еще спиральной конфигурации.

После завершения этого внутриклеточного процессинга молекулы гликозилированного проколлагена продвигаются к наружной поверхности клетки через комплекс Гольджи. Внеклеточные аминопро-теаза и карбоксипро-теаза проколлагена удаляют соответственно аминоконцевой и карбоксиконцевой пропептиды. Вновь образованные молекулы коллагена содержат примерно 1000 аминокислот на цепь и спонтанно собираются в **коллагеновые фибриллы**, неотличимые от зрелых фибрилл, присутствующих в тканях.

Однако эти фибриллы не обладают силой напряжения зрелых коллагеновых фибрилл до тех пор, пока не произойдет **перекрестное связывание их рядом ковалентных связей**. Внеклеточный медь-содержащий фермент, лизилоксидаза, осуществляет окислительное дезаминирование ϵ -аминогрупп некоторых лизиловых и гидроксилизиниловых остатков коллагена с образованием реактивных альдегидов. Альдегиды могут формировать Шиффовы основания с ϵ -аминогруппами других лизинов, гидроксилизинов или даже гликозилированных гидроксилизинов. Эти Шиффовы основания подвергаются химической перегруппировке, обеспечивая стабильные ковалентные сшивки. Альдегидный компонент, образующийся из гидроксилизина, формирует более стабильную перекрестную связь, чем альдегид из лизинового остатка. Альдольные мостики также обеспечивают перекрестное связывание (сшивку) молекул.

Данные о внутриклеточном и внеклеточном процессинге молекулы-предшественника коллагена суммированы в табл. 56.5.

Таблица 56.5. Порядок и локализация этапов процессинга предшественника коллагена (содержащего повторяющуюся структуру $[\text{Gly-X-Y}]_n$)

Внутриклеточные (эндоплазматический ретикулум)

- 1) Отщепление сигнального пептида
- 2) 4-Гидроксилирование Y-пролиловых остатков
- 3) 3-Гидроксилирование X-пролила, где Y — остаток 4-гидроксипролина
- 4) 5-Гидроксилирование Y-лизиниловых остатков
- 5) Гликозилирование гидроксилизиниловых остатков
- 6) Образование внутрицепочечных и межцепочечных S—S-связей
- 7) Образование тройной спирали проколлагена

Внеклеточные

- 1) Отщепление NH_2 -концевого пропептида (мол. масса 20 000)
- 2) Отщепление COOH -концевого пропептида (мол. масса 30 000–35 000)
- 3) Образование фибрилл незрелого коллагена
- 4) Окисление лизиниловых, гидроксилизиниловых и гликозилированных гидроксилизиниловых остатков в альдегиды
- 5) Перекрестное связывание цепей и спиральных молекул фибрилл через Шиффовы основания и альдольную конденсацию

Клетки, секретирующие коллаген, секретируют также **фибронектин**, большой гликопротеин, присутствующий на клеточной поверхности, во внеклеточном матриксе и в крови. Фибронектин связывается с агрегирующимися проколлагеновыми фибриллами и меняет кинетику образования фибрилл в перичеллюлярном матриксе. С фибронектином и проколлагеном в этом матриксе ассоциированы протеогликаны гепарансульфат и хондроитинсульфат (см. гл. 54).

Хрящ — это внеклеточный матрикс, в котором коллаген обуславливает силу напряжения, а протеогликаны — выраженную эластичность.

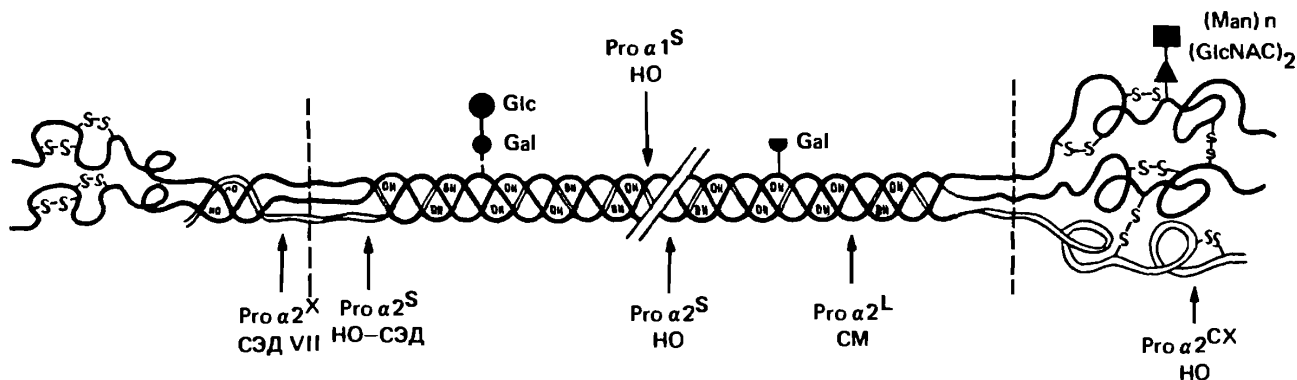


Рис. 56.17. Сайты мутаций в молекуле проколлагена типа I. СЭД — синдром Элерса — Данлоса; CM — синдром Марфана. HO — несовершенный остеогенез. (Reproduced, with permission, from Prockop D. J., Kivirikko K. I. Heritable diseases of collagen. N. Engl. J. Med. 1984, 311, 376.)

Таблица 56.6. Молекулярные дефекты, лежащие в основе четырех наследственных коллагенозов. (Reproduced, with permission, from Prockop D.J., Kivirikko K.I. Heritable diseases of collagen. N. Engl. J. Med., 1984, 311, 376.)

Болезнь	Дефект ¹⁾	Последствия
Несовершенный остеогенез	Pro α 1(I) ⁰	Снижение вдвое количества коллагена типа I
Тип I	Pro α 2(I) ^S	Вероятно, аномальные фибриллы
Тип II	Другие (неидентифицированные) Pro α 1(I) ^S	Нестабильная тройная спираль; повышение синтеза pro α 1(III)
Тип III	Pro α 2(I) ^S и pro α 2(I) ⁰ Другие (неидентифицированные) Pro α 2(I) ^{CX} Pro α 1(I) ^{CX} или pro α 2(I) ^{CX}	Неясны Синтез тримеров pro α 1(I) Увеличение количества маннозы в С-пропептиде и снижение растворимости проколлагена типа I
Вариант с симптомами Элерса-Данлоса	Другие (неидентифицированные) Pro α 2(I) ^S	Нечувствительность к проколлаген-N-протеиназе и стабильность pN-коллагена ²⁾
Синдром Марфана	Pro α 2(I) ^L Другие (неидентифицированные)	Вероятно, нарушение образования поперечных сшивок
Синдром Элерса-Данлоса	Pro α 1(III) ⁺	Резкое уменьшение количества коллагена типа III
Тип IV	Pro α 1(III) SM Pro α 1(III) ^A Другие (неидентифицированные)	Нестабильная тройная спираль Снижение скорости секреции коллагена типа III
Тип VI	Дефицит лизинггидроксилазы	Коллаген с дефицитом гидроксизина и нарушенное образование поперечных связей
Тип VII	Другие (неидентифицированные) Дефицит проколлаген-N-протеиназы Pro α 2(I) ^A	Стабильность pN-коллагена ²⁾ Нечувствительность к проколлаген-N-протеиназе и стабильность pN-коллагена ²⁾
Тип IX	Нарушение метаболизма меди	Дефицит лизиноксидазы и нарушенное образование поперечных связей
Синдром Менке	Нарушение метаболизма меди	Дефицит лизиноксидазы и нарушенное образование поперечных связей

¹⁾ Pro α 1(I)⁰, pro α 2(I)⁰ и pro α 1(III)⁺ — нефункционирующие или неэффективно функционирующие аллели pro α -цепей; pro α 1(I)^S и pro α 2(I)^S — укороченные pro α -цепи; pro α 2(I)^L — удлиненные pro α -цепи; pro α 1(I)^{CX} и pro α 2(I)^{CX} — мутации, изменяющие структуру С-полипептидов pro α -цепей; pro α 1(III)SM — измененная pro α 1(III)-цепь, медленно мигрирующая при электрофорезе в геле; pro α 1(III)^A и pro α 2(I)^A — нерасшифрованные еще мутации, изменяющие структуру pro α -цепей.

²⁾ Интермедиат в реакциях превращения проколлагена, содержащий N-пропептиды, но не С-пропептиды.

Наследственные дефекты коллагена и его сборки

Наследственные болезни, обусловленные аномалиями коллагена, носят название коллагенозов. Наиболее известные среди них: несовершенный остеогенез, синдром Марфана, синдром Элерса — Данлоса и синдром Менке (синдром курчавых волос). Первоначально эти болезни диагностировали только на основании фенотипа пробандов, но по мере накопления знаний о структуре и функции коллагена становились понятными молекулярные механизмы, лежащие в основе этих синдромов.

Многие клинические симптомы объясняются нарушением процессинга предшественников коллагена из-за аномалий самого предшественника или дефектов в ферментной системе процессинга. Понимание молекулярной природы нарушения позволяет предсказать характер наследования патологии (рецессивный или доминантный).

В табл. 56.6 суммированы молекулярные дефекты и их последствия при некоторых наследственных коллагенозах человека, а на рис. 56.17 указаны дефектные сайты в молекуле проколлагена типа I.

ЛИТЕРАТУРА

- Adelstein R. S., Eisenberg R.* Regulation and kinetics of actin — myosin ATP interaction, *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, **49**, 921.
- Adelstein R. S. et al.* Phosphorylation of muscle contractile proteins, *Fed. Proc.*, 1980, **39**, 1544.
- Barany M., Barany K.* Phosphorylation of the myofibrillar proteins, *Annu. Rev. Physiol.*, 1980 **42**, 275.
- Bornstein P., Sage H.* Structurally distinct collagen types, *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, **49**, 957.
- Caplan A.* Cartilage, *Sci. Am.* (Oct.), 1984, **250**, 84.
- Clark M., Spudich J. A.* Nonmuscle contractile proteins: The role of actin and myosin in cell motility and shape determination, *Annu. Rev. Biochem.*, 1977, **46**, 797.
- DeCrombrughe B., Pastan I.* Structure and regulation of a collagen gene, *Trends Biochem. Sci.*, 1982, **7**, 11.
- Dustin P.* Microtubules, *Sci. Am.* (Aug.), 1980, **243**, 67.
- Eyre D. R. et al.* Cross-linking in collagen and elastin, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 717.
- Fuchs E., Hanukoglu I.* Unraveling the structure of intermediate filaments, *Cell*, 1983, **34**, 332.
- Heuser J. E., Kirschner M. W.* Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons, *J. Cell Biol.*, 1980, **86**, 212.
- Kleinman H. K., Klebe R. J., Martin G. R.* Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells, *J. Cell Biol.*, 1981, **88**, 473.
- Lazarides E.* Intermediate filaments: A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 1982, **51**, 219.
- Lazarides E., Revel J. P.* The molecular basis of cell movement, *Sci. Am.* (May), 1979, **240**, 100.
- Murray J. M., Weber A.* The cooperative action of muscle proteins, *Sci. Am.* (Feb.), 1974, **230**, 59.
- Prockop D. J., Kivirikko K. I.* Heritable diseases of collagen, *N. Engl. J. Med.*, 1984, **311**, 376.
- Sandberg L. B., Soskel N. T., Leslie J. G.* Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states, *N. Engl. J. Med.*, 1981, **304**, 566.

Рак, онкогены, факторы роста

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые клетки характеризуются тремя основными свойствами: 1) неконтролируемым или слабо контролируемым ростом; 2) способностью проникать в прилежащие ткани и повреждать их (**инвазивность**), 3) способностью перемещаться с током крови или лимфы в другие органы и порождать там новые очаги опухолевого роста (**метастазирование**). Заметим, что рост клеток доброкачественных опухолей тоже контролируется слабо, но эти клетки не инвазивны и не метастазируют.

В данной главе мы обсудим некоторые биохимические особенности опухолевых клеток. Главная цель обсуждения — сформулировать биохимические причины свойственного им неконтролируемого роста, способности к инвазии и метастазированию. В настоящее время полагают, что одной из причин злокачественного перерождения клеток служит изменение структуры и регуляции активности генов, контролирующих их рост, а также нарушение межклеточных взаимодействий. Некоторые виды опухолевых заболеваний (например, ряд лейкозов) являются результатом нарушения дифференцировки соответствующих клеток. Сведения о молекулярных механизмах этого процесса крайне ограничены. По мнению многих ведущих специалистов-онкологов, усилия исследователей должны быть сосредоточены на изучении онкогенов и ростовых факторов. Именно это дает возможность разобраться в природе нарушений контроля роста опухолевых клеток, дифференцировки, а также межклеточных взаимодействий. Настоящая глава посвящена обсуждению проблемы онкогенов и факторов роста.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Опухолевые заболевания — вторая по значимости причина смертности в США после сердечно-сосудистой патологии. Раку подвержены все возрастные категории людей, однако частота многих видов опухолей повышается с возрастом; поэтому

чем старше человек, тем больше вероятность для него умереть от рака. Онкологические заболевания — тяжелейший недуг, борьба с которым — задача современного общества.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ И РАК

При диагностике рака и лечении больных весьма полезны биохимические тесты. Известно, что многие формы опухолей сопровождаются нарушением продукции ферментов, белков и гормонов, что можно обнаружить при исследовании плазмы или сыворотки крови. Соответствующие молекулы называются опухолевыми маркерами. Анализ таких маркеров является в настоящее время составной частью схемы ведения больных с некоторыми типами опухолей (табл. 57.1). В табл. 57.2 представлены примеры использования опухолевых маркеров в диагностике и при лечении больных. В настоящее время установлено, что 1) не существует единого универсального для всех типов опухолей маркера; нет его и для всех пациентов с данным типом опухоли; необходим анализ целого ряда маркеров; 2) опухолевые маркеры,

Таблица 57.1. Опухолевые маркеры, используемые при диагностике. (Adapted, with permission, from McIntire K. R. Tumor markers: How useful are they? Hosp. Pract. (Dec.), 1984, 19, 55.)

Маркер	Вид опухоли
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	Желудок, легкие, молочная железа, поджелудочная железа
α -Фетопротейн (АФП)	Печень, зародышевые клетки
Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)	Трофобласт, зародышевые клетки
Кальцитонин (КТ)	Щитовидная железа (медуллярная карцинома)
Кислая фосфатаза простаты (КФП)	Предстательная железа

Таблица 57.2. Применение опухолевых маркеров. (Adapted, with permission, from McIntire K. R. Tumor markers: How useful are they? Hosp. Pract. (Dec.), 1984, 19, 55.)

Обнаружение	Обследование пациентов, не имеющих симптомов
Диагноз	Дифференцирование малигнизированных и доброкачественных опухолей
Ведение больных	Предсказание эффекта химиотерапии и обнаружение рецидива заболевания
Классификация	Выбор метода лечения и прогнозирование
Определение стадии	Выяснение степени распространения болезни
Локализация	Радиоизотопное сканирование после инъекции меченых антигенов
Терапия	Действие цитотоксических препаратов, направленных на клетки, содержащие маркеры

Таблица 57.3. Некоторые химические канцерогены

Полициклические ароматические углеводороды	Бензпирен, диметилбензантрацен
Ароматические амины	2-Ацетиламинофлуорен, N-метил-4-аминоазобензол (МАБ)
Нитрозамины	Диметилнитрозамин, диэтилнитрозамин
Различные препараты	Алкилирующие агенты (например, циклофосамид), диэтилстильбестрол
Природные агенты	Актиномицин D, афлатоксин В ₁
Неорганические вещества	Арсенат, асбест, бериллий, кадмий, хром

как правило, обнаруживаются на поздних стадиях заболевания; между тем особенно полезными они могут быть именно в начале болезни; 3) наиболее эффективно использование опухолевых маркеров для контроля эффективности лечения, а также для обнаружения ранних рецидивов.

вызывают образование в тканях свободных радикалов. Супероксидный ОН и другие радикалы могут взаимодействовать с ДНК и другими макромолекулами, повреждать их и таким образом способствовать возникновению рака.

ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

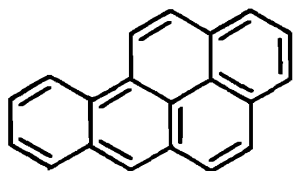
Агенты, вызывающие развитие опухолей, можно разделить на три обширные группы: радиационная энергия, химические соединения и вирусы.

РАДИАЦИОННАЯ ЭНЕРГИЯ

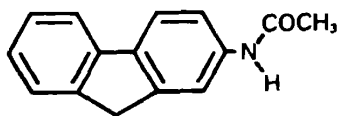
Мутагенное и канцерогенное действие оказывают ультрафиолетовые лучи, рентгеновские лучи и γ -излучение. Во всех случаях имеет место повреждение ДНК. Например, ультрафиолет вызывает образование пиримидиновых димеров. Результатом облучения могут быть разрывы одной или двух цепей ДНК, поперечные сшивки. Все это лежит в основе мутагенного и канцерогенного эффекта облучения. Рентгеновские и γ -лучи помимо прямого влияния на ДНК

ХИМИЧЕСКИЕ КАНЦЕРОГЕНЫ

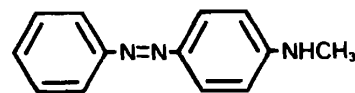
Канцерогенные свойства присущи целому ряду химических соединений (табл. 57.3); структура трех наиболее изученных веществ представлена на рис. 57.1. Канцерогенность большинства соединений, приведенных в табл. 57.3, доказана на лабораторных животных (грызунах и других). Полагают, что многие из них вызывают развитие опухолей и у человека. Подсчитано, что до 80% опухолей человека вызываются факторами окружающей среды, в основном химическими веществами. Контакт с такими соединениями может быть связан с профессиональной деятельностью человека (бензол, асбест), особенностями питания (например, канцероген афлатоксин В, продуцируемый плесневым грибом *Aspergillus flavus*, часто загрязняет арахис), образом жизни (курение). В некоторых случаях канцерогенными оказываются лекарственные препараты. Мы рассмотрим лишь некоторые важные выводы, сформулированные при исследовании химического канцерогенеза.



Бензпирен



2-Ацетиламинофлуорен



N-метил-4-аминоазобензол

Рис. 57.1. Структура трех важнейших, используемых в экспериментах, химических канцерогенов.

Структура

Канцерогенами могут быть как органические, так и неорганические молекулы (табл. 57.3). Разнообразие этих соединений свидетельствует о том, что канцерогенность не связана с какой-либо определенной структурной особенностью.

Действие

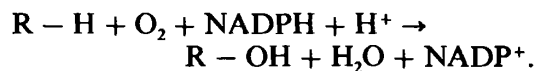
Наиболее полно изучено действие органических канцерогенов. Было обнаружено, что некоторые из них (например, горчичный газ и β -пропиолактон) являются **прямыми канцерогенами**, т.е. непосредственно взаимодействуют с молекулами-мишенями. Другие соединения (**проканцерогены**) для проявления опухолеродной активности должны пройти ряд метаболических превращений. Катализируемый ферментами процесс перехода проканцерогенов в активные канцерогены называется **метаболической активацией**. Промежуточные продукты подобных реакций носят название **промежуточных канцерогенов**; конечный продукт, непосредственно реагирующий с компонентами клетки (например, с ДНК), называется **конечным канцерогеном**. Последовательность такая:

Проканцероген $\rightarrow$ промежуточный канцероген
 $A \rightarrow$ промежуточный канцероген $B \rightarrow$ конечный канцероген.

Проканцероген сам по себе химически неактивен, а конечный канцероген, как правило, обладает высокой активностью. Для превращения проканцерогена 2-ацетиламинофлуорена (2-ААФ) в сульфатный эфир N-гидрокси-ААФ (конечный канцероген) требуются по меньшей мере две стадии. Важно отметить, что конечные канцерогены часто являются электрофилами (т.е. молекулами с дефицитом электронной плотности у определенных групп). Именно поэтому они имеют повышенное сродство к нуклеофильным (т.е. с избытком электронов) группам ДНК, РНК и белков.

Моноксигеназы и трансферазы

В метаболизме проканцерогенов и других ксенобиотиков принимают участие моноксигеназы и трансферазы. Ферменты, ответственные за метаболическую активацию проканцерогенов, являются в основном гем-содержащими моноксигеназами, локализованными в эндоплазматическом ретикулуме. Эти же ферменты метаболизируют и другие ксенобиотики, например лекарства и вещества, загрязняющие окружающую среду. Моноксигеназы катализируют гидроксилирование различных проканцерогенов и ксенобиотиков, при этом источником кислорода служит молекулярный кислород, а NADPH — восстановителем:



Поскольку один атом кислорода попадает в конечный продукт, другой — в молекулу воды, эти ферменты раньше называли оксидазами со смешанными функциями. Реакции гидроксилирования могут приводить к появлению активной или неактивной формы лекарств. Очевидно, что эти реакции играют центральную роль в метаболизме многих лекарственных препаратов. В эндоплазматическом ретикулуме клеток печени человека содержится по меньшей мере шесть моноксигеназ. Они имеют широкую, часто перекрывающуюся субстратную специфичность. Особая моноксигеназа, метаболизирующая полициклические ароматические углеводороды, называется цитохромом *P-448* или гидроксилазой ароматических углеводородов. Реакции, катализируемые рассмотренными моноксигеназами, носят название реакций первой фазы метаболизма ксенобиотиков; в результате таких реакций в соединении вводится гидроксильная группа и продукт оказывается более полярным, более подготовленным к последующей экскреции. Во второй фазе метаболизма ксенобиотиков гидроксилированные соединения конъюгируют с различными молекулами (например, с глюкуроном, сульфатом, ацетатом, глутатионом). В результате реактивность соединений существенно понижается (детоксикация), еще более повышается их полярность, и они могут экскретироваться из организма (в основном с мочой). Иногда конъюгация приводит к повышению биологической или химической активности молекулы. Ферменты, катализирующие реакции конъюгации (глюкуронил-, сульфат-, ацетил-, глутатионтрансферазы), обычно локализуются в цитозоле, однако некоторые из них находятся также и в эндоплазматической сети. В качестве доноров глюкуронильных сульфатных и ацетильных групп трансферазы используют UDP-глюкуронат, 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС) и ацетил-CoA соответственно. Донором для различных глутатионтрансфераз служит сам глутатион.

Факторы, влияющие на ферменты, метаболизирующие ксенобиотики

На активность ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков влияют многие факторы: 1) активность ферментов может существенно варьировать у разных видов животных; 2) большой разброс в активности ферментов у особей одного вида связан, по-видимому, с генетическими факторами; 3) на активность ферментов влияет пол и возраст особи; 4) попадание в организм некоторых ксенобиотиков, например фенотербитала или некоторых углеводородов, может повышать активность этих ферментов. Этот процесс носит название **индукции фер-**

мента. Вдыхание во время беременности углеводов, содержащихся в сигаретном дыме, приводит к индукции активности системы цитохрома *P-448* в плаценте; при этом меняется количество некоторых метаболитов углеводов, с которыми контактирует плод; 5) активность ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, могут ингибировать метаболиты ряда лекарств. Все эти факторы объясняют неодинаковую канцерогенность одних и тех же химических веществ для различных видов животных или для особей одного вида.

Ковалентное связывание

С помощью методики радиоактивного мечения установлено, что при введении химических канцерогенов животным (или при обработке ими клеток в культуре) происходит ковалентное связывание этих соединений или их метаболитов с клеточными макромолекулами (ДНК, РНК или белками). Исследована химическая природа продуктов, образующихся в результате взаимодействия некоторых конечных канцерогенов с их внутриклеточными мишенями. Наибольший интерес вызывают комплексы, образованные с ДНК. Было показано, что канцерогены реагируют с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, а также с фосфодиэфирными группами ДНК. Наиболее часто мишенью служит гуанин, при этом канцерогены присоединяются к N-2, N-3, N-7, O-6 и O-8 — атомам этого основания.

Повреждение ДНК

Ковалентное связывание прямых или конечных канцерогенов с ДНК может приводить к различного рода повреждениям ее молекулы. Часть этих повреждений клетка репарирует (см. гл. 38).

Несмотря на наличие систем репарации, некоторые модификации молекулы ДНК, вызванные химическими канцерогенами, могут сохраняться относительно длительное время. Возможно, именно они ведут к возникновению мутаций и развитию опухолей.

Мутагены

Большинство химических канцерогенов являются мутагенами. Для выявления мутационной активности разработано множество тестов. Во всех случаях было показано, что при обработке бактерий конечными канцерогенами происходит целый ряд мутаций, в том числе транзиции и трансверсии (см. гл. 38 и 40). Предполагалось, что именно они и служат причиной развития опухолей. В настоящее время получены экспериментальные подтверждения этой гипотезы (см. ниже «Онкогены»).

Тестирование канцерогенности химических соединений на лабораторных животных — процесс

медленный и дорогостоящий. В связи с этим были разработаны системы скрининга, основанные на определении мутагенной активности; такие опыты непродолжительны и менее дороги, чем эксперименты по обнаруживанию канцерогенности. При скрининге потенциальных канцерогенов весьма эффективной оказалась методика, предложенная Эймсом. Она подразумевает использование ауксотрофного штамма *Salmonella typhimurium*, имеющего генотип His⁻. Такие бактерии не способны синтезировать гистидин, и его необходимо добавлять в культуральную среду. Если под действием канцерогена происходит мутация в сайте His⁻, бактерии приобретают способность расти на среде без гистидина. Клетка, несущая реверсию His⁻ → His⁺, даст начало колонии на агаре, не содержащем гистидина.

Следует отметить, что набор бактериальных монооксигеназ существенно меньше такового у высших животных. Вот почему, если химическое вещество требует активации для проявления канцерогенных или мутагенных свойств, это не всегда можно определить с помощью бактерий. Эймс обошел эту проблему, введя в тест стадию инкубации исследуемых веществ с постмитохондриальным супернатантом печени крыс (фракция S-9). Фракцию получают центрифугированием гомогената печени крыс при 9000 g. Она содержит большую часть различных монооксигеназ и других ферментов, активирующих потенциальные мутагены и канцерогены.

Благодаря методике Эймса идентифицировано 90% известных на сегодняшний день канцерогенов. Именно она используется в настоящее время при тестировании вновь синтезированных химических веществ. Соединения, продемонстрировавшие мутагенную активность по методике Эймса, анализируют на животных.

Инициация и промотирование

В некоторых органах (например, в коже и печени) процесс канцерогенеза можно разделить на две стадии. Рассмотрим классический пример. Определенный участок кожи у группы мышей однократно обрабатывают бензпиреном. Если не произвести дополнительной обработки, опухоль кожи не развивается (рис. 57.2). Если же вслед за бензпиреном на кожу несколько раз нанести кротонное масло, развивается множество опухолей. Обработка кожи одним лишь кротонным маслом (без предварительного нанесения бензпирена) не приводит к появлению опухолей. Используя эту методику, были проведены разнообразные опыты, на основании которых можно сделать ряд выводов: 1) стадия канцерогенеза, вызываемая в данном случае нанесением бензпирена на кожу, носит название **инициации**; эта стадия является быстрой и необратимой. Суть ее, по-видимому, заключается в том, что на данном этапе происходят

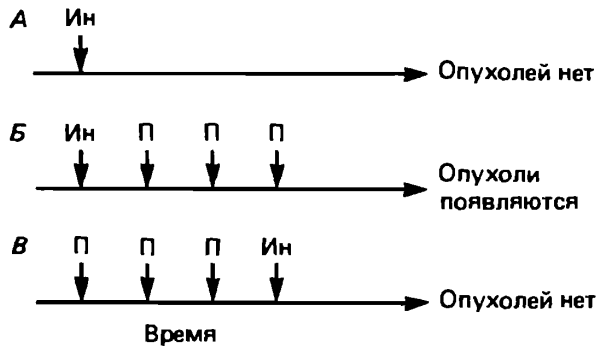


Рис. 57.2. Схематическое изображение стадий инициации и промотирования в процессе химического канцерогенеза в коже. *А.* Кожа нескольких мышей однократно обрабатывается инициатором (например, бензпиреном). *Б.* Вслед за обработкой инициатором следуют с недельным интервалом три обработки промотором (кртоновым маслом). *В.* Сначала кожу обрабатывают промотором, а затем инициатором. Доброкачественные опухоли кожи (папилломы) могут появляться уже через 100 дней; злокачественные опухоли (карциномы) появляются примерно через 1 год. Было проведено множество вариантов данного эксперимента, все они подтверждают основные концепции инициации и промотирования. И — инициатор; П — промотор.

необратимые модификации молекул ДНК, приводящие к одной или нескольким мутациям. Бензпирен в этом случае называют **инициирующим агентом**; 2) вторая, гораздо более медленная (длящаяся месяцы и годы) стадия канцерогенеза (в нашем случае — результат обработки кртоновым маслом) называется **промотированием**. Кртоновое масло, таким образом, выступает здесь в роли **промотирующего агента (промотора)**; 3) большинство канцерогенных веществ способны действовать и как иницирующие факторы, и как промоторы.

Целый ряд соединений, в том числе фенотал и сахарин, может играть роль промоторов в различных органах. Активное начало кртонового масла — смесь фоболовых эфиров, а наиболее активный среди них — 12-О-тетрадеканойлфобол-13-ацетат (ТФА), вызывающий целый ряд эффектов. Наиболее интересными оказались данные, согласно которым протеинкиназа С может служить рецептором ТФА. Повышение активности фермента в результате взаимодействия с ТФА может вызвать фосфорилирование ряда мембранных белков, что в свою очередь ведет к изменению транспорта и других функций клеток. Этот важный результат позволяет связать действие некоторых опухолевых промоторов с их влиянием на трансмембранную передачу сигнала (см. ниже «Факторы роста»). Многие опухолевые промоторы изменяют экспрессию генов; однако механизмы, с помощью которых промоторы превращают «иницированные» клетки в опухолевые, остаются пока невыясненными.

Роль ДНК

Основная клеточная мишень, ответственная за процесс канцерогенеза, — ДНК. В пользу такого вывода говорит целый ряд фактов: 1) опухолевые клетки производят себе подобное клеточное потомство. Это значит, что изменения, приводящие к возникновению опухолей, передаются от материнской клетки к дочерним, что согласуется с поведением ДНК; 2) радиационное излучение и химические канцерогены повреждают ДНК и могут вызывать мутации; 3) во многих опухолевых клетках обнаружены аномальные хромосомы; 4) опыты по трансфекции (см. ниже) показали, что очищенная ДНК из опухолевых клеток может превращать нормальные клетки в потенциально злокачественные. В процессе канцерогенеза могут участвовать и эпигенетические факторы.

ОНКОГЕННЫЕ ВИРУСЫ

В качестве носителя генетической информации у онкогенных вирусов может выступать как ДНК, так и РНК (табл. 57.4). В этой главе мы рассмотрим несколько наиболее важных особенностей вирусов, принадлежащих к этим двум классам.

В формировании основных представлений о вирусном онкогенезе важную роль сыграли **вирус полиомы** и **вирус SV40**. Это мелкие вирусы (геном около 5 т. п. н.), кольцевой геном которых кодирует всего 5—6 белков. В определенных условиях инфицирование соответствующих клеток этими вирусами приводит к злокачественной трансформации. Известно, что в этом процессе принимают участие специфические вирусные белки. В случае вируса SV40 эти белки (их часто называют антигенами, поскольку они были идентифицированы иммунологическими методами) известны как Т и t. Белки вируса полиомы назы-

Таблица 57.4. Некоторые важные опухолеродные вирусы

Класс	Вирусы, входящие в данный класс
ДНК-содержащие вирусы	
Паповавирусы	Вирус полиомы, SV40, вирус папилломы
Аденовирусы	Аденовирусы типа 12, 18, 31
Вирусы группы герпеса	Вирус Эпштейна — Барр, вирус простого герпеса типа 2
Гепаднавирусы	Вирус гепатита В
РНК-содержащие вирусы	
Ретровирусы типа С	Вирусы саркомы и лейкоза грызунов, вирусы саркомы и лейкоза птиц, вирусы Т-клеточного лейкоза человека типа I и II
Ретровирусы типа В	Вирус рака молочной железы мышей

ваются T, mid-T и t. Буква T пришла из английского слова *tumor* (опухоль), поскольку первый из этих белков был обнаружен в опухолях. До сих пор не ясно, каким образом эти белки вызывают опухолевую трансформацию; известно лишь, что T-антигены прочно связываются с ДНК, что влияет на характер генной экспрессии. Эти белки демонстрируют кооперативный эффект, можно предположить, следовательно, что при трансформации происходит изменение нескольких процессов.

Известно несколько типов аденовирусов, трансформирующих определенные клетки животных. Особый интерес представляет вирус Эпштейна—Барр, поскольку считают, что он имеет отношение к лимфоме Беркитта и носоглоточной карциноме у людей. Опухоли шейки матки, возможно, связаны с вирусом простого герпеса (тип 2), а вирус гепатита В часто ассоциируют с некоторыми формами рака печени.

Полученные в недавнее время данные об онкогенах в основном базируются на исследованиях РНК-содержащих опухолеродных вирусов, поэтому в дальнейшем обсуждении проблемы онкогенов мы будем часто ссылаться на работы, посвященные именно этим вирусам.

ТРАНСФОРМАЦИЯ

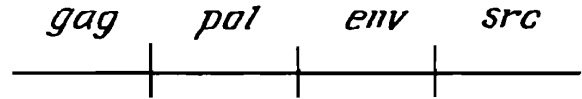
Культивируемые клетки, инфицированные некоторыми онкогенными вирусами, могут претерпевать злокачественную трансформацию. Наиболее существенные морфологические и биохимические изменения, связанные с трансформацией, приведены в таблице 57.5. Изменения затрагивают форму клеток, их подвижность и рост, адгезивность к культуральной подложке, а также ряд биохимических процессов. Речь идет о первичных процессах, вызывающих превращение нормальной клетки в опухолевую, а также о вторичных — обусловленных этим превращением. Большое значение в исследованиях канцерогенеза имеет представление, согласно которому трансформация клеток сопряжена с приобретением ими «особых» свойств. Однако изменения клеток, известные под общим названием «трансформация», все-таки не делают трансформированные клетки идентичными опухолевым клеткам *in vivo*.

ОНКОГЕНЫ

Онкогены — это участки ДНК (гены), функционирование которых приводит к опухолевой трансформации клеток. Открытие онкогенов имело большое значение для исследования фундаментальных механизмов канцерогенеза. Впервые онкогены были найдены в опухолеродных вирусах и идентифицированы как факторы, ответственные за процесс трансформации (**вирусные онкогены**).

Онкогены вируса саркомы Рауса

В настоящее время исследована структура онкогена вируса саркомы Рауса и охарактеризован продукт этого онкогена. Геном данного ретровируса состоит из четырех генов: *gag*, *pol*, *env*, *src*. Схематически его можно изобразить следующим образом:



Ген *gag* кодирует синтез вирусных группспецифических антигенов, ген *pol* — специфическую для ретровирусов обратную транскриптазу, ген *env* — синтез некоторых гликопротеинов вирусной оболочки. Продуктом гена *src*, ответственного за трансформацию (возникновение саркомы), является тирозинкиназная протеинкиназа. Эти данные оказались чрезвычайно важными. Они продемонстрировали наличие специфического биохимического механизма, которым можно, хотя бы отчасти, объяснить плеiotропный эффект ретровирусов при трансформации. Клеточные белки, изменение фосфорилирования которых, возможно, приводит к трансформации, еще предстоит идентифицировать. Одним из них, по-видимому, является **винкулин** — белок, найденный в адгезионных бляшках (структурах, участвующих в межклеточной адгезии). Изменением фосфорилирования винкулина адгезионных бляшек, возможно, следует объяснять округление клеток при трансформации, а также понижение клеточной адгезии к стеклу и другим клеткам (табл. 57.5). Мишенями тирозинкиназы, кодируемой геном *src*, являются, по-видимому, некоторые **гликолитические ферменты**. Это согласуется с более высоким уровнем гликолиза, часто наблюдаемым в трансформированных клетках. Продукт гена *src* может также катализировать реакцию фосфорилирования **фосфатидилинозитола**, в результате образуется фосфатидилинозитолмоно- и бисфосфат. При гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата фосфолипазой С образуются инозитолтрифосфат и диацилглицерол (см. гл. 44). Первое соединение участвует в качестве медиатора в высвобождении ионов Ca^{2+} из внутриклеточных компартментов (например, из эндоплазматического ретикулума). Диацилглицерол стимулирует активность связанной с плазматической мембраной протеинкиназой С; этот фермент в свою очередь фосфорилирует ряд других белков, в том числе, вероятно, белковые компоненты ионных насосов. Высказано предположение, что небольшое повышение внутриклеточного pH, вызываемое активацией системы Na^+/H^+ -антипорта, стимулирует процесс митоза (см. гл. 42). Таким образом, продукт гена *src* может оказывать влияние на целый ряд клеточных процессов путем фосфорилирования различных белковых мишеней и ферментов, а также, стимулируя пути синтеза полифосфоинозитидов.

Таблица 57.5. Изменения в культуре клеток, свидетельствующие об опухолевой трансформации (например, после инфекции опухолеродными вирусами). Решающий признак малигнизации — способность клеток образовывать опухоли при введении животным

- Изменения морфологии: трансформированные клетки имеют более округлую форму, чем контрольные клетки
- Увеличение плотности клеток (потеря контактного торможения роста): трансформированные клетки часто формируют многослойные структуры, тогда как контрольные клетки растут в виде монослоя
- Утрата необходимости закрепления на подложке: трансформированные клетки могут расти, не прикрепляясь к поверхности культурального сосуда, и часто растут в агаре
- Утрата контактного торможения движения: трансформированные клетки могут расти и двигаться поверх других клеток, тогда как нормальные клетки прекращают движение, когда вступают в контакт с другими клетками
- Различные биохимические изменения, в том числе повышение скорости гликолиза, изменение состава клеточной поверхности (например, изменение состава гликопротеинов или гликосфинголипидов), секреция ряда протеаз
- Изменения цитоскелетных структур, например актиновых микрофиламентов
- Снижение потребности опухолевых клеток в факторах роста; секреция ряда факторов в окружающую среду при этом часто повышается

Тирозиновая протеинкиназа в нормальных и опухолевых клетках

Благодаря открытию тирозиновой протеинкиназы вируса саркомы Рауса стал интенсивно изучаться процесс фосфорилирования остатков тирозина в белках. Теперь известно, что тирозиновая протеинкиназа содержится во многих нормальных клетках. В большинстве таких клеток количество фосфотирозина мало, но при трансформации онкогенными вирусами, содержащими протеинкиназу, оно обычно

повышается, хотя абсолютное количество остается невысоким (1% всех фосфорсодержащих аминокислот). Ряд рецепторов (например, фактора роста эпидермиса, инсулина, фактора роста из тромбоцитов) нормальных и опухолевых клеток обладает активностью тирозиновой протеинкиназы, которая усиливается при взаимодействии рецепторов со своими лигандами (см. ниже «Факторы роста»). Таким образом, тирозиновая протеинкиназа играет важную роль и в нормальных, и в трансформированных клетках.

Онкогены других ретровирусов

Помимо онкогенов вируса саркомы Рауса было обнаружено около 20 онкогенов других ретровирусов. Продукты примерно половины из них представляют собой протеинкиназы (в основном тирозинового типа). Некоторые вирусные онкогены и их продукты приведены в табл. 57.6. Часть из них кодирует протеинкиназы; однако целый ряд онкогенов детерминирует различные другие белки, обладающие биологической активностью. Продукт гена *erb-B* вируса эритроblastоза птиц представляет собой неполную форму рецептора фактора роста эпидермиса, продукт онкогена *sis* вируса обезьяньей саркомы — неполную форму В-цепи молекулы фактора роста из тромбоцитов. Онкоген *fms* одиого из вирусов, выделенных из клеток саркомы кошек, кодирует синтез фактора, стимулирующего рост колоний макрофагов. Продукт гена *myc*, впервые обнаруженного у вирусов, вызывающих миелоцитому кур, представляет собой ДНК-связывающий белок, который может регулировать митозы в клетках. Продукт онкогена *ras* вируса саркомы мышей связывает GTP, обладает GTPазной активностью. Вероятно, он имеет отношение к белкам, регулирующим активность одного из ключевых ферментов мембран — аденилатциклазы (гл. 44).

Таблица 57.6. Некоторые онкогены ретровирусов. (Modified and reproduced, with permission, from Franks L. M., Teich N. M. (editors). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford Univ. Press, 1986.)

Онкоген	Ретровирус	Происхождение	Продукт онкогена	Субклеточная локализация
<i>abl</i>	Вирус Абельсона (лейкоза грызунов)	Мыши	Тирозиновая протеинкиназа	Плазматическая мембрана
<i>erb-B</i>	Вирус эритроblastоза птиц	Куры	Неполный рецептор ФРЭ	Плазматическая мембрана
<i>fes</i>	Вирус саркомы кошек	Кошки	Тирозиновая протеинкиназа	Плазматическая мембрана
<i>fos</i>	Вирус саркомы грызунов	Мыши	?	Ядро
<i>myc</i>	Вирус миелоцитомы 29	Куры	ДНК-связывающий белок	Ядро
<i>sis</i>	Вирус саркомы обезьян	Обезьяны	Неполный фактор роста из тромбоцитов (В-цепь)	Мембраны секретируется (?)
<i>src</i>	Вирус саркомы Рауса	Куры	Тирозиновая протеинкиназа	Плазматическая мембрана

Протоонкогены

Основной вопрос, который занимает исследователей со времени открытия вирусных онкогенов,— это вопрос об их происхождении. Опыты по гибридизации нуклеиновых кислот (см. гл. 36) показали, что нормальные клетки содержат последовательности ДНК, сходные (а возможно, идентичные) с вирусными онкогенами. Очевидно, в период внутриклеточного развития вирусы включают в свой геном клеточные гены. Их присутствие в геноме вирусов, по-видимому, обуславливает определенные селективные преимущества, связанные, например, с изменением характера роста трансформированных клеток.

Последовательности клеточной ДНК, гомологичные вирусным онкогенам, были найдены во многих клетках эукариот; это значит, что они представляют собой важные компоненты нормальных клеток. Кроме того, соответствующие мРНК и кодируемые ими белки могут обнаруживаться на разных стадиях развития или жизненного цикла клеток. Такие гены нормальных клеток получили название протоонкогенов. Продукты протоонкогенов играют существенную роль в нормальной дифференцировке и других клеточных процессах.

Онкогены опухолевых клеток

Опыты с ДНК, выделенной из клеток опухолей, также свидетельствуют о существовании онкогенов. Метод обнаружения клеточных онкогенов получил название «переноса генов» или «трансфекции». Он основан на том, что некоторые гены, присутствующие в опухолевых клетках, могут вызывать трансформацию «нормальных» клеток в культуре. Из опухолевых клеток выделяют ДНК, осаждают фосфатом кальция и добавляют к клеткам-реципиентам (обычно в этой роли выступает линия мышинных фибробластов NIH/3T3). Через 1—2 недели под микроскопом наблюдают образование фокусов трансформации. Клетки, составляющие фокус, меняют свою морфологию: из распластанных они становятся округленными. Из трансформированных клеток выделяют ДНК, и опыт повторяют. Так делают несколько раз, при этом уменьшается количество ДНК, не участвующей в переносе признака трансформации, и, следовательно, облегчается идентификация специфических генов (при помощи гибридизации по Саузерну (см. гл. 36)). С помощью этого метода было идентифицировано около 20 клеточных онкогенов; некоторые из них сходны с геном *ras* вируса саркомы мышей. Эти клеточные онкогены либо вообще не отличаются от нормальных генов, либо имеют небольшие структурные особенности (см. ниже). В первом случае при опухолевом перерождении может меняться регуляция их экспрессии.

Сокращенные названия клеточных и вирусных онкогенов

Онкоген, содержащийся в опухолевых клетках, обычно обозначается в литературе «с-*onc*» (от cellular oncogene; например, с-*ras*). Аналоги, содержащиеся в нормальных клетках,— протоонкогены— соответственно носят название с-*onc*-протоонкоген (например, с-*rac*-протоонкоген). Вирусный онкоген называют v-*onc* (например, v-*ras*; от viral oncogene), а соответствующий протоонкоген— v-*onc*-протоонкоген (например, v-*ras*-протоонкоген).

Механизм превращения протоонкогенов в онкогены

Мы обсудим пять механизмов, с помощью которых меняется экспрессия или структура протоонкогенов и, следовательно происходит их превращение в онкоген. Процесс, в результате которого транскрипция гена повышается (от нулевого или низкого уровня), называют **активацией**. Знание механизмов активации принципиально для понимания современного состояния проблемы канцерогенеза.

А. Вставка промотора. Некоторые ретровирусы (например, вирусы лейкозов птиц) не содержат онкогенов, однако способны вызывать рак. При этом опухоли появляются через более длительный промежуток времени (через месяцы, а не дни, как в случае вирусов, содержащих онкогены). При инфицировании клеток этими вирусами и другими ретровирусами с вирусного РНК-генома с помощью обратной транскриптазы синтезируется копия ДНК (кДНК), которая встраивается в геном клетки-хозяина. Интегрированная двухцепочечная кДНК называется провирусом. Копии кДНК ретровирусов, подобно некоторым транспозонам (**прыгающим генам**), найденным в растениях и бактериях, содержат на обоих концах последовательности, называемые **длинными концевыми повторами**. Эти последовательности играют важную роль в механизме интеграции провируса и действуют как промоторы транскрипции (см. гл. 39). При инфицировании В-лимфоцитов кур некоторыми вирусами лейкоза птиц их провирусы встраиваются в районе гена *тус*. Этот ген активируется расположенным до него длинным концевым повтором, выступающим в роли промотора. В результате происходит транскрипция, а затем и трансляция соответствующей *тус*-мРНК (рис. 57.3). Это в свою очередь приводит к развитию В-клеточной опухоли, хотя конкретная роль продуктов гена *тус* в этом процессе пока неясна. Сходные процессы происходят и при инфицировании различных клеток другими ретровирусами.

Б. Вставка энхансера. Иногда провирус встраивается после гена *тус* или до него, но в обратной ориентации, тем не менее ген *тус* активируется (рис.

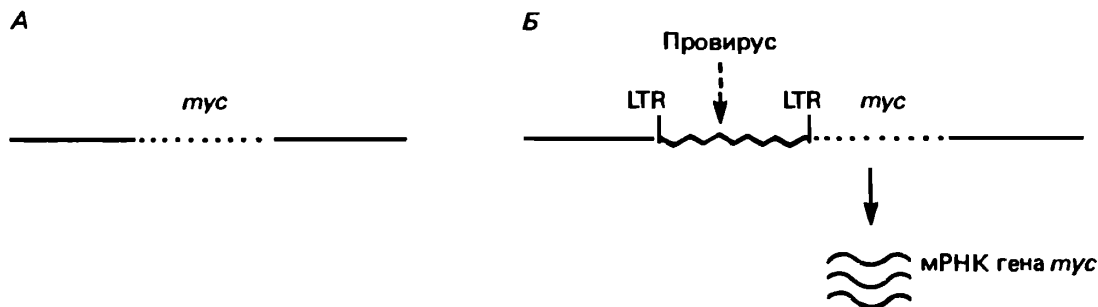


Рис. 57.3. Схематическое изображение процесса активации протоонкогена в результате вставки промотора. *А.* Нормальная хромосома курицы содержит неактивный ген *тус*. *Б.* Вирус лейкоза птиц интегрирован в хромосому в виде провируса в области, соседней с геном *тус*. Правый длинный концевой повтор провируса (LTR), содержащий сильный промотор, локализован до гена *тус*, активирует его, и в результате начинается транскрипция *тус*-мРНК. Для простоты изображена лишь одна цепочка ДНК.

57.4). В данном случае активацию нельзя объяснить вставкой промотора, так как последний должен находиться до гена, транскрипция которого усиливается, а последовательность должна иметь правильную ориентацию (от 5' к 3'). Следовательно, активация объясняется, по-видимому, присутствием энхансеров в длинных концевых повторах ретровирусов (см. гл. 39 и 41).

Приведенные два механизма (вставка промотора и энхансера) можно назвать обычными для вирусного канцерогенеза.

В. Хромосомные транслокации. Как отмечалось ранее, во многих опухолевых клетках можно наблюдать хромосомные аномалии. Один из видов таких аномалий — транслокация. Суть ее состоит в том, что фрагмент одной хромосомы отщепляется и присоединяется к другой хромосоме. Если эта последняя хромосома в свою очередь отдает соответствующий фрагмент первой хромосоме, то происходит так называемая «реципрокная транслокация». В целом ряде опухолевых клеток найдены характерные транслокации. Например, при хроническом гранулоцитарном лейкозе в клетках можно обнаружить Филадельфий-

скую хромосому. В ее образовании участвуют хромосомы 9 и 22.

Реципрокная транслокация выявлена у некоторых пациентов с лимфомой Беркитта — быстрорастущей опухоли В-лимфоцитов человека (рис. 57.5). Эта транслокация иллюстрирует механизм активации потенциальных клеточных онкогенов. В транслокации участвуют хромосомы 8 и 14. Фрагмент хромосомы 8, присоединяющийся к хромосоме 14, содержит ген *тус*. Как показано на рисунке 57.6, в результате такого перемещения (транспозиции) неактивный ген попадает под контроль энхансера, усиливающего транскрипцию генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов. В результате ген *тус* активируется. По-видимому, синтез больших количеств ДНК-связывающего белка, кодируемого геном *тус*, вызывает малигнизацию клеток, возможно влияя на регуляцию митозов. Этот механизм сходен с механизмом вставки энхансера, однако в рассматриваемом случае хромосомная транслокация (а не интеграция провируса) «ставит» протоонкоген (в данном случае *тус*) под контроль энхансера.

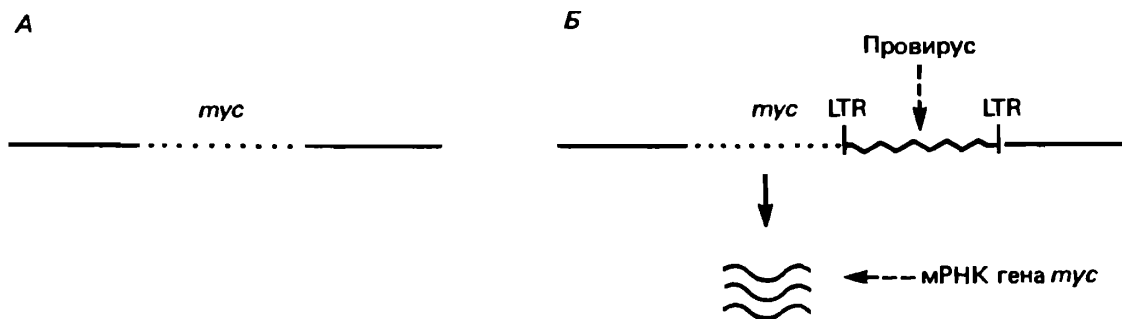


Рис. 57.4. Схематическое изображение процесса активации протоонкогена в результате вставки энхансера. *А.* Нормальная хромосома курицы содержит неактивный ген *тус*. *Б.* Вирус лейкоза птиц встраивается в хромосому в форме провируса в области, соседней с геном *тус*. В данном случае, однако, сайт интеграции расположен за геном *тус* и не может работать как промотор (рис. 57.6). Определенная последовательность провируса в данном случае выступает в роли энхансера, что ведет к активации гена *тус* и транскрипции его. Для простоты изображена лишь одна цепочка ДНК.

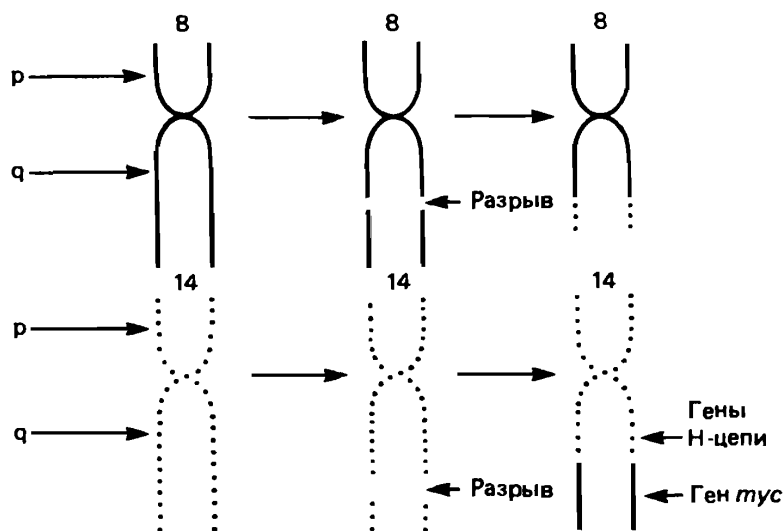


Рис. 57.5. Схематическое изображение реципрокной транслокации, обнаруживаемой в клетках лимфомы Беркитта. Участвуют хромосомы 8 и 14. Конец q-плеча 8-й хромосомы переходит к 14-й хромосоме, гомологичный фрагмент хромосомы 14 переходит к 8-й хромосоме. Ген *тус* находится в том сегменте хромосомы 8, который попадает на хромосому 14; он встраивается вслед за генами, кодирующими тяжелые цепи молекул иммуноглобулинов, и активируется.

Г. Амплификация генов. Амплификация некоторых генов (см. гл. 38) обнаружена в клетках ряда опухолей. Как выяснилось, ее можно вызвать введением противоопухолевого препарата метотрексата — ингибитора дигидрофолатредуктазы. В результате опухолевые клетки становятся резистентными к действию метотрексата. Причиной резистентности является амплификация гена дигидрофолатредуктазы, при этом активность фермента повышается примерно в 400 раз. Амплифицированные гены, имеющие суммарную длину 1000 т. п. н. или даже больше, выявляются в виде гомогенно окрашенных участков на соответствующих хромосомах. Амплифицированные гены могут обнаруживаться также в двойных мини-хромосомах, не содержащих центромер. В настоящее время исследуется связь гомогенно окрашенных участков и двойных мини-хромосом. Процесс амплификации, а следовательно, и активации, может затрагивать и некоторые клеточные онкогены. Имеются данные, позволяющие предполагать, что увеличение количества продукта некоторых он-

когенов (например, *c-ras*) в результате амплификации может играть роль в повышении злокачественности опухолевых клеток (см. ниже «Прогрессия опухолей»).

Д. Точечные мутации. Онкоген *v-ras* был впервые обнаружен в некоторых ретровирусах грызунов (например, крыс и мышей). Продукт этого гена — белок с мол. массой 21 000 (p21) — близок G-белкам, регулирующим активность аденилатциклазы, и, следовательно, играет ключевую роль в ответных реакциях клеток на гормоны и лекарства. Сравнение последовательности ДНК протоонкогена *c-ras* из нормальных клеток человека и онкогена *c-ras* из клеток опухоли мочевого пузыря показало, что они отличаются лишь по одному основанию и, следовательно, по одной аминокислоте (положение 12 белка p21). Этот интересный результат был подтвержден анализом генов *c-ras* других опухолей человека. Во всех случаях были получены одни и те же результаты: ген, выделенный из клеток опухоли, содержал лишь одну точечную мутацию по сравнению с *c-ras*-про-

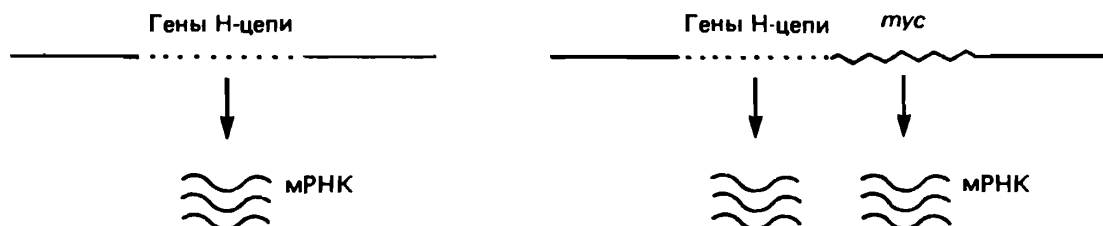


Рис. 57.6. Схематическое изображение процесса активации *тус*-протоонкогена при транслокации в клетках лимфомы Беркитта. Небольшой фрагмент 14-й хромосомы перед транслокацией. Указанный фрагмент содержит гены, кодирующие участки тяжелых цепей иммуноглобулинов. После транслокации первично неактивный ген *тус* оказывается под контролем энхансера, локализованного в области генов, кодирующих тяжелые цепи. В результате ген *тус* активируется. Показана лишь одна цепь ДНК.

тоонкогеном из нормальных клеток. Поскольку положение такой мутации варьирует, меняется и положение аминокислотной замены. Мутации p21 меняют конформацию белка и уменьшают его GTPазную активность. Понижение активности этого фермента влечет за собой стимуляцию активности аденилатциклазы, которая тормозится при образовании GDP из GTP (см. гл. 44). В результате стимуляции аденилатциклазы возрастает количество сАМР, что влияет на активность различных сАМР-зависимых протеинкиназ. Это в свою очередь сдвигает баланс процессов клеточного метаболизма в направлении трансформации или ее стабилизации.

Общие замечания относительно активации онкогенов

Из пяти рассмотренных механизмов активации онкогенов в первых четырех (вставка промотора, вставка энхансера, хромосомные транслокации и амплификация генов) имеет место усиление транскрипции и вследствие этого повышение количества продукта онкогена. При этом его структура не меняется. Возможно, именно увеличения концентрации продукта оказывается достаточно, чтобы запустить процесс малигнизации клеток. Пятый механизм активации (точечные мутации) подразумевает изменение структуры продукта онкогена, при этом количество

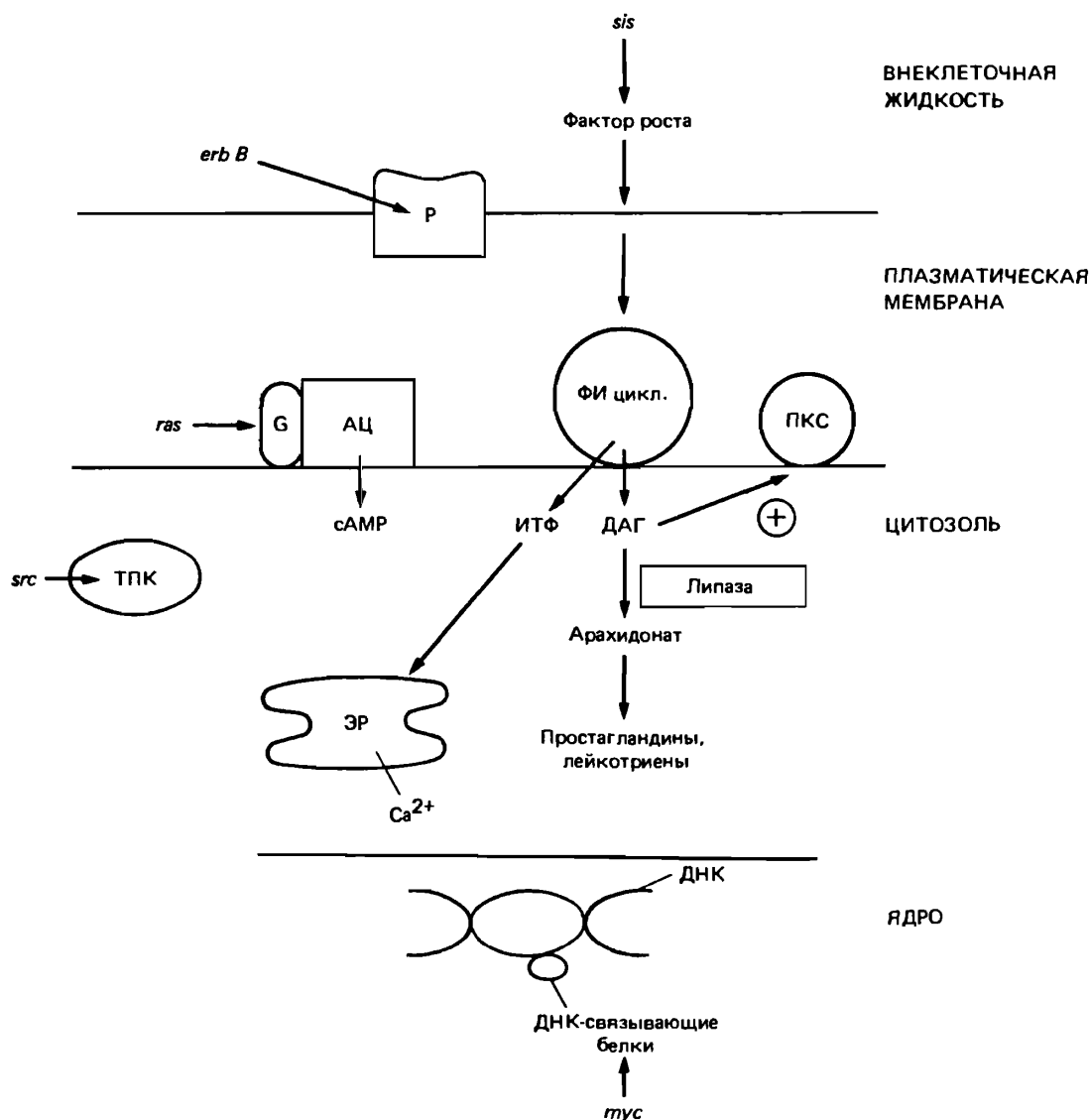


Рис. 57.7. Схема механизмов, с помощью которых продукты онкогенов могут влиять на клеточный метаболизм и тем самым стимулировать рост. сАМР влияет на клеточные процессы, активируя сАМР-зависимые протеинкиназы. Тирозинкиназа и протеинкиназа С могут активировать целый ряд белков-мишеней. На клеточные реакции влияют ионы Ca^{2+} , простагландины и лейкотриены, образующиеся из арахидоновой кислоты. Р — рецептор; G — G-белок; АЦ — аденилатциклаза; ФИ — фосфатидилинозитол; ПКС — протеинкиназа С; ТПК — тирозинкиназа; ИТФ — инозитолтрифосфат; ДАГ — диацилглицерол; ЭР — эндоплазматический ретикулум.

его может не меняться. Таким образом, для процесса трансформации может оказаться достаточным наличие структурно аномального регуляторного белка.

При обсуждении роли онкогенов в процессе возникновения злокачественных новообразований стоит иметь в виду, что онкогены выделены лишь из 15% опухолей человека. Возможно, в некоторых случаях активация онкогена — это следствие трансформации, а не причина ее. Участие онкогенов в развитии экспериментальных опухолей, вызванных химическими канцерогенами, лишь начинает изучаться. Так, недавно было показано, что при индукции опухоли молочной железы крысы нитрозометилмочевойной наблюдается активация гена *c-ras*, при этом выявлена мутация типа транзиции G→A. Этот факт свидетельствует о том, что онкогены участвуют в химическом канцерогенезе. Поскольку в данных экспериментах канцероген применяли однократно (без промотора), обнаруженная мутация могла быть компонентом стадии инициации химического канцерогенеза. Для выяснения возможной роли онкогенов в процессах инициации, промотирования, прогрессии опухолей и их метастазирования необходимы дальнейшие исследования.

Механизмы действия онкогенов

Существуют по меньшей мере три механизма, с помощью которых онкогены стимулируют рост клеток (рис. 57.7). 1. Онкогены могут действовать на ключевые внутриклеточные процессы, участвующие в контроле роста клеток. При этом оказывается ненужным внешний стимул. Примерами могут служить продукт гена *src*, являющийся тирозиновой протеин-

киназой, продукт гена *ras*, стимулирующий (опосредованно) активность аденилатциклазы, или продукт гена *тус* — ДНК-связывающий белок. В каждом из этих примеров онкоген может оказывать воздействие на процесс митоза (продукты первых двух онкогенов путем влияния на фосфорилирование ключевых регуляторных белков). Существенный пробел в нашем понимании процесса клеточного роста состоит в том, что очень мало известно о молекулярных аспектах регуляции митоза даже в нормальных клетках. 2. Продукты онкогенов могут имитировать действие полипептидных факторов роста. 3. Продукты онкогенов могут имитировать ситуацию, возникающую при взаимодействии рецептора с соответствующим фактором роста.

ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА

Изучение факторов роста — одно из наиболее быстро развивающихся направлений на стыке современной биологии и медицины. Многие факторы роста в настоящее время выделены и частично охарактеризованы (табл. 57.7). До недавнего времени для исследований были доступны лишь небольшие их количества. Однако теперь клонированы гены целого ряда факторов роста и благодаря методам генной инженерии стало возможным получать ДНК факторов роста в больших количествах. Известные в настоящее время факторы роста влияют на клетки различных типов, например на клетки крови, нервной системы, мезенхимы и эпителия. Их воздействие на

Таблица 57.7. Некоторые полипептидные факторы роста. (Modified and reproduced, with permission, from Franks L. M., Teich N. M. (editors). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford Univ. Press, 1986.)

Фактор роста	Источник	Функции
Фактор роста эпидермиса (ФРЭ)	Слюнные железы мышей	Стимулирует рост многих эпидермальных и эпителиальных клеток
Эритропоэтин	Почки, моча	Регулирует развитие ранних эритропоэтических клеток
Инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 (ИФР-1, ИФР-2, называемые также соматомединами С и А)	Сыворотка	Стимулируют включение сульфата в хрящи: оказывают митогенное действие на хондроциты: оказывают инсулиноподобное действие на многие клетки
Интерлейкин 1 (ИЛ-1)	Кондиционированная среда	Стимулирует продукцию ИЛ-2
Интерлейкин 2 (ИЛ-2)	Кондиционированная среда	Стимулирует рост Т-клеток
Фактор роста нервов (ФРН)	Слюнные железы мышей	Действует на симпатические и некоторые сенсорные нейроны
Фактор роста из тромбоцитов	Тромбоциты	Стимулирует рост клеток мезенхимы и глиии
Трансформирующий фактор роста (ТФР-α)	Кондиционированная среда с трансформированными или опухолевыми клетками	Действует аналогично ФРЭ
Трансформирующий фактор роста (ТФР-β)	Почки, тромбоциты	Оказывает либо стимулирующее, либо подавляющее действие на некоторые клетки

клетки-мишени вызывает митогенный эффект; хотя, чтобы показать это, иногда необходимо создавать специальные условия. Например, перед добавлением факторов роста клетки помещают в среду без сыворотки, чтобы они пришли в состояние покоя. Фактор роста из тромбоцитов, секретируемый их α -гранулами, по-видимому, принимает участие в процессе заживления ран. Целый ряд факторов играет ключевую роль в регуляции дифференцировки стволовых клеток в зрелые кроветворные клетки. Существуют также ингибирующие ростовые факторы; например, трансформирующий фактор роста тормозит рост определенных клеток. Таким образом, наличие в культуральной среде больших количеств факторов роста или слишком малых количеств ингибирующих ростовых факторов может изменять характер роста клеток.

ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ РОСТА ПО ЭНДОКРИННОМУ, ПАРАКРИННОМУ ИЛИ АУТОКРИННОМУ ТИПУ

Существуют три пути воздействия факторов роста: 1) **эндокринный** путь, т. е. ростовые факторы могут действовать подобно гормонам. Они синтезируются в определенном месте и с током крови переносятся к клеткам-мишеням; 2) факторы роста могут синтезироваться в специфических клетках, секретироваться ими и действовать на соседние клетки; при этом клетки, секретирующие факторы роста, к ним не чувствительны, так как у них отсутствуют соответствующие рецепторы; такой путь воздействия называется **паракринным**; 3) некоторые факторы роста оказывают действие на синтезирующие их клетки (**аутокринный** путь). Например, фактор секретируется в среду, а затем действует на ту клетку, которая его секретирует и имеет соответствующие рецепторы. В другом варианте некоторое количество фактора не секретируется, остается внутри клетки и может непосредственно стимулировать различные процессы.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РОСТА

О механизме действия факторов роста на молекулярном уровне известно относительно мало. Подобно полипептидным гормонам (см. гл. 44), ростовые факторы должны передать сигнал через плазматическую мембрану внутрь клетки (**трансмембранная передача сигнала**). В конечном счете сигнал фактора роста влияет на один или несколько процессов, имеющих отношение к митозу. Для большинства ростовых факторов на плазматической мембране клеток-мишеней имеются высокоспецифические рецепторы. Клонированы гены рецептора фактора роста эпидермиса (ФРЭ) и инсулина; реконструированы

структуры рецепторов. Они состоят из короткого трансмембранного сегмента, а также наружного и цитоплазматического доменов, отличающихся длиной у разных рецепторов. Лиганды связываются с наружными доменами. Ряд рецепторов (например, рецепторы фактора роста эпидермиса, инсулина и фактора роста из тромбоцитов) обладает активностью тирозиновой протеинкиназы (напомним, что такой же активностью обладает продукт гена *v-src*). Киназная активность локализована в цитоплазматических доменах рецепторов, где ее роль — аутофосфорилирование белка рецептора. Комплекс рецептора и лиганда подвергается эндоцитозу в окаймленных пузырьках (см. рецепторы LDL, гл. 27); до сих пор не ясно, возвращаются ли рецепторы на клеточную поверхность. Механизмы передачи трансмембранных сигналов факторами роста изучаются; показано, что они неодинаковы у разных факторов. В качестве примера рассмотрим последовательность действия фактора роста из тромбоцитов. Этот фактор стимулирует активность фосфолипазы C, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат до инозитолтрифосфата и диацилглицерола (см. ранее, *v-src*, а также рис. 44.5). Инозитолтрифосфат влияет на высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} , а диацилглицерол — на активность протеинкиназы C; таким образом «заводятся» многие внутриклеточные процессы. При последующем гидролизе диацилглицерола фосфолипазой A_2 высвобождается (в числе других жирных кислот) арахидоновая кислота, участвующая в синтезе простагландинов и лейкотриенов, обладающих высокой биологической активностью (см. гл. 24). Инкубация клеток с препаратом фактора роста из тромбоцитов может приводить к быстрой (от нескольких минут до 1—2 ч) активации клеточных протоонкогенов (например, *c-myc* и *c-fos*). Весьма вероятно, что именно активация нормальных генов или протоонкогенов лежит в основе действия факторов роста.

ФАКТОРЫ РОСТА И ОНКОГЕНЫ

Как теперь известно, продукты ряда онкогенов представляют собой либо факторы роста, либо их «неполные» рецепторы (табл. 57.6).

В-цепь фактора роста из тромбоцитов содержит 109 аминокислот. Весьма вероятно, что В-цепь биологически активна в виде гомодимера без участия А-цепи. Было показано, что ген *v-sis* кодирует 100 из 109 аминокислот В-цепи; это открытие выявило прямую взаимосвязь между онкогенами и факторами роста. Можно предположить, что аутокринная регуляция, осуществляемая этим фактором роста, является важным фактором при трансформации клеток геном *v-sis*. Действительно, многие культивируемые опухолевые клетки секретируют факторы роста в окружающую среду и одновременно обладают рецепторами для этих молекул.

Анализ первичной структуры *v-erb-B* показал, что этот ген детерминирует образование неполной формы рецептора ФРЭ; при этом отсутствует большая часть внешнего домена рецептора, а протеинкиназная активность сохраняется. Было высказано предположение, что неполная форма рецептора для ФРЭ, кодируемая *v-erb-B*, может быть активна внутри клетки, имитируя рецептор, связанный с эндогенным фактором роста. Как и в случае аутокринной стимуляции фактором роста из тромбоцитов, это может приводить к появлению постоянного митогенного «сигнала», ведущего клетки к трансформированному состоянию.

Трансформирующий фактор роста (ТФР-β) первоначально считали позитивным (стимулирующим) фактором, поскольку при добавлении его к культуре фибробластов последние вели себя как трансформированные клетки. В настоящее время установлено, что ТФР-β тормозит рост большинства типов клеток (за исключением фибробластов). Подавляет он и рост клеток обезьяньей почки, которые его синтезируют. ТФР-β может активировать в фибробластах ген *sis*. Механизм торможения роста других клеток до сих пор неясен. Имеются данные о том, что некоторые гены кодируют продукты, замедляющие рост клеток; кроме того, существуют гены, супрессирующие развитие опухолей. Таким образом, контроль роста клеток — процесс сложный, он может регулироваться как стимулирующими, так и тормозящими факторами.

ПРОГРЕССИЯ ОПУХОЛЕЙ

Если нормальная клетка превратилась в опухловую, то ее потомство по составу и поведению не остается постоянным. В ряду клеточных поколений имеется тенденция к повышению уровня малигнизации. Это проявляется в увеличении частоты аномальных кариотипов, скорости роста, в тенденции к инвазии и метастазированию. Важнейшие проявления прогрессии, вероятно, отражают нестабильность генома опухолевых клеток. Можно предполагать, что при этом активируются дополнительные онкогены. Селективное преимущество имеют клетки с более высокой скоростью роста.

Важно различать по биохимическим свойствам недавно трансформированные клетки и быстро размножающиеся высокомалигнизированные клетки. Клетки первого типа могут мало отличаться от нормальных, за исключением тех ключевых изменений, которые, собственно, и ведут к малигнизации (например, активация одного или нескольких онкогенов) (табл. 57.5). Исследование таких клеток позволяет выявить биохимические особенности, приводящие к опухолевой трансформации. Свойства нормальных и высокоопухолевых клеток могут сильно

Таблица 57.8. Биохимические изменения в опухолевых клетках

Увеличение активности рибонуклеотидредуктазы
Повышение синтеза РНК и ДНК
Снижение катаболизма пиримидинов
Увеличение скорости аэробного и анаэробного гликолиза
Изменение изотимных профилей, часто в направлении эмбриональных профилей
Синтез эмбриональных белков (например, карциноэмбрионального антигена)
Утрата высокодифференцированных биохимических функций (например, снижение синтеза специализированных белков)
Неадекватный синтез некоторых факторов роста и гормонов

различаться: изменяется, например, спектр ферментов (табл. 57.8). Некоторые из этих изменений являются вторичными, возникающими вследствие повышения скорости роста, другие же обусловлены хромосомной нестабильностью. В популяции быстрорастущих клеток повышается активность анаболических процессов, необходимых для роста (синтез ДНК и РНК); интенсивность катаболических реакций (например, катаболизм пиримидинов) понижается. Одновременно исчезает ряд признаков дифференцировки, свойственной их нормальным предшественникам. Другими словами, все функции таких клеток концентрируются на росте. Помимо этого становится иным характер экспрессии генов, например, кодирующих синтез ряда эмбриональных белков (некоторые из них служат опухолевыми маркерами; см. табл. 57.1); кроме того, в опухолевых клетках повышается синтез ростовых факторов и гормонов. При исследовании таких клеток трудно выявить именно те события, которые привели к трансформации; они бывают «замаскированы» массой изменений, вторичных по отношению к прогрессии. При выборе схемы химиотерапии чрезвычайно важно знать биохимические свойства опухолевых клеток, поскольку именно с этим типом клеток приходится иметь дело онкологам.

МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Метастазирование — это перемещение опухолевых клеток из первичного очага в другие ткани, где они дают начало вторичным опухолям. Процесс метастазирования — весьма сложен, о его биохимическом механизме на сегодняшний день известно крайне мало. Предполагают, что метастазирование отражает нарушение межклеточных взаимодействий, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется изучению особенностей поверхности нормальных и опухолевых клеток. Показано, что поверхность опухолевых клеток довольно сильно изменена

Таблица 57.9. Некоторые изменения, обнаруживаемые на поверхности злокачественных клеток. (Adapted from Robbins J. C., Nicolson G. L. Surfaces of normal and transformed cells. In: Cancer: A Comprehensive Treatise, Vol. 4, Beckerr F. F. (editor). Plenum Press, 1975.)

Изменения проницаемости
 Изменения транспортных свойств
 Ослабление адгезии
 Усиление агглютинации клеток растительными лектинами
 Изменение активности ряда ферментов (например, некоторых протеаз)
 Изменение заряда поверхности
 Появление новых антигенов
 Утрата некоторых антигенов
 Изменения в олигосахаридных цепях гликопротеинов
 Изменения в составе гликолипидов

(табл. 57.9), хотя не все изменения прямо связаны с процессом метастазирования.

В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку удобных модельных систем на животных, с помощью которых можно было бы исследовать процесс метастазирования. Многие работы посвящены выяснению возможной роли некоторых протеаз (например, коллагеназы IV типа), гликопротеинов и гликофинголипидов клеточной поверхности в явлении метастазирования. Возможно, например, что существенным моментом при появлении метастазов является изменение олигосахаридных цепей, входящих в состав клеточных гликопротеинов (эти изменения вторичны по отношению к изменениям активности специфических гликозилтрансфераз гликопротеинов). Понимание биохимических механизмов, вовлеченных в процесс мета-

стазирования, может создать основу для разработки более эффективных методов противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

- Barbacid M.* Oncogenes and human cancer: Cause of consequence? *Carcinogenesis*, 1986, **7**, 1037.
Bishop J. M. The molecular genetics of cancer, *Science*, 1987, **235**, 305.
Croce C. M., Klein G. Chromosome translocations and human cancer, *Sci. Am.* (March), 1985, **252**, 54.
Darnell J., Lodish H., Baltimore D. *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, 1986.
Farmer P. B., Walker J. M. (eds.) *The Molecular Basis of Cancer*, Croom. Helm. Ltd., 1985.
Franks L. M., Teich N. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford Univ. Press, 1986.
Hunter T. Oncogenes and growth control, *Trends Biochem. Sci.*, 1985, **10**, 275.
Hunter T., Cooper J. A. Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 897.
Massague J. The transforming growth factors, *Trends Biochem. Sci.*, 1985, **10**, 237.
McIntire K. R. Tumor markers: How useful are they? *Hosp. Pract.* (Dec). 1984, **19**, 55.
Nicolson G. L. Cell surface molecules and tumor metastasis: Regulation of metastatic phenotypic diversity, *Exp. Cell Res.*, 1984, **150**, 3.
Pitot H. C. *Fundamentals of Oncology*, 3rd ed., Marcel Dekker, 1986.
Sporn M. B., Roberts A. B. Autocrine growth factors and cancer, *Nature*, 1985, **313**, 745.
Tannock I. F., Hill R. (eds.) *The Basic Science of Oncology*, Pergamon Press, 1987.
Weinberg R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus, *Science*, 1985, **230**, 770.

Приложение

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ И ЖИДКИХ СРЕД ОРГАНИЗМА

Количественная оценка лабораторных данных

Результаты, получаемые в клинической лаборатории при определении концентрации или количества вещества в образце, отражают возможности соответствующего метода, качество реактивов и оборудования.

Точность метода — это степень приближения полученного значения к «истинному» значению (например, к известной концентрации в контрольном образце). **Воспроизводимость** метода характеризуется разбросом показателей, полученных при анализе нескольких проб одного образца. **Надежность** метода определяется его точностью и воспроизводимостью.

Воспроизводимость зависит от ряда факторов: сложности метода, стабильности и качества реактивов, точности первичного стандарта, надежности оборудования, опыта технического персонала. В обязанность каждой лаборатории входит проверка воспроизводимости методов. Ее оценивают по величине стандартного отклонения от средней, полученной при повторных исследованиях одного образца. Например, воспроизводимость при определении холестерина сыворотки в хорошей лаборатории обычно составляет в среднем ± 5 мг%. Известно, что 95%-ный доверительный интервал составляет ± 2 стандартных отклонения, что в данном случае соответствует ± 10 мг%. Таким образом, каждый результат считается истинным, если он находится в пределах этих границ (20 мг%). Так, показатель холестерина сыворотки 200 мг% означает, что истинное значение находится в пределах между 190 и 210 мг%. При определении калия в сыворотке с ошибкой $\pm 0,1$ ммоль/л (1SD) результаты тестирования проб из одного образца могут отличаться на $\pm 0,2$ ммоль.

Результат 5,5 ммоль говорит о том, что истинное значение находится в интервале 5,3—5,7. Это означает, что при анализе разных проб в одном образце могут быть получены результаты — и 5,3, и 5,7 ммоль/л; оба они соответствуют воспроизводимости теста.

Врач должен получать из лаборатории сведения о возможной ошибке измерений для каждого метода, это дает ему возможность судить о том, изменились ли результаты анализов у данного больного.

Интерпретация лабораторных тестов

Нормальными величинами считаются такие, которые не выходят за пределы двух стандартных отклонений от среднего значения рассматриваемого показателя в нормальной (здоровой) популяции. Такие величины характеризуют 95% популяции здоровых людей. Существует множество факторов, влияющих на результаты анализов; среди них **возраст, раса, пол, окружающая среда, положение тела, суточные и другие циклические изменения, время взятия пробы для анализа (натощак или после еды), характер пищи, прием лекарства, степень физической активности.**

Нормальные величины могут варьировать в зависимости от метода определения, условий забора и хранения проб. В каждой лаборатории все этапы анализа должны быть строго регламентированы и стандартизированы для того, чтобы результаты можно было правильно интерпретировать.

При интерпретации лабораторных данных следует учитывать состояние пациента. Низкая концентрация вещества, например натрия в сыворотке, может быть результатом как его недостаточности, так и «разведения». Отклонения от нормы могут быть связаны не только со спецификой заболевания, но и с приемом каких-то лекарств. Так, повышение мочевой кислоты в сыворотке может быть обусловлено подагрой, а может быть следствием приема хлоротиазида или противоопухолевых препаратов. При

оценке полученного результата совершенно необходимо иметь перед глазами список лекарственных препаратов, влияющих на результаты данного теста.

Существенное значение имеет способ забора материала для исследования. Неправильно собранная суточная моча, гемолиз крови, использование неадекватного антикоагулянта, недостаточно чистая посуда или неисправный прибор — все эти факторы могут служить источником ошибки при анализе.

Примечание. Если получены необычные или сильно отклоняющиеся от нормы результаты, необходимо прежде, чем делать выводы, касающиеся лечения больного, исключить возможность ошибки. Желательна консультация с экспертом в этой области.

Влияние пищи и положения тела на концентрацию веществ в крови

А. Пища. Обычно забор крови для анализа делают натощак после 8—12 ч голода. За редким исключением, разрешается пить воду.

Если забор крови производится через 3—4 ч после завтрака, полученные результаты стандартных тестов отличаются от величин «натощак». Если же кровь берут через 3—4 ч после обеда, показатели отклоняются в ещё большей степени. Для правильного определения триглицеридов в сыворотке или плазме необходимо 10—14-часовое голодание.

Б. Положение тела. Объем плазмы, измеренный у человека, который лежал несколько часов, на 10—15% больше, чем у человека, который менял положение тела или стоял около часа. Это означает, что результаты измерения концентрации веществ в крови у человека, который лежал больше часа, будут более низкими, чем у него же после ходьбы.

Результаты анализов у одного и того же человека меняются при переходе из горизонтального положения в вертикальное: повышается общий белок, альбумин, кальций, калий, фосфат, холестерол, триглицериды, АСТ, фосфатазы, общий тироксин, гематокрит, количество эритроцитов и гемоглобин. Максимальные изменения касаются концентрации общего белка, ферментов (+ 11%) и кальция (3—4%). В серии исследований изменение вертикального положения на горизонтальное сопровождается снижением общего белка на 0,5 г%, альбумина — 0,4—0,6 г%; кальция — 0,4 мг%; холестерола — 10—25 мг%, общего тироксина на 0,8—1,8 мкг%, гематокрита на 4—9% (вследствие гемодилюции после возвращения интестинальной жидкости в кровоток).

Наложение жгута на 1 мин вместо 3-х приводило к следующим изменениям результатов: общий белок — + 5%, железо — + 6,7%, холестерол — + 5%, АСТ — + 9,3%, билирубин — + 8,4%; снижение было отмечено в уровне калия — 6% и креатинина — 2,3%.

Обоснованность лабораторных тестов

Клиническое значение теста определяется его специфичностью, чувствительностью, а также распространенностью соответствующего заболевания в обследуемой популяции.

О **чувствительности** теста судят по доле (%) положительных результатов анализа среди пациентов с соответствующим заболеванием. Например, тест на фенилкетонурию высокочувствителен: положительный результат наблюдается у всех пациентов с этим заболеванием (100% чувствительности). Тест на карциноэмбриональный антиген имеет низкую чувствительность: результаты положительны лишь у 72% больных раком толстого кишечника на стадии прогрессивного развития опухоли и всего в 20% случаев на ранних стадиях. Низкая чувствительность тестов в начале болезни и резкое повышение ее уровня в более поздний период характерны для многих форм патологии.

О **специфичности** судят по доле (%) отрицательных результатов среди лиц, не страдающих соответствующим заболеванием. Например, тест на фенилкетонурию высокоспецифичен: исследование людей, не страдающих фенилкетонурией, в 99,9% случаев дает отрицательный результат. Напротив, специфичность теста на карциному кишечника невысока: у некурящих пациентов 3% — ложноположительных результатов (97%-ная специфичность); у курящих доля таких результатов достигает 20% (80%-ная специфичность). Встречаются ситуации, затрудняющие оценку специфичности; например, содержание сывороточного тироксина повышено не только у пациентов с гипертиреозом, но также у женщин, принимающих оральные контрацептивы, и у беременных.

Диагностическая ценность положительного теста характеризуется долей (в%) истинно положительных результатов среди всех положительных. Этот показатель непосредственно связан с вероятностью предполагаемого заболевания.

Формулы для определения:

$$\begin{aligned} \text{Чувствительность} &= \\ &= \frac{\text{Истинно положительные}}{\text{Истинно положительные} + \text{Ложноотрицательные}} \times \\ &\quad \times 100\%; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Специфичность} &= \\ &= \frac{\text{Истинно отрицательные}}{\text{Истинно положительные} + \text{Ложноположительные}} \times \\ &\quad \times 100\%; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Диагностическая ценность} &= \\ &= \frac{\text{Истинно положительные}}{\text{Истинно положительные} + \text{Ложноположительные}} \times \\ &\quad \times 100\%. \end{aligned}$$

Прежде чем назначать биохимический анализ, необходимо оценить, насколько чувствительность, специфичность и диагностическая ценность теста адекватны поставленным задачам, в какой мере они могут способствовать правильной постановке диагноза и выбору курса лечения.

Единицы в системе СИ (Système International d'Unités)

Генеральная конференция Мер и Весов разработала согласованную систему мер, принятую в настоящее время.

Для клинического использования были выбраны 8 основных параметров:

длина: метр (м);
масса: килограмм (кг);
количество вещества: моль (mole);
время: секунда (сек);
термодинамическая температура: кельвин (К);
сила тока: ампер (А);
сила света: кандела (cd);
каталитическая активность: катал (kat).

Производными основных параметров являются следующие:

концентрация массы: килограмм/литр (кг/г);
доля массы: килограмм/килограмм (кг/кг);
объемная доля: литр/литр (л/л);
объем: кубический метр (м³); для клинического использования — литр (л);
концентрация вещества: моль/литр (моль/л);
молярность: моль/килограмм (моль/кг);
молярная доля: моль/моль;
давление: паскаль (Па)-ньютон/м².

Десятичные факторы

Число	Название
10 ¹²	тера
10 ⁹	гига
10 ⁶	мега
10 ³	кило
10 ²	гекто
10 ¹	дека
10 ⁻¹	деци
10 ⁻²	санти
10 ⁻³	милли
10 ⁻⁶	микро
10 ⁻⁹	нано
10 ⁻¹²	пико
10 ⁻¹⁵	фемто
10 ⁻¹⁸	атто

Обозначение «в» или «на», например «в секунду», часто выражают в виде отрицательной экспоненты.

Вместо «в секунду» записывают сек⁻¹; на квадратный метр — м⁻², на килограмм — кг⁻¹.

Пример: см/сек = см·сек⁻¹; г/м² = г·м⁻².

Полагая, что система СИ будет в течение ближайших лет принята в США, данные, представленные здесь, выражены как в традиционных единицах, так и в единицах системы СИ (в скобках).

СТАНДАРТНЫЕ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ТРАДИЦИОННОЙ СИСТЕМЕ И СИСТЕМЕ СИ

Альбумин сыворотки или плазмы (см. «Белки сыворотки или плазмы»)

Аминотрансферазы (трансаминазы) сыворотки

Норма (варьирует в зависимости от метода): аспартатная трансаминаза (АСТ) — 6—25 МЕ/л при 30°C; аланиновая трансаминаза (АЛТ) — 3—26 МЕ/л при 30°C.

А. Предосторожности. Избегать гемолиза, быстро отделять сыворотку от сгустка.

Б. Физиологическая основа. Аспартатная аминотрансфераза (АСТ), аланиновая трансаминаза (АЛТ) и лактатдегидрогеназа — это внутриклеточные ферменты, участвующие в обмене аминокислот и углеводов. В высокой концентрации содержатся в мышцах, печени, мозге. Повышение концентрации этих ферментов в крови свидетельствует о некрозе или поражении прежде всего этих тканей.

В. Интерпретация.

1. Повышение показателя имеет место при инфаркте миокарда (особенно АСТ); при остром инфекционном гепатите (АЛТ обычно повышена больше, чем АСТ); циррозе печени (АСТ повышена больше, чем АЛТ); при метастазах в печень или первичной опухоли печени. При поражении опухолевым процессом серозных полостей уровень ферментов повышается в трансудатах. АСТ повышается при мышечной дистрофии, дерматомиозите и пароксизмальной миоглобинурии.

2. Снижение показателя имеет место при недостаточности пиридоксина (витамина В₆), часто в результате повторных процедур гемодиализа; при почечной недостаточности, при беременности.

Аммиак крови

Норма (по методу Конвея): 10—110 мкг% в цельной крови (СИ: 6—65 мкмоль/л).

А. Предосторожности. Не использовать антикоагулянты, содержащие аммиак. В качестве антикоагулянтов следует применять оксалат калия, кальций-двунариевую соль ЭДТА и гепарин, свободный от

аммиака. Определение должно проводиться немедленно после забора крови или в течение часа, если образец хранился на льду.

Б. Физиологическая основа. Аммиак поступает в кровь из двух основных источников: 1) большое количество аммиака освобождается в толстом кишечнике при разложении азотсодержащих веществ гнилостными бактериями; 2) аммиак выделяется в процессе белкового обмена. Поступающий в систему воротной вены или в общий кровоток аммиак быстро превращается в печени в мочевины. Печеночная недостаточность может приводить к повышению аммиака в крови, особенно если она сопровождается высоким потреблением белка или кишечным кровотечением.

В. Интерпретация. Аммиак повышается в крови при печеночной недостаточности или при шунтировании кровотока в печени вследствие портакавального анастомоза, особенно на фоне высокого содержания белка в пище или при кишечном кровотечении.

Амилаза сыворотки

Норма (варьирует в разных методах): 80—180 Ед Сомоди на 100 мл сыворотки (одна такая единица соответствует количеству фермента, которое образует 1 мг редуцирующего сахара из крахмала при pH 7,2); 0,8—3,2 МЕ/л.

А. Предосторожности. При необходимости хранения более 1 ч кровь и сыворотку замораживают.

Б. Физиологическая основа. В норме амилаза (диастаза) (мол. масса около 50 000) присутствует в крови в небольших количествах; она образуется в поджелудочной и слюнных железах. Воспаление этих желез или закупорка их протоков приводит к поступлению в кровь больших количеств фермента и к повышенной экскреции его почками.

В. Интерпретация.

1. Повышение показателя имеет место при остром панкреатите, кисте поджелудочной железы, при закупорке протока поджелудочной железы (опухолью, камнем, спайками, вследствие спазма сфинктера после введения морфия), при эпидемическом паротите. Кроме того, в некоторых случаях повышение уровня амилазы может быть следствием почечной недостаточности, диабетического ацидоза, воспаления поджелудочной железы на фоне перфорации пептической язвы. Одной из редких причин повышения уровня амилазы является образование комплексов амилазы с иммуноглобулинами (макроамилаземия), которые из-за высокой молекулярной массы не фильтруются в клубочках.

2. Снижение показателя имеет место при остром и хроническом гепатите, недостаточности поджелудочной железы, иногда при токсикозе беременности.

Амилаза мочи

Норма (варьирует в разных методах): 40—250 Ед Сомоди/ч.

А. Предосторожности. Если определение откладывается более, чем на 1 ч после забора образца, моча должна быть заморожена.

Б. Физиологическая основа (см. «Амилаза сыворотки»). При адекватной работе почек амилаза быстро выделяется с мочой. При определении скорости экскреции мочу собирают за 2, 6 или 24 ч.

В. Интерпретация. Повышение амилазы в моче происходит параллельно повышению ее в крови. Однако после того, как показатель амилазы крови после приступа панкреатита вернется к норме, в моче он будет оставаться повышенным до 7 дней. Поэтому определение в моче может быть полезно, если обследование пациента проводится уже после приступа. Повышение амилазы сыворотки при нормальной или пониженной экскреции ее с мочой встречается при почечной недостаточности или при макроамилаземии.

Бикарбонаты сыворотки или плазмы

Норма: 24—28 мэкв/л (СИ: 24—28 ммоль/л).

А. Предосторожности. Плазма или сыворотка должны быть отделены от клеток крови и храниться в замороженном состоянии в закрытых пробирках.

Б. Физиологическая основа. Бикарбонатный буфер — одна из важнейших систем, обеспечивающих нормальный pH жидкостей тела. Определение бикарбонатов и pH в артериальной крови — главные показатели при оценке кислотно-щелочного баланса.

В. Интерпретация.

1. Повышение показателя имеет место при а) метаболическом алкалозе (pH артериальной крови повышен), обусловленном приемом больших количеств бикарбоната натрия, упорной рвотой с выбросом кислого содержимого желудка, а также дефицитом калия;

б) дыхательном ацидозе (pH артериальной крови снижен) вследствие неадекватного выведения CO_2 (приводящего к повышению P_{CO_2}) при эмфиземе легких, уменьшении диффузии при поражении альвеолярной мембраны, при сердечной недостаточности, сопровождающейся легочным застоем или отеком легких, при нарушении вентиляции легких любой этиологии, включая передозировку седативных препаратов, наркотиков, или при неадекватной искусственной вентиляции легких.

2. Снижение показателя имеет место при

а) метаболическом ацидозе (pH артериальной крови снижен) вследствие диабетического кетоацидоза, молочнокислого ацидоза, голодания, упорного поноса, почечной недостаточности, интоксикации салицилатами;

б) респираторном алкалозе (рН артериальной крови повышен) вследствие гипервентиляции (снижено P_{CO_2}).

Билирубин сыворотки

Норма: общий 0,2—1,2 мг% (СИ: 3,5—19 мкмоль/л). Прямой (глюкуронид) — 0,1—0,4 мг%. Непрямой (несвязанный) — 0,2—0,7 мг% (СИ: прямой до 7 мкмоль/л, непрямой до 12 мкмоль/л).

А. Предосторожности. Необходимо брать кровь натощак во избежание мутности сыворотки. Для стабильности сыворотки ее образцы должны храниться в замороженном виде в темноте.

Б. Физиологическая основа. При распаде гемоглобина образуется билирубин. В печени он связывается с глюкуронатом и в виде диглюкуронида экскретируется с желчью. Билирубин накапливается в плазме при печеночной недостаточности, закупорке желчевыводящих путей, при повышенном распаде гемоглобина. Изменение концентрации может быть связано также с дефектом ферментных систем, участвующих в метаболизме билирубина (например, при отсутствии глюкуронилтрансферазы).

В. Интерпретация.

1. Прямой и непрямой билирубин сыворотки повышены при остром или хроническом гепатите, закупорке желчевыводящих путей (на уровне желчных протоков или общего желчного протока), при токсической реакции на многие лекарственные препараты, химические вещества, токсины, при синдромах Дабин — Джонсона и Ротора.

2. Непрямой билирубин сыворотки повышен при гемолитических анемиях, других гемолитических реакциях, при отсутствии или дефиците глюкуронилтрансферазы (например, при синдромах Жильбера и Криглера — Наджара).

3. Прямой и общий билирубин могут быть значительно **повышены** у здоровых людей после 24—48 ч голодания (иногда даже после 12 ч), при длительной низкокалорийной диете.

Кальций сыворотки

Норма: общий—8,5—10,3 мг% или 4,2—5,2 мэкв/л; ионизированный — 4,2—5,2 мг% или 2,1—2,6 мэкв/л (СИ: общий—2,1—2,6 ммоль/л; ионизированный—1,05—1,3 ммоль/л).

А. Предосторожности. Посуда, используемая для анализа, должна быть такой, чтобы из нее в пробу не попадал кальций. Забор пробы необходимо производить натощак. Сыворотку следует быстро отделять от сгустка.

Б. Физиологическая основа. На содержание кальция в плазме и других жидкостях организма влияют питание, состояние эндокринной системы, почек, желудочно-кишечного тракта. Для интерпретации резу-

льтатов необходимо также определять концентрацию альбумина в плазме, так как часть кальция находится в связанном с белками плазмы состоянии.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при гиперпаратиреозе, секреции паратиреоидоподобного гормона злокачественными опухолями, гипервитаминозе D, молочно-щелочном синдроме, остеолитических процессах, например при множественной миеломе, метастазах опухоли в кости, болезни Паже, болезни Бекка, при иммобилизации и семейной гипокальциурии. Иногда повышение наблюдается при гипертиреозе и при приеме лекарственных препаратов из группы тиазидов.

2. Снижение показателя имеет место при гипопаратиреозе, дефиците витамина D (рахит, остеомалация), почечной недостаточности, гипопроteinемии, синдроме малабсорбции (илеите, недостаточности поджелудочной железы), тяжелом панкреатите с панкреонекрозом и при псевдогипопаратиреозе.

Кальций мочи (суточная экскреция)

Обычно экскреция кальция с мочой составляет 50—150 мг за 24 ч в зависимости от потребления (СИ: 1,2—3,7 ммоль/24ч).

А. Предосторожности. В течение трех дней перед исследованием пациент не должен есть молоко и сыр; при количественном определении назначается трехдневная диета, содержащая около 150 мг кальция в день. Для количественной оценки экскреции кальция мочу необходимо собирать точно за 24 ч.

Б. Интерпретация. При «количественной» диете экскреция кальция в норме составляет 125 ± 50 мг (3,1 ммоль/л) за 24 ч. При гиперпаратиреозе экскреция кальция обычно превышает 200 мг/24 ч (5 ммоль). Экскреция с мочой повышается практически всегда, когда концентрация в сыворотке повышена.

Церулоплазмин и медь в сыворотке

Норма: церулоплазмин—25—43 мг% (СИ: 1,7—2,9 мкмоль/л); медь—100—200 мг% (СИ: 16—31 мкмоль/л).

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Около 5% меди сыворотки непрочно связано с альбумином, 95% — с церулоплазмином, окислительным ферментом, являющимся α_2 -глобулином голубого цвета. При болезни Вильсона содержание меди и церулоплазмينا в сыворотке снижено, а концентрация меди в моче высокая.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при беременности, гипертиреозе, инфекции, апластической анемии, остром лейкозе, лимфогрануломатозе, циррозе печени, при применении оральных контрацептивов.

2. Снижение показателя имеет место при болезни Вильсона (в сочетании с повышенной экскрецией меди с мочой), малабсорбции, нефрозе, при дефиците меди, возникающем при парентеральном питании.

Хлориды в сыворотке и плазме

Норма: 96—106 мэкв/л (СИ: 96—106 ммоль/л).

А. Предосторожности. Определение этого показателя в цельной крови дает заниженные результаты по сравнению с плазмой или сывороткой; для анализа следует использовать только плазму или сыворотку.

Б. Физиологическая основа. Хлорид — важный неорганический анион внеклеточной жидкости. Он играет существенную роль в поддержании кислотно-щелочного равновесия, хотя сам не проявляет буферного действия. При потере хлоридов в виде HCl или NH_4Cl развивается алкалоз; при потреблении хлоридов — ацидоз. Хлориды (с натрием) играют важную роль в регуляции осмолярности жидкостей организма.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при почечной недостаточности (когда потребление хлоридов превышает экскрецию), нефрозе (иногда), почечном канальцевом ацидозе, гиперпаратиреозе (иногда), уретросигмоидном анастомозе (реабсорбция из мочи в кишечнике), дегидратации (дефиците воды), при передозировке солевых растворов.

2. Снижение показателя имеет место при желудочно-кишечных заболеваниях, сопровождающихся потерей содержимого желудка или кишечника (рвота, понос, нарушение желудочно-кишечного всасывания), почечной недостаточности (с потерей солей), передозировке мочегонных, хроническом дыхательном ацидозе (эмфизема), диабетическом ацидозе, повышенной потливости, адреналовой недостаточности (теряется NaCl), гиперадrenокортицизме (хроническая потеря K^+), метаболическом алкалозе (потребление NaHCO_3 , дефицит K^+).

Хлориды в моче

Содержание хлоридов в моче варьирует в зависимости от диеты, кислотно-щелочного баланса, состояния эндокринной системы, запаса в организме других электролитов и водного баланса. Эти взаимосвязи столь разнообразны и сложны, что определение хлоридов в моче имеет небольшое клиническое значение.

Холестерол в сыворотке или плазме

Норма: 150—280 мг% (СИ: 3,9—7,2 ммоль/л). (См. табл. П.1.)

А. Предосторожности. Исследование проводить только натощак.

Таблица П.1. Липидемия. Концентрации содержащихся в сыворотке холестерина (х) триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП-Х). (Reproduced, with permission, from Krupp M. A. et al. Physician's Handbook, 21st ed. Lange, 1985.)

Возраст	Х (мг%)	ТГ (мг%)	ЛПНП-Х (мг%) Верхний предел	ЛПВП-Х (мг%)
< 29	120—240	10—140	170	Мужчины Женщины
30—39	140—270	10—150	190	45 ± 12 55 ± 12
40—49	150—310	10—160	190	
> 49	160—330	10—190	210	

Б. Физиологическая основа. Концентрация холестерина зависит от его метаболизма, на который влияют наследственность, питание, эндокринные железы и состояние внутренних органов (печень, почки). Метаболизм холестерина тесно связан с метаболизмом липидов.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при семейной гиперхолестеролемии (ксантоматозе), гипотиреозе, декомпенсированном сахарном диабете, нефротическом синдроме, хроническом гепатите, билиарном циррозе, механической желтухе, гипопротеинемии (идиопатической, на фоне нефроза или хронического гепатита), при липидемии (идиопатической, семейной).

2. Снижение показателя имеет место при остром гепатите и болезни Гоше. В некоторых случаях понижение концентрации холестерина наблюдается при гипертиреозе, острых инфекциях, анемии, недоедании и дефиците аполипопротеинов.

Креатинфосфокиназа (КФК) сыворотки

Норма: (варьирует в зависимости от метода) 10—50 МЕ/л при 30°C.

А. Предосторожности. Фермент нестабилен, содержащее эритроцитов ингибирует активность фермента. Сыворотка должна быть быстро отделена от сгустка. Если исследование не может быть произведено немедленно, сыворотку необходимо заморозить.

Б. Физиологическая основа. КФК расщепляет креатинфосфат (при участии ADP) с образованием креатина и АТФ. КФК много в скелетной и сердечной мышцах, в мозге.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при мышечных повреждениях (инфаркт миокарда, травма мышц), при мышечной дистрофии, полимиозите, сильном мышечном напряжении (беге), гипотиреозе, инсульте. После инфаркта миокарда КФК повышается быстро (за 3—5 ч) и сохраняется повышенной 2—3 дня (т. е. более короткий период, чем АСТ или ЛДГ).

2. Показатель не повышается при инфаркте легкого или поражении паренхимы печени.

Изоферменты креатинфосфокиназы в сыворотке (см. табл. П.2)

А. Предосторожности. Такие же, как в случае исследования КФК (см. выше).

Б. Физиологическая основа. КФК представлена тремя изоферментами, разделяющимися при электрофорезе. Для скелетной мышцы характерен изофермент ММ, для миокарда — МВ, для мозга — ВВ.

Таблица П.2. Изоферменты креатинкиназы

Изоферменты		Нормальный уровень (% от общего)
Наиболее быстрый	Фракция 1, ВВ	0
Наиболее медленный	Фракция 2, МВ	0—3
	Фракция 3, ММ	97—100

В. Интерпретация. Содержание КФК-ММ повышается в сыворотке при повреждении скелетных мышц, мышцы сердца, мозга; при заболеваниях мышц (дистрофия, гипотиреоз, дерматомиозит, полимиозит); при рабдомиолизе, после тяжелой физической нагрузки. Содержание КФК-МВ повышается сразу после инфаркта миокарда (в течение 2—4 ч) и сохраняется повышенным до 72 ч (более длительно высокий уровень сохраняется при распространении инфаркта миокарда или при новом инфаркте) при выраженном рабдомиолизе или мышечном повреждении, тяжелом поражении мышц, синдроме Рейе, при пятнистой лихорадке Скалистых гор. Уровень КФК-ВВ иногда повышается при тяжелом шоке, при некоторых карциномах (особенно при овсяноклеточной карциноме, а также карциноме яичников, молочной железы или простаты) или при атрезии желчных протоков.

Креатин мочи (24 ч)

Норма: см. табл. П.3.

А. Предосторожности. Моча должна быть собрана точно за 24 ч. Образец замораживают или хранят с 10 мл толуола или с 10 мл 5%-ного раствора тимолола в хлороформе.

Б. Физиологическая основа. Креатин — важный компонент мышц, мозга, крови; в форме креатинфосфата он служит высокоэнергетическим фосфатом. В норме небольшие количества креатина экскрети-

Таблица П.3. Креатин и креатинин в моче. Нормальные значения (24 ч)

	Креатин	Креатинин
Новорожденные	4,5 мг/кг	10 мг/кг
1—7 месяцев	8,1 мг/кг	12,8 мг/кг
2—3 года	7,9 мг/кг	12,1 мг/кг
4—4,5 года	4,5 мг/кг	14,6 мг/кг
9—9,5 лет	2,5 мг/кг	18,1 мг/кг
11—14 лет	2,7 мг/кг	20,1 мг/кг
Взрослые мужчины	0—50 мг	25 мг/кг
Взрослые женщины	0—100 мг	21 мг/кг

руются мочой, уровень экскреции повышается при усилении катаболизма и при мышечной дистрофии.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при мышечных дистрофиях (прогрессирующая мышечная дистрофия, атрофическая миотония, миастения гравис), мышечной гипотрофии (острый полиомиелит, боковой амиотрофический склероз, миозит, проявляющийся в гипотрофии мышц), при голодании и кахексии, гипертиреозе и лихорадочных состояниях.

2. Снижение показателя имеет место при гипотиреозе, врожденной амиотонии, почечной недостаточности.

Креатинин в сыворотке или плазме

Норма: 0,7—1,5 мг% (СИ: 60—132 мкмоль/л).

А. Предосторожности. Отсутствуют.

Б. Физиологическая основа. Эндогенный креатинин экскретируется путем фильтрации в клубочках и путем секреции в канальцах; в результате его клиренс выше, чем у инулина примерно на 20%. Реакция Яффе определяет все хромогены плазмы, а не только креатинин. Поскольку хромогены в моче не переходят, при определении креатинина в моче получают величину на 20% меньше суммарного количества креатинина + хромогена в плазме; это различие однако, компенсируется количеством креатинина, секретируемого в канальцах. Таким образом, клиренс креатинина — общепринятый метод оценки клубочковой фильтрации, кроме случаев прогрессирующей почечной недостаточности, при которой клиренс креатинина превышает клиренс инулина благодаря секреции креатинина оставшимися почечными канальцами.

В. Интерпретация. Повышение показателя имеет место при острой или хронической почечной недостаточности, закупорке мочевыводящих путей и нарушении функции почек, вызванном некоторыми лекарственными препаратами. Кроме креатинина, другие вещества могут реагировать с пикриновой кислотой в щелочной среде (реакция Яффе), давая ложно завышенные результаты: ацетоацетат, аце-

тон, β -оксибутират, α -кетоглутарат, пируват, глюкоза, билирубин, гемоглобин, мочевины и мочевая кислота. Значения показателя ниже 0,7 мг% пока не получили объяснения.

Креатинин мочи

Норма: См. табл. П. 3.

Глюкоза сыворотки или плазмы

Норма: натощак «истинная» глюкоза—65—110 мг% (СИ: 3,5—6,1 ммоль/л).

А. Предосторожности. Если исследование откладывается более чем на час, в пробу следует добавить фторид натрия (3 мг/мл крови). Фильтраты могут храниться в замороженном состоянии до 24 ч. Ошибки в интерпретации возникают, если перед забором крови пациент ел сладкое или ему парентерально вводили раствор глюкозы, при этом анализ оценивали, как взятый натощак.

Б. Физиологическая основа. В норме концентрация глюкозы во внеклеточной жидкости строго регулируется так, чтобы она как источник энергии была доступна тканям, но при этом не экскретировалась с мочой. Неспецифические симптомы нарушения метаболизма глюкозы—гипогликемия и гипергликемия.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при диабете, гипертиреозе, адренокортицизме (гиперфункции коры надпочечников), гиперпитuitarизме, иногда при заболеваниях печени.

2. Снижение показателя имеет место при гиперинсулинизме, недостаточности функции надпочечников, гипопитuitarизме, при печеночной недостаточности (иногда), функциональной гипогликемии и при приеме гипогликемических препаратов.

γ -Глутамилтранспептидаза, или трансфераза, сыворотки

Норма: мужчины—менее 30 МЕД/мл при 30° С, женщины—25 МЕД/мл при 30° С, подростки—50 МЕД/мл при 30° С.

А. Предосторожности. Следует избегать гемолиза.

Б. Физиологическая основа. γ -Глутамилтрансфераза (ГГТ)—высокочувствительный индикатор при заболеваниях печени. Уровень ее часто повышен, когда трансаминазы и щелочная фосфатаза в норме. Для диагностики алкогольного нарушения функции печени уровень ГГТ—показатель более специфичный, чем уровень двух указанных ферментов. ГГТ находится в печени, почках, поджелудочной железе, она переносит глутаминовую кислоту от глутатиона или другого γ -глутамилпептида на акцепторный пептид или на L-аминокислоты; фермент индуцируется алкоголем.

В. Интерпретация. Повышение показателя имеет место при остром инфекционном или токсическом гепатите, хроническом или подостром гепатите, циррозе печени, внутриспеченочной или внепеченочной закупорке желчных путей, первичном или метастатическом опухолевом поражении печени, при алкогольном поражении печени. Иногда повышение наблюдается при застойной сердечной недостаточности, редко—после инфаркта миокарда, при панкреатитах, опухоли поджелудочной железы.

Железо в сыворотке

Норма: 50—175 мкг% (СИ: 9—31,3 мкмоль/л).

А. Предосторожности. Шприцы и иглы не должны отдавать железо в раствор. Следует избегать гемолиза. Сыворотка не должна содержать гемоглобин.

Б. Физиологическая основа. Исследовать кровь на железо необходимо натощак, поскольку имеются суточные колебания его уровня с максимальными значениями по утрам. Уровень железа в плазме определяется рядом факторов, в том числе всасыванием в кишечнике, накоплением в кишечнике, печени, селезенке, костном мозге, разрушением и потерей гемоглобина, синтезом нового гемоглобина.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при гемохроматозе, гемосидерозе (вследствие множественных трансфузий, передозировки препаратов железа), при гемолитических болезнях, пернициозной анемии, гипопластической анемии. Часто повышение встречается при вирусном гепатите. Ложное повышение может отмечаться в тех случаях, когда больной в течение 2-3 месяцев перед исследованием получал парентерально препараты железа.

2. Снижение показателя имеет место при дефиците железа, инфекциях, нефрозе, хронической почечной недостаточности; в период активного гемопоэза.

Железо-связывающая активность сыворотки

Норма: общая—250—410 мкг% (СИ: 45—76 мкмоль/л), процент насыщения—20—55%.

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Железо транспортируется в виде комплекса с металлосвязывающим глобулином—трансферрином (сидерофилином). Обычно этот белок переносит такое количество железа, которое соответствует 30—40%-ной связывающей способности белка.

В. Интерпретация показателя общей железо-связывающей активности сыворотки.

1. Повышение показателя имеет место при железодефицитной анемии, при приеме оральных контрацеп-

тивов, в поздние сроки беременности, у детей, иногда при гепатитах.

2. Снижение показателя имеет место при снижении содержания белков плазмы (нефроз, голодание, рак), при хронических инфекциях, гемосидерозе (вследствие трансфузии, талассемии).

Г. Интерпретация показателя насыщения трансферрина

1. Повышение показателя имеет место при избытке железа (отравление железом, гемолитические заболевания, талассемия, гемохроматоз, дефицит пиридоксина, нефроз, иногда гепатит).

2. Снижение показателя имеет место при дефиците железа, хронических инфекциях, раке, в поздние сроки беременности.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) в сыворотке, серозных жидкостях, спинномозговой жидкости, моче

Норма (варьирует в разных методах): сыворотка—55—140 МЕ/л, 30° С. В серозных жидкостях ниже, чем в сыворотке. В спинномозговой жидкости 15—75 ед (по Вроблевски); 6,3—30 МЕ/л. В моче—менее 8300 ед/8 ч (по Вроблевски).

А. Предосторожности. Гемолиз должен быть полностью исключен, так как уровень ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке. Активность фермента могут подавлять гепарин и оксалат. Следует быстро отделять сгусток от сыворотки.

Б. Физиологическая основа. ЛДГ катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную в присутствии NADH. ЛДГ обнаруживается во всех клетках и жидкостях.

В. Интерпретация. Повышение показателя имеет место при некрозе тканей, особенно при остром повреждении сердца, повреждении эритроцитов, почек, скелетных мышц, печени, легких и кожи. Значительное повышение сопровождается гемолитическими анемиями, связанные с дефицитом витамина B₁₂ и фолиевой кислоты, а также эритремию. Медленное повышение в течение 3—4 дней с последующим снижением за 5—7 дней может свидетельствовать об инфаркте миокарда (необходимо, однако, исключить инфаркт легкого, опухоль, мегалобластическую анемию). Повышение уровня ЛДГ характерно для острой фазы инфекционного гепатита, между тем при хронических заболеваниях печени активность фермента редко оказывается повышенной.

Изоферменты лактатдегидрогеназы в сыворотке

Норма: см. табл. П.4.

А. Предосторожности. Как для ЛДГ (см. выше).

Б. Физиологическая основа. Существует 5 изоферментов ЛДГ, каждый из которых является тетраме-

Таблица П.4. Изоферменты лактатдегидрогеназы

Изоферменты	% общего количества (диапазон)
Наиболее быстрый 1 (α_1)	28 (15 - 30)
2 (α_2)	36 (22 - 50)
3 (β)	23 (15 - 30)
4 (γ_1)	6 (0 - 15)
Наиболее медленный 5 (γ_2)	6 (0 - 15)

ром, образованным субъединицами двух типов Н и М. Количество изоферментов можно определить с помощью кинетических, электрофоретических, иммунологических методов или путем хроматографии. При электрофоретическом разделении подвижность изоферментов соответствует сывороточным белкам α_1 , α_2 , β , γ_1 и γ_2 , и они нумеруются как 1 (наиболее быстро движется), 2, 3, 4 и 5 (наиболее медленно движется). Изофермент 1 присутствует в высокой концентрации в мышце сердца (тетрамер НННН), а также в эритроцитах и в корковом веществе почек; изофермент 5— в скелетной мышце (тетрамер ММММ) и в печени.

В. Интерпретация. При инфаркте миокарда повышается содержание α -изоферментов, особенно ЛДГ 1; это увеличивает отношение ЛДГ 1/ЛДГ 2 (оно становится больше 1). Подобное увеличение встречается при инфаркте коркового вещества почек и при гемолитической анемии.

Относительное повышение ЛДГ 4 и 5 имеет место при остром гепатите, тяжелом мышечном повреждении, дерматомиозите, мышечной дистрофии.

Липаза сыворотки

Норма: 0,2—0,5 ед.

А. Предосторожности. Нет. Перед исследованием образец может храниться замороженным почти сутки.

Б. Физиологическая основа. Содержание этого фермента, расщепляющего жиры, в циркулирующей крови низкое. При панкреатитах липаза поджелудочной железы попадает в кровяное русло, высокая концентрация липазы в крови сохраняется дольше, чем повышенная концентрация амилазы.

В. Интерпретация. Липаза сыворотки повышена при остром или обострившемся хроническом панкреатите и при закупорке протока поджелудочной железы камнем или опухолью.

Магний сыворотки

Норма: 1,8—3 мг% или 1,5—2,5 мэкв/л (СИ: 0,75-1,25 ммоль/л).

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Магний является преимущественно внутриклеточным электролитом. Внеклеточно он способствует нервно-мышечному возбу-

ждению. Дефицит магния может наблюдаться при его нормальном или слегка сниженном содержании во внеклеточных жидкостях. Низкий уровень магния в плазме приводит к тетании, слабости, сонливости, дезориентации.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при почечной недостаточности и при передозировке растворов магния.

2. Снижение показателя имеет место при хронической диарее, острой потере кишечной жидкости, голодании, хроническом алкоголизме, хроническом гепатите, печеночной недостаточности, повышенном мочеотделении (диуретики), неадекватном парентеральном питании. Недостаток магния может наблюдаться при гипокальциемии и, более того, может поддерживать ее у пациентов с гипопаратиреозом.

Кислая фосфатаза сыворотки

Норма (варьирует в зависимости от метода): 0,1—0,63 ед Сигма.

А. Предосторожности. Не брать кровь для исследования в течение 24 ч после массажа простаты или её инструментального исследования. Исследование необходимо выполнять быстро, так как активность фермента быстро падает. Избегать гемолиза. Для иммунологических исследований сыворотку можно хранить замороженной до 3—4 дней.

Б. Физиологическая основа. Фосфатаза, активная при рН 4,9, присутствует в высокой концентрации в предстательной железе, эритроцитах, тромбоцитах, клетках ретикулоэндотелиальной системы, печени, селезенке и в почках. Обнаружено несколько изоферментных форм, отличающихся по активности к различным субстратам.

В. Интерпретация. При карциноме простаты в сыворотке повышается «простатическая фракция» кислой фосфатазы, особенно, если опухоль вышла за пределы капсулы или дала метастазы. Пальпация простаты приводит к временному повышению показателя. Активность кислой фосфатазы может быть повышена при болезни Гоше, злокачественном поражении костей, болезнях почек, заболеваниях гепатобилиарной системы, ретикулоэндотелиальной системы, тромбозах. Лихорадочное состояние может привести к ложному повышению показателя.

Щелочная фосфатаза сыворотки

Норма (варьирует в разных методах): метод Бесси-Лоури—у детей: 2,8—6,7 ед; у взрослых—0,8—2,3 ед; метод Кинга-Армстронга—у взрослых: 5—13 ед. 24—71 МЕ/л при 30° С.

А. Предосторожности. Сыворотку можно хранить в холодильнике не более 48 ч, но значения могут слегка повышаться (до 10%). В размороженном со-

стоянии активность падает. Не использовать фтористые соединения и оксалат.

Б. Физиологическая основа. Щелочная фосфатаза присутствует в высокой концентрации в растущих костях, в желчи и в плаценте. В сыворотке щелочная фосфатаза содержится в виде смеси изоферментов, полностью еще неидентифицированных. Изоферменты могут быть разделены электрофорезом; печеночная щелочная фосфатаза мигрирует быстрее, чем ферменты костей и плаценты, которые движутся вместе.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место:

- а) у детей (нормальный рост костей);
- б) при костных заболеваниях, связанных с увеличением количества остеобластов,—гиперпаратиреозе, рахите, остеомалиции, опухолях костей (остеосаркома, метастазы опухоли), оссификации, как при оссифицирующем миозите, болезни Педжета (деформирующий остеоит), при саркоидозе Бека;
- в) при закупорке желчных протоков (внутри- и внепеченочных) камнем, спайками, опухолью;
- г) при заболеваниях печени, вызванных лекарствами, такими, как хлорпромазин или метилтестостерон;
- д) при беременности.

2. Снижение показателя имеет место при гипотиреозе и при замедленном росте у детей.

Неорганический фосфор сыворотки

Норма: дети—4—7 мг% (СИ: 1,3—2,3 ммоль/л); взрослые—3—4,5 мг% (СИ: 1—1,5 ммоль/л).

А. Предосторожности. Посуду, мытую с помощью моющих средств, содержащих фосфат, следует тщательно ополаскивать. Кровь необходимо брать натощак, чтобы исключить послеобеденное снижение фосфата, связанное с транспортом и метаболизмом глюкозы.

Б. Физиологическая основа. На концентрацию неорганического фосфата в циркулирующей плазме влияют функция паращитовидных желез, витамин D, всасывание в кишечнике, функция почек, метаболизм костной ткани и питание.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при почечной недостаточности, гипопаратиреозе и гипервитаминозе D.

2. Снижение показателя имеет место при гиперпаратиреозе, гиповитаминозе D (рахит, остеомалиция), синдроме малабсорбции (стеаторея), приеме антацидов, которые связывают фосфаты в кишечнике, голодании или кахексии, хроническом алкоголизме (особенно при поражении печени), передозировке растворов, бедных фосфатами, введении углеводов (особенно внутривенно), нарушении функции почечных канальцев, использовании мочегонных группы

тиазида, нарушениях кислотно-щелочного равновесия, диабетическом кетоацидозе (особенно, при выздоровлении) и наследственной гипофосфатемии; иногда при беременности и гипотиреозе.

Калий сыворотки или плазмы

Норма: 3,5—5 мэкв/л (СИ: 3,5—5 ммоль/л).

А. Предосторожности. Следует избегать гемолиза, при котором высвобождается K^+ эритроцитов; необходимо быстро отделять сыворотку от сгустка или плазму от эритроцитов, чтобы избежать диффузии калия из эритроцитов. Тромбоциты и лейкоциты богаты калием, и если этих клеток много (при тромбоцитозе или лейкозе), то за счет калия, освобождающегося из них при свертывании крови, будет повышаться его концентрация в сыворотке. Чтобы избежать возможных ошибок, лучше использовать плазму гепаринизированной крови.

Б. Физиологическая основа. Концентрация калия в плазме регулирует нервно-мышечное и мышечное возбуждение. Повышение или снижение концентрации калия нарушает способность мышечной ткани к сокращению.

В. Интерпретация (см. выше «Предосторожности»).

1. Повышение показателя имеет место при почечной недостаточности (особенно, при повышенном уровне белкового или клеточного распада), недостаточности функции надпочечников (особенно при гипопальдостеронизме), гипоренинемическом гипопальдостеронизме, при применении верошпирона, слишком быстром введении солевых растворов (особенно внутривенно), при применении триамтерена и фенформина.

2. Снижение показателя имеет место:

- а) при неадекватном питании (голодании);
- б) при неадекватном всасывании или острой потере кишечной жидкости (рвота, понос, синдром малабсорбции), при использовании полистирольной сульфонирующей смолы;
- в) при повышенной потере через почки — вторично, при гипернадпочечниковом синдроме (особенно гиперальдостеронизме) и при кортикостероидной терапии; метаболическом алкалозе; использовании таких диуретиков, как хлортиазид и его производные, ртутных диуретиков, при дефектах почечных канальцев (синдром Тони—Фанкони) и почечном канальцевом ацидозе; лечении антибиотиками, выводящимися в виде анионов (карбенициллин, тикарциллин); при использовании фенотиазинов, амфотерицина В; препаратов с высоким содержанием натрия, деградированного тетрациклина;
- г) при аномальном распределении калия между внутриклеточной и внеклеточной жидкостью — наследственном периодическом параличе и при применении тестостерона.

Белки сыворотки или плазмы (в том числе, фибриноген)

Норма: см. «Интерпретация»

А. Предосторожности. Нельзя использовать сыворотку или плазму со следами гемолиза. Поскольку фибриноген удаляется при свертывании крови, определение его в сыворотке невозможно.

Б. Физиологическая основа. Концентрация белка определяет коллоидно-осмотическое давление плазмы. На концентрацию белка в плазме влияют питание, функция почек и печени, ряд заболеваний (множественная миелома), метаболические нарушения. Изменения в соотношении белковых фракций могут свидетельствовать об определенных заболеваниях.

В. Интерпретация

1. Общий белок сыворотки. Норма: 6—8 г%. (СИ: 60—80 г/л). См. ниже «Альбумин и фракции глобулинов» и табл. П.5.

Таблица П.5. Фракции белков, определяемые при электрофорезе

	% от общего белка
Альбумин	52—68
α_1 -глобулин	2,4—4,4
α_2 -глобулин	6,1—10,1
β -глобулин	8,5—14,5
γ -глобулин	10—21

2. Альбумин сыворотки или плазмы. Норма: 3,5—5,5 г% (СИ: 33—55 г/л):

а) повышение показателя имеет место при дегидратации, шоке, гемоконцентрации, внутривенном введении больших количеств концентрированных «растворов» альбумина;

б) снижение показателя имеет место при недоедании, синдроме малабсорбции, остром и хроническом гломерулонефрите, нефрозе, острой и хронической печеночной недостаточности, опухолях, лейкозах.

3. Глобулин сыворотки или плазмы. Норма: 2—3,6 г% (СИ: 20—36 г/л) (см. табл. П.6 и П.7):

а) повышение показателя имеет место при болезнях печени, инфекционном гепатите, циррозе печени, билиарном циррозе, гемохроматозе, системной красной волчанке, плазмноклеточной миеломе, лимфо-пролиферативных заболеваниях, саркоидозе, острых и хронических инфекциях; особенно при лимфогра-

Таблица П.6. Фракции гаммаглобулинов, определяемые при иммуноэлектрофорезе

IgA	90—450 мг%
IgG	700—1500 мг%
IgM	40—250 мг%
IgD	0,3—40 мг%
IgE	0,006—0,16 мг%

Таблица П.7. Некоторые белки глобулиновой фракции

Глобулин	Некоторые белки, входящие в состав фракции
α_1	Тироксин-связывающий глобулин Транскортин Гликопротеин Липопротеин Антитрипсин
α_2	Гаптоглобин Гликопротеин Макроглобулин Церулоплазмин
β	Трансферрин Липопротеин Гликопротеин
γ	$\gamma^{G\gamma^D}$ $\gamma^{M\gamma^E}$ γ^A

нуле, обусловленной венерическим заболеванием, тифе, лейшманиозе, шистоматозе, малярии;

б) снижение показателя имеет место при недостаточном питании, врожденной агаммаглобулинемии, приобретенной гипогаммаглобулинемии, лимфолейкозе.

4. Фибриноген плазмы. Норма: 0,2—0,6 г% (СИ: 2—6 г/л):

а) повышение показателя имеет место при гломерулонефрите, нефрозе (иногда), инфекциях;

б) снижение показателя имеет место при диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови (случаи беременности с отслойкой плаценты, эмболии околоплодными водами, стремительных родов), при менингококковом менингите, раке простаты с метастазами, лейкозах, при острой и хронической печеночной недостаточности, врожденной фибриногенопии.

Натрий сыворотки или плазмы

Норма: 136—145 мэкв/л (СИ: 136—145 ммоль/л).

А. Предосторожности. Следует тщательно мыть лабораторную посуду.

Б. Физиологическая основа. На долю натрия приходится около 140 из 155 мэкв катионов плазмы. Вместе с ассоциированными с ним анионами он является основным осмотически активным компонентом плазмы, существенно влияющим на распределение воды в организме. Перемещение натрия в клетки или потеря натрия организмом приводит к снижению объема внеклеточной жидкости, влияя на кровообращение, функцию почек и нервной системы.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при дегидратации (дефицит воды), травмах или заболеваниях нервной системы, гипердренокортицизме с гиперальдостеронизмом или при избытке кортикостероидов.

2. Снижение показателя имеет место при недостаточности функции надпочечников, почечной недостаточности, особенно в сочетании с неадекватным потреблением натрия; при почечном канальцевом ацидозе; при физиологическом ответе на травму или ожог (перемещение натрия в клетки); при потерях через желудочно-кишечный тракт или при острой и хронической диарее, при кишечной непроходимости или фистуле; при необычной потливости с неадекватной компенсацией утраты натрия. У ряда пациентов с отеками, связанными с сердечными или почечными заболеваниями, концентрация натрия в сыворотке низкая, хотя общее содержание натрия в организме выше, чем в норме. К этой парадоксальной ситуации приводят задержка воды (повышение антидиуретического гормона, АДГ) и аномальное перераспределение натрия между внутриклеточной и внеклеточной жидкостью. Гипергликемия приводит иногда к перемещению жидкости из внутриклеточного во внеклеточное пространство, вызывая гипонатриею из-за разведения. Артефакт: при измерении на плазменном фотометре натрий сыворотки или плазмы окажется заниженным при наличии гиперлипидемии или гиперглобулинемии; при этих нарушениях объем, обычно занятый водой, занят другими веществами; в сыворотке и плазме будут, следовательно, «занижены» показатели воды и электролитов. При гипергликемии концентрация натрия в сыворотке будет снижаться на 1,6 мэкв/л на каждые 100 мг% глюкозы (при ее общей концентрации, превышающей 200 мг%) из-за перемещения воды во внеклеточное пространство.

Тироксин (T_4), общий T_4 сыворотки

Норма: радиоиммунологическое определение — 5—12 мкг% (СИ: 65—156 нмоль/л); конкурентно-связывающий белок (по Мёрфи-Пэтти)—4—11 мкг% (СИ: 51—142 нмоль/л).

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Общий уровень тироксина не связан прямо с физиологическим гормональным эффектом тироксина. Уровень тироксина варьирует с изменением концентраций белков-носителей (тироксин-связывающий глобулин и преальбумин), которые легко меняются в зависимости от физиологического состояния, например, при беременности, при различных заболеваниях и приеме лекарств. Толкование показателя общего тироксина зависит от концентрации белка-носителя, которую можно определить исходя из значений связывания

трийодтиронина (T_3) эритроцитами или смолрой (см. ниже). Именно концентрации свободных T_3 и T_4 определяют гормональную активность.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при гипертиреозе (наряду с повышением тироксин-связывающего белка) и иногда в случаях острого тиреоидита или акромегалии.

2. Снижение показателя имеет место при гипотиреозе (первичном и вторичном) и при снижении концентрации тироксин-связывающего белка.

Свободный тироксин сыворотки

Норма (равновесный диализ): 0,8—2,4 нг% (СИ: 0,01—0,03 нмоль/л). Может быть определен по данным общего тироксина и связывания T_3 смолрой.

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Метаболическая активность T_4 зависит от концентрации свободного T_4 . T_4 , по-видимому, в периферических тканях превращается, в основном, в T_3 (который также секретируется щитовидной железой). T_3 и T_4 являются активными гормонами.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при гипертиреозе, иногда при активном тиреоидите.

2. Снижение показателя имеет место при гипотиреозе.

Тироксин-связывающий глобулин (ТСГ) сыворотки

Норма (радиоиммунологическое определение): 2—4,8 мг%.

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. ТСГ — главный белок-носитель T_3 и T_4 в плазме. Колебания концентрации ТСГ сопровождаются соответствующими колебаниями концентрации T_4 , т. е. осуществляется регуляция, позволяющая поддерживать такой уровень физиологически активных свободных гормонов, который обеспечивает эутиреоидную функцию. Наследственные дефекты, детерминирующие аномальные концентрации ТСГ, сцеплены с X-хромосомой.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при беременности, инфекционном гепатите, врожденном повышении уровня ТСГ.

2. Снижение показателя имеет место при заболеваниях, сопровождающихся снижением содержания белков (глобулина), нефротическом синдроме, циррозе печени, активной акромегалии, дефиците эстрогенов, врожденном дефиците ТСГ.

Связывание трийодтиронина (T_3) в сыворотке, оценка связывания тироксина смолрой (ST_3C) или оценка тироксин-связывающего глобулина (ТСГ-оценка)

Норма: ST_3C , как процент поглощения $^{125}I-T_3$ ионообменной смолрой, 25—36%; ST_3C -отношение (ТСГ-оценка) вычисляют как отношение показателя связывания $^{125}I-T_3$ смолрой в исследуемой сыворотке к этому показателю для смеси нормальных сывороток: 0,85—1,15.

А. Предосторожности. Нет.

Б. Физиологическая основа. Если уровень тироксин-связывающих белков в сыворотке нормальный, то при гипертиреозе типа T_4 большая часть ТСГ-связывающих сайтов будет занята T_4 , а при гипотиреозе — сравнительно меньшая часть. T_3 , меченный ^{125}I и добавленный к сыворотке вместе со связывающим веществом (ионообменная смола, древесный уголь, тальк и т. д.), распределяется между ним и ТСГ. Затем связывающее вещество выделяют из сыворотки и определяют его радиоактивность (тест ST_3C). Поскольку смола захватывает не связанный с ТСГ радиоактивный T_3 , её активность меняется в обратной зависимости от числа свободных сайтов на ТСГ, т. е. ST_3C повышается, если ТСГ насыщен T_4 , и понижается, если насыщение ТСГ невелико.

В. Интерпретация

1. ST_3C и ST_3C -отношение повышаются, когда число свободных сайтов связывания снижено, как при гипертиреозе, акромегалии, нефротическом синдроме, тяжелом циррозе печени, наследственном дефиците ТСГ.

2. ST_3C и ST_3C -отношение снижаются, когда число свободных сайтов связывания увеличено, как при гипотиреозе, беременности, у новорожденных, инфекционном гепатите, наследственном повышении ТСГ.

Трансаминазы

См. выше «Аминотрансферазы»

Триглицериды сыворотки

Норма: менее 165 мг% (СИ: 1,65 г/л) (см. также табл. П.1).

А. Предосторожности. Исследование необходимо проводить натощак (желательно не принимать пищу не менее 16 ч). Если сыворотку отделить от сгустка и заморозить, то проведение анализа можно отсрочить.

Б. Физиологическая основа. Жир, поступающий с пищей, гидролизруется в тонком кишечнике, продукты всасываются, далее в клетках слизистой происходит ресинтез триглицеридов и их секреция в млечные ка-

налы в составе хиломикронов. Триглицериды хиломикронов гидролизуются липопротеинлипазой (главным образом в жировой ткани); продукты расщепления абсорбируются и депонируются. Свободные жирные кислоты, поступающие главным образом из жировой ткани, являются предшественниками синтезируемых в печени эндогенных триглицеридов. Эндогенные триглицериды переносятся вместе с β -липопротеинами, липопротеинами очень низкой плотности. Для правильного определения эндогенных триглицеридов исследование должно проводиться на постабсорбтивной стадии.

В. Интерпретация. Концентрации триглицеридов, холестерина, фракций липопротеинов (очень низкой плотности, низкой и высокой плотности) оцениваются совместно. Изменения в соотношениях этих липидных компонентов бывают первичными и вторичными.

1. Повышение показателя — гиперлипопропротеинемия:
а) первичная — гиперлипопропротеинемия I типа (экзогенная гиперлипидемия), гипербеталипопротеинемия II типа, «широкая» гипербеталипопротеинемия III типа, гиперлипопропротеинемия IV типа (эндогенная гиперлипидемия) и гиперлипопропротеинемия V типа (смешанная гиперлипидемия);

б) вторичная — гипотиреоз, сахарный диабет, нефротический синдром, хронический алкоголизм с жировой инфильтрацией печени, прием контрацептивных стероидов, закупорка желчных протоков и стресс.

2. Снижение показателя — гиполipoproteинемия:

а) первичная — болезнь Танжера, (α -липопротеиновая недостаточность), абеталипопротеинемия и несколько редких, трудно диагностируемых синдромов;
б) вторичная — недоедание, нарушение всасывания и (иногда) паренхиматозные заболевания печени.

Азот мочевины и мочевины крови, плазмы и сыворотки

Норма: азот мочевины крови — 8—25 мг% (СИ: 2,9—8,9 ммоль/л); мочевины — 21—53 мг% (СИ: 3,5—9 ммоль/л).

А. Предосторожности. Нельзя использовать оксалат аммония или «двойной оксалат» в качестве антикоагулянтов, так как аммиак в этом случае будет определяться вместе с мочевиной.

Б. Физиологическая основа. Мочевина, конечный продукт метаболизма белков, экскретируется почками. Концентрация мочевины в клубочковом фильтрате такая же, как и в плазме. Канальцевая реабсорбция мочевины изменяется обратно пропорционально скорости потока мочи. Поэтому экскреция мочевины является менее информативным показателем клубочковой фильтрации, чем экскреция креатинина, который не реабсорбируется. Существует прямая связь между азотом мочевины крови и по-

треблением белка и обратная связь между скоростью экскреции мочевины и азотом мочевины крови.

В. Интерпретация.

1. Повышение показателя имеет место:

а) при почечной недостаточности — остром и хроническом нефрите, остром канальцевом некрозе, при обструкции мочевыводящих путей;

б) при усилении метаболизма азота на фоне уменьшения почечного кровотока или нарушения функции почек, — дегидратации (любой этиологии), а также при кровотечении из верхних отделов желудочно-кишечного тракта (комбинация повышенного всасывания белков крови и уменьшенного почечного кровотока);

в) при уменьшении почечного кровотока — при шоке, недостаточности функции надпочечников и иногда при сердечной недостаточности с явлениями застоя.

2. Снижение показателя имеет место при печеночной недостаточности, нефрозе (не осложненном почечной недостаточностью), при кахексии.

Мочевая кислота сыворотки и плазмы

Норма: мужчины — 3—9 мг% (СИ: 0,18—0,53 ммоль/л); женщины — 2,5—7,5 мг% (СИ: 0,15—0,45 ммоль/л).

А. Предосторожности. При определении в плазме в качестве антикоагулянта следует использовать оксалат лития; оксалат калия может исказить результаты.

Б. Физиологическая основа. Мочевая кислота, конечный продукт метаболизма нуклеопротеинов, выделяется почками. Подагра, наследственное нарушение метаболизма, характеризуется повышением концентрации мочевой кислоты в плазме и сыворотке, повышением общего содержания мочевой кислоты в организме и накоплением мочевой кислоты в тканях. Повышение концентрации мочевой кислоты в плазме или сыворотке может сопровождать активацию катаболизма нуклеопротеинов (патологическое изменение крови, противолейкозная терапия); содержание мочевой кислоты увеличивается при использовании мочегонных группы тиазида, при уменьшении экскреции её почками.

В. Интерпретация

1. Повышение показателя имеет место при подагре, преэклампсии, эклампсии, лейкозе, полицитемии, терапии противолейкозными препаратами и многими другими препаратами, при почечной недостаточности, болезни накопления гликогена (тип I), синдроме Леша—Найхана (X-сцепленный дефицит гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансферазы), при синдроме Дауна. Высокий уровень мочевой кислоты в крови характерен для филиппинцев.

2. Снижение показателя имеет место при остром ге-

патите (иногда), лечении аллопуринолом, пробенецидом.

Мочевая кислота мочи

Норма: 350—600 мг/24 ч на стандартной диете без пуринов. (СИ: 2,1—3,6 ммоль/24 ч). Отношение содержания мочевой кислоты в моче к креатинину мочи составляет для взрослых 0,21—0,59; максимально 0,75 для мочи, собранной за сутки при диете без пуринов.

А. Предосторожности. Из диеты удалить продукты, богатые пуринами, перед исследованием и в течение 24 ч сбора мочи. Значительная физическая активность может приводить к повышению экскреции пуринов с мочой.

Б. Физиологическая основа. Повышенное содержание мочевой кислоты в сыворотке может быть результа-

том ее повышенной продукции или пониженной экскреции.

В. Интерпретация.

1. Повышение показателя имеет место в 25—30% случаев подагры и объясняется повышенным синтезом мочевой кислоты. Повышение синтеза и экскреции мочевой кислоты характерно для миелопролиферативных заболеваний. Синдром Леша—Найхана (дефицит гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы) и болезни накопления гликогена также могут сопровождаться урикозурией.

2. Снижение показателя имеет место при почечной недостаточности, в некоторых случаях при болезни накопления гликогена (тип I) и при любом обменном нарушении, сопровождающемся накоплением в крови мочевой кислоты или β -гидроксимасляной кислоты. Салицилаты в дозе менее 2—3 г в сутки могут приводить к задержке мочевой кислоты почками.

НОРМАЛЬНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Кровь (К), плазма (П), сыворотка (С), моча (М)

ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ КРОВИ, ПЛАЗМЫ, СЫВОРОТКИ (ЗНАЧЕНИЯ ВАРЬИРУЮТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА)

Адреналин: П (в лежащем положении) — менее 100 пг/мл (менее 550 пмоль/л).

Азот α -аминокислот: С (натощак) — 3—5,5 мг% (2,2—3,9 ммоль/л).

Азот мочевины: С или П — 8—25 мг% (2,9—8,9 ммоль/л). В качестве антикоагулянта не использовать оксалат аммония.

Амилаза: С — 80—180 ед. Сомоди на 100 мл. Результаты варьируют в разных методах.

Аминотрансферазы (трансаминазы):

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) (варьирует в зависимости от метода): С — 3—26 МЕ/л при 30° С.

Аспартатаминотрансфераза (АСТ) (значения варьируют в зависимости от метода): С — 6—25 МЕ/л при 30° С.

Аммиак: К — менее 110 мкг% (менее 65 мкмоль/л) (метод диффузии). Не использовать в качестве антикоагулянта оксалат аммония.

α -антитрипсин: С — более 180 мг%

Аскорбиновая кислота: П — 0,4—1,5 мг% (23—85 мкмоль/л).

Ацетон и ацетоацетат: С — 0,3—2 мг% (3—20 мг/л).

Белок:

Альбумин: С — 3,5—5,5 г% (35—55 г/л).

Глобулин: С — 2—3,6 г% (20—36 г/л).

Общий: С — 6—8 г% (60—80 г/л).

Разделение при электрофорезе: см. табл. П.5.

Фибриноген: П — 0,2—0,6 г% (2—6 г/л).

Бикарбонат: С — 24—28 мэкв/л (24—28 ммоль/л).

Билирубин: С, общий — 0,2—1,2 мг% (3,5—20,5 мкмоль/л).

Прямой (конъюгированный) — 0,1—0,4 мг% (менее 7 мкмоль/л).

Непрямой — 0,2—0,7 мг% (менее 12 мкмоль/л).

Витамин А: С — 15—60 мкг% (0,53—2,1 мкмоль/л).

Витамин В₁₂: С — более 200 пг% (более 148 пмоль/л).

Витамин D: С — холекальциферол (D₃): 25-гидроксистолекальциферол, 8—55 нг/мл (19,4—137 нмоль/л); 1,25-дигидроксистолекальциферол, 26—65 пг/мл (62—155 пмоль/л); 24,25-дигидроксистолекальциферол, 1—5 нг/мл (2,4—12 нмоль/л).

Гаптоглобин: С — 40—170 мг гемоглобинсвязывающей емкости.

Глюкоза: С и П — 65—110 мг% (3,6—6,1 ммоль/л).

Железо: С — 50—175 мкг% (9—31,3 мкмоль/л).

Железо-связывающая активность: С — общая, 250—410 мкг% (44,7—73,4 мкмоль/л). Насыщение — 20—55%.

Калий: С или П — 3,5—5 мэкв/л (3,5—5 ммоль/л).

Кальций: С — 8,5—10,3 мг% (2,1—2,6 ммоль/л). Результаты варьируют в зависимости от концентрации альбумина.

Кальций ионизированный: С — 4,25—5,25 мг%; 2,1—2,6 мэкв/л (1,05—1,3 ммоль/л).

β -каротин: С, натощак — 50—300 мкг% (0,9—5,58 мкмоль/л).

Кислая фосфатаза: С — 1—5 ед. (Кинг-Армстронг), 0,1—0,63 ед. (Бесси-Лоури).

Кислород:

Артериальный P_{O₂} (P_{aO₂}): 80—100 мм рт.ст. (10,67—13,33 кПа) (на уровне моря). Результаты варьируют в зависимости от возраста.

Емкость: К — 16—24 объемных%, варьирует в зависимости от концентрации гемоглобина.

Процент насыщения в артериальной крови: 94—100% емкости.

Содержание в артериальной крови: К — 15—23 объемных%. Зависит от концентрации гемоглобина.

Комплемент: С — С3 (β_{1C}), 90—250 мг%. С4 (β_{1E}), 10—60 мг%; общий (CH₅₀), 75—160 мг%

Кортизол: А — в 8 ч утра 5—25 мкг% (138—690 нмоль/л); в 8 ч вечера менее 10 мкг% (275 нмоль/л).

Креатинфосфокиназа (КФК): С — 10—50 МЕ/л при 30° С. Результаты зависят от метода.

Креатинфосфокиназа (изоферменты): см. табл. П.2.

Креатинин: С и П — 0,7—1,5 мг% (62—132 мкмоль/л).

Лактат: К — (специальный забор): венозная — 4—16 мг% (0,44—1,8 ммоль/л).

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ): Варьирует в разных методах; С — 55—140 МЕ/л при 30° С.

Липаза: С — менее 150 ед.л.

Липиды, общие: С — 450—1000 мг% (4,5—10 г/л).

Магний: С или П — 1,8—3 мг% (0,75—1,25 ммоль/л).

Медь: С и П: 100—200 мкг% (16—31 мкмоль/л).

Мочевая кислота: С или П, мужчины — 3—9 мг% (0,18—0,54 ммоль/л); женщины — 2,5—7,5 мг% (0,15—0,45 ммоль/л).

Натрий: С или П — 136—145 мэкв/л (136—145 ммоль/л).

Норадреналин: П (в лежащем положении) — менее 500 пг/мл (3 нмоль/л).

Объем крови (метод с синим красителем Эванса): взрослые — 2990—6980 мл.

Осмоляльность: С — 280—296 мосм/кг воды (280—296 ммоль/кг воды)

Основания сыворотки: С — 145—160 мэкв/л (145—160 ммоль/л).

Пируват: К — 0,6—1 мг% (70—114 мкмоль/л).

Протромбиновое время: П — зависит от

метода определения.

Серотонин: К—5,0—20 мкг% (0,2—1,14 мкмоль/л).

Содержание CO₂: С и П: 24—29 мэкв/л (24—29 ммоль/л).

Сульфат: С или П—по сере, 0,5—1,5 мг% (156—468 мкмоль/л).

Трансферрин: С—200—400 мг% (23—45 мкмоль/л).

Триглицериды: С—менее 165 мг% (1,9 ммоль/л) (см. «Фракции липидов»).

Удельный вес: К—1,056 (зависит от концентрации гемоглобина и белков). С—1,0254—1,0288 (зависит от концентрации белка).

Ферритин: С: взрослые женщины—20—120 нг/мл; мужчины—30—300 нг/мл, дети до 15 лет—7—140 нг/мл.

Фолиевая кислота: С—2—20 нг/мл (4,5—45 нмоль/мл).

Фосфор фосфолипидов: С—5—12 мг% (1,45—2 г/л).

Фосфор неорганический: С, натощак—3—4,5 мг% (1—1,5 ммоль/л).

Фракции липидов: С и П—желательный уровень: холестерол-ЛПВП—более 40 мг%; холестерол-ЛПНП—менее 180 мг%; холестерол-ЛПОНП—менее 40 мг%. (Для перевода в ммоль/л показатель умножить на 0,026.)

Хлориды: С и П—96—106 мэкв/л (96—106 ммоль/л).

Холестерол: С и П—150—280 мг% (3,9—7,2 ммоль/л (см. «фракции липидов»). Результаты варьируют в зависимости от возраста.

Церулоплазмин: С—25—43 мг% (1,7—2,9 мкмоль/л).

Цианкобаламин: С—200 пг% (148 пмоль/мл).

Цинк: С—50—150 мкг% (7,65—22,95 мкмоль/л).

Щелочная фосфатаза: С, взрослые—5—13 ед (Кинг-Армстронг), 0,8—2,3 ед. (Бесси-Лоури)

Эфиры холестерина: С—65—75% общего холестерина.

P_{асо}: К артериальная—35—45 мм рт.ст (4,7—6 кПа).

pH (реакции): К артериальная—7,35—7,45 (H⁺44,7—45,5 нмоль/л).

ГОРМОНЫ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ

Гипофиз:

Антидиуретический гормон (АДГ, вазопрессин): П—при осмоляльности сыворотки 285 мосм/кг—0—2 пг/мл; при осмоляльности более 290 мосм/кг—2—12 пг/мл.

Гормон роста (ГР): С, взрослые—1—10 нг/мл (46—465 пмоль/л (радиоиммунологический метод).

Лютеинизирующий гормон (ЛГ): С—препубертатный период—2—12 мМЕ/мл; взрослые мужчины—1—15 мМЕ/мл; взрослые женщины—менее 30 мМЕ/мл; кастраты или период постменопаузы—более 30 мМЕ/мл.

Кортикотропин: (АКТГ): П—8—10 ч утра—до 100 пг/мл (22 пмоль/л).

Пролактин: С—1—25 нг/мл (0,4—10 нмоль/л).

Соматомедин: С: П—0,4—2 ед/мл.

Тиреотропный гормон (ТТГ): С—менее 10 мЕд/мл.

Фолликуло-стимулирующий гормон (ФСГ): С—препубертатный период—2—12 мМЕ/мл; взрослые мужчины—1—15 мМЕ/мл; взрослые женщины—1—30 мМЕ/мл; кастраты или период постменопаузы—30—200 мМЕ/мл (радиоиммунологический метод).

Надпочечники:

Адреналин: П—менее 0,1 нг/мл (< 0,55 нмоль/л).

Альдостерон: П (в положении лежа), нормальное потребление соли—2—9 нг% (56—250 пмоль/л); возрастает в положении стоя.

Дезоксикортизол: С—после применения метипарона более 7 мкг% (0,2 мкмоль/л).

Дофамин: П—менее 135 пг/мл/мл.

Кортизол: С—в 8 ч утра—5—20 мкг% (0,14—0,55 мкмоль/л), в 8 ч вечера—менее 10 мкг% (0,28 мкмоль/л).

Норадреналин: П—менее 0,5 мкг/л (3 нмоль/л). См. также разд. «Другие нормальные показатели».

Желудок:

Гастрин: С (особый забор): до 100 пг/мл (47 пмоль/л). Увеличивается более, чем до 200 пг/мл.

Пепсиноген I: С—25—100 нг/мл.

Островки Лангерганса:

Глюкагон: С (натощак): 20—100 пг/мл.

Инсулин: С—4—25 мЕ/мл; (29—181 пмоль/л).

С-пептид: С—0,9—4,2 нг/мл.

Паращитовидная железа: уровень гормона паращитовидной железы зависит от метода исследования и используемых антител. Коррелирует с уровнем сывороточного кальция.

Плацента:

Хорионический гонадотропин: С—β-субъединица: мужчины—менее 9 мМЕ/мл; беременные женщины (после имплантации яйцеклетки)—более 10 мМЕ/мл.

Эстриол (Е₃): С, мужчины и небеременные женщины—менее 0,2 мкг% (менее 7 нмоль/л) (радиоиммунологический метод).

Половые железы:

Прогестерон: С, фолликулярная фаза—0,2—1,5

мг/мл; лютеальная фаза — 6—32 нг/мл; при беременности более 24 нг/мл; мужчины — менее 1 нг/мл (1 нг/мл = 3,2 нмоль/л).

Тестостерон общий: С, препубертатный период — менее 100 нг%, взрослые мужчины — 300—1000 нг%; взрослые женщины — 20—80 нг%; лютеальная фаза — до 120 нг%.

Тестостерон свободный: С, мужчины — 10—30 нг%; женщины — 0,3—2 нг% (1 нг% = 0,035 нмоль/л).

Эстрадиол (E₂): С (особый забор), мужчины — 12—34 пг/мл; женщины — менструальный цикл (1—10 день) 24—68 пг/мл; 11—20 день — 50—300 пг/мл; 21—30 день — 73—149 пг/мл (радиоиммунологический метод) (1 пг/мл = 3,6 пмоль/л).

Почки:

Активность ренина: П (особый забор). При нормальном потреблении натрия: в положении лежа — 1—3 нг/мл/ч; в положении стоя — 3—6 нг/мл/ч. При ограничении натрия: в положении лежа — 2—6 нг/мл/ч; в положении стоя — 3—20 нг/мл/ч.

Щитовидная железа:

Кальцитонин: С — менее 100 пг/мл (менее 29,2 пмоль/л).

Поглощение триодтиронина (СТ₃С) С — 25—36%; по оценке ТСГ 0,85—1,15.

Тироксин, общий (ТТ₄): С — 5—12 мкг% (65—156 нмоль/л) (радиоиммунологический метод).

Тироксин, свободный (FT₄): С — 0,8—2,4 нг% (10—30 пмоль/л).

Тироксин-связывающая активность глобулина: С — 12—28 мкг Т₄/100 мл (150—360 нмоль Т₄/100 мл).

ДРУГИЕ НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Гормоны надпочечников и их метаболиты:

Альдостерон: М — 2—26 мкг/24 ч (5,5—72 нмоль). Варьирует в зависимости от потребления кальция и натрия.

Катехоламины: М, общий — менее 100 мкг/24 ч. Адреналин — менее 10 мкг/24 ч (менее 55 нмоль); норадреналин — менее 100 мкг/24 ч (менее 591 нмоль). Показатели варьируют в зависимости от используемого метода.

Кортизол, свободный: М — 20—100 мкг/24 ч (0,55—2,76 мкмоль) 11,17-гидроксикортикоиды: М — мужчины, 4—12 мг/24 ч; женщины, 4—8 мг/24 ч. Показатели варьируют в зависимости от метода.

17-кетостероиды: М — до 8 лет, 0—2 мг/24 ч; подростки, 2—20 мг/24 ч; мужчины, 10—20 мг/24 ч; женщины, 5—15 мг/24 ч. Показатели варьируют в зависимости от метода. (1 мг = 3,5 мкмоль)

Метанефрин: М — менее 1,3 мг/24 ч (менее 6,6 мкмоль). Показатели варьируют в зависимости от метода.

Жиры фекалий: Менее 30% сухого веса

Свиной: М — менее 80 мкг/24 ч (менее 0,4 мкмоль/24 ч)

Порфирины:

Δ-аминолевулиновая кислота: М — 1,5—7,5 мг/24 ч (11,4—57,2 мкмоль)

Копропорфирин: М — менее 230 мкг/24 ч (менее 345 нмоль)

Уропорфирин: М — менее 50 мкг/24 ч (менее 60 нмоль)

Порфобилиноген: М — менее 2 мг/24 ч (менее 8,8 мкмоль)

Уробилиноген: М — 0—2,5 мг/24 ч (менее 4,23 мкмоль)

Уробилиноген фекалий: 40—280 мг/24 ч (68—474 мкмоль)

ЛИТЕРАТУРА

- Friedman R. B. et al.* Effects of diseases on clinical laboratory tests, Clin. Chem., 1980, 26 (Suppl. 4), ID.
- Hansten P. D., Lybecker L. A.* Drug effects on laboratory tests. In: Basic and Clinical Pharmacology, 2nd ed., Katzung B. G. (ed.), Lange, 1984.
- Lippert H., Lehmann H. P.* SI Units in Medicine: An Introduction to the International System of Units With Conversion Tables and Normal Ranges, Urban and Schwarzenberg, 1978.
- Lundberg G. D., Iverson C., Radulescu G. (eds.).* Now read this: The SI units are here. (Editorial.), JAMA, 1986, 255, 2329.
- Powsner E. K.* SI quantities and units for American medicine, JAMA, 1984, 252, 1737.
- Scully R. E. et al.* Normal reference laboratory values: Case records of the Massachusetts General Hospital, N. Engl. J. Med., 1986, 314, 39.
- Sonnenwirth A. C., Jarett L.* Gradwohl's Laboratory Methods and Diagnosis, 8th ed., Vols 1 and 2, Mosby, 1980.

Список сокращений

АКТГ	— адренотропный гормон	МСГ	— меланоцит-стимулирующий гормон
АДГ	— антидиуретический гормон	МЭН	— множественная эндокринная неоплазия
ВЖ	— внеклеточная жидкость	ПОМК	— про-опиомеланокортин
ВКП	— вазоактивный кишечный полипептид	ПРГ	— пролактин-рилизинг-гормон (пролактолиберин)
ГАМК	— γ -аминомасляная кислота	ПРЛ	— пролактин
ГГТ	— γ -глутамилтрансфераза	ПРФ	— пролактин-рилизинг-фактор
ГнРГ	— гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин)	ПТГ	— паратиреоидный гормон
ГР	— гормон роста	СС	— соматостатин
ДБГ	— дофамин- β -гидроксилаза	СТГ	— соматотропный гормон (гормон роста)
ДИТ	— диiodтирозин	СТГ-РГ	— гормон роста-рилизинг-гормон (соматолиберин)
ДОК	— дезоксикортикостерон	T_3	— триiodтиронин
ДЭА	— дегидроэпиандростерон	T_4	— тетраiodтиронин
ИНСД	— инсулин-независимый сахарный диабет	ТММ	— тяжелый меромиозин
ИФР	— инсулиноподобный фактор роста	ТРГ	— тиреотропин-рилизинг-гормон (тиролиберин)
КРГ	— кортикотропин-рилизинг-гормон (кортиколиберин)	ТСГ	— тироид-стимулирующий гормон (тиреотропин)
КСБ	— кальций-связывающий белок	ТСПА	— тироксин-связывающий преальбумин
КФК	— креатинфосфокиназа	ФАФС	— 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат
ЛГ	— лютеинизирующий гормон	ФЕПКС	— фосфоенолпируват-карбоксикиназа
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа	ФРН	— фактор роста нервов
ЛММ	— легкий меромиозин	ФРФ	— фактор роста фибробластов
ЛПГ	— липотропин	ХГЧ	— хорионический гонадотропин человека
ЛПВП	— липопротеины высокой плотности		
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности		
ЛПОНП	— липопротеины очень низкой плотности		
МИТ	— моноiodтирозин		

Предметный указатель

- Абеталипопротеинемия I: 262, 285
Автоокисление I: 160
Автотрофные организмы I: 113
Агглютинация клеток II: 302
Агликон I: 143, 144
Агматин II: 298
Агонисты II: 155—156, 216, 217
Аденилатдезаминаза II: 342
Аденилаткиназа I: 116, 218
— митохондрий I: 136
Аденилатциклаза I: 192, 194, 238, 254, 270, 271; II: 10, 11, 162, 163, 167, 177, 178, 197
Аденилатциклазная система II: 162—163, 226
— — G-белки II: 163
3',5'-Адениловая кислота *см.* АМР циклический
Адениловая кислота *см.* Аденозинмонофосфат
Аденилосукциназа II: 18, 19
Аденилосукцинатсинтаза II: 19
Аденин II: 6, 7, 9, 21, 35, 73
Адениннуклеотиды, взаимопревращение I: 115—116
Аденин—фосфорибозилтрансфераза II: 21
S-Аденозилгомоцистеин II: 335, 336, 345, 353, 354
S-Аденозилметионин I: 114, 267, 303, 335, 336, 346, 348, 349, 353, 354; II: 10, 11
S-Аденозилметионин-декарбоксилаза I: 348, 349
Аденозин II: 7, 8, 9, 10—11, 15, 16
— анти- и син-конфигурации II: 7, 8
Аденозиндезаминаза, недостаточность II: 30, 31
Аденозиндифосфат (ADP) I: 113, 114, 115, 116, 117, 130, 215, 217, 218; II: 10, 340, 341
Аденозинкиназа II: 21, 22
Аденозинмонофосфат (AMP) I: 114, 115, 215, 216, 218; II: 5, 8, 9, 19, 20, 22, 23, 342
Аденозин-3'-монофосфат, структура II: 9
Аденозин-5'-монофосфат, структура II: 9
Аденозинтрифосфат (ATP) I: 113, 114, 115, 116, 117, 130, 181, 182, 184, 188, 192, 196, 215, 235, 247, 248, 249, 267, 275, 309, 335, 336; II: 9, 10, 18, 20, 332, 333, 337, 340, 341
— магнесвий комплекс I: 114
— свободная энергия гидролиза I: 114
Аденозин-5'-трифосфат, структура II: 10
Адреналин I: 192, 194, 215, 219—220, 223, 269, 270, 271, 353; II: 221, 222, 223, 225, 226
— в плазме, нормальное содержание II: 383
— ингибирование липогенеза I: 288
— инотропный эффект II: 226
— хронотропный эффект II: 226
β-Адренергическая стимуляция, расслабление гладких мышц II: 339
Адренергические рецепторы II: 225—226
Адреногенитальный синдром II: 219
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ) I: 270, 271; II: 148, 159, 171, 181—182, 211, 213, 219
8-Азагуанин II: 12, 13
Азатиоприн II: 13
Азасерин II: 20
6-Азауридилат II: 33
6-Азауридин II: 12, 33
Азот аминокислот, катаболизм I: 306—316
Азотистое равновесие I: 307
Азотистый баланс I: 306—307; II: 276—277
Аконитаза I: 174, 175
— цикл лимонной кислоты I: 175
цис-Аконитат I: 174, 175
Аконитатгидратаза I: 174
Акромегалия II: 176
Аксон II: 344
Актин II: 333, 335, 337, 340, 342, 343
— глобулярный (G-актин) II: 334, 335, 342
— мономерный II: 334
— немышечный II: 342—344
F-Актин II: 334, 335, 337, 338
G-Актин II: 334, 335, 342
α-Актин II: 342
β-Актин II: 342
γ-Актин II: 342
α-Актинин II: 334, 336, 344
Актин-миозиновое взаимодействие II: 339, 340
Актин-миозиновый комплекс II: 337
Актиновая регуляция сокращения мышц II: 337—338
Актиновые микрофиламенты II: 342, 344
— филаменты II: 334, 337
β-Аланилдипептиды I: 344, 345
Аланин I: 25, 28, 179, 215, 296, 299, 301, 308, 311, 312, 313, 323, 344; II: 341
α-Аланин I: 344
β-Аланин I: 28, 344, 345
Аланин-пируват—трансаминаза I: 308
Аланин-трансаминаза I: 308, 323
Алкаптонурия I: 328, 329—330
АЛК-дегидратаза I: 358
Алкоголизм I: 267, 286
— хронический I: 242
Алкогольдегидрогеназа I: 64, 121, 267, 268
АЛК-синтаза I: 358, 360, 361, 363, 364, 365
Аллантоин I: 120, II: 24, 25
Аллопуринол II: 13, 32
Аллостерическая регуляция I: 104—108
Аллостерические модуляторы I: 214
— эффекторы I: 104, 107; II: 28
Аллостерический центр ферментов I: 104, 106
Аллостерическое ингибирование, кинетика I: 107—108
Альбинизм глаз I: 353
— — и кожи I: 352, 353
Альбиноз негативный по тирозиназе I: 353
Альбумин(ы) I: 42; II: 319, 320
— сывороточный I: 247, 256, 259

- Альдегиддегидрогеназа I: 121, 268, 326
 Альдегиды жирных кислот I: 155
 Альдозоредуктаза I: 208
 Альдозы I: 140, 145
 Альдо-кето-изомеризация I: 142
 Альдолаза I: 64, 182, 183, 203, 207, 208
 Альдостерон II: 148, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 216, 217, 218
 — механизм действия II: 218—219
 Альдостеронизм II: 219
 Аменорея II: 177
 Амилаза II: 289, 370, 382
 — слюны II: 286, 292
 Амило-[1 → 6]-глюкозидаза I: 191
 Амилоза I: 148, 149
 Амилопектин I: 148, 149
 Амило-[1 → 4] → [1 → 6]-трансглюкозидаза I: 190
 Аминоацил-тРНК II: 97, 102, 103, 106
 Аминоацил-тРНК-синтазы II: 96
 γ-Аминобутират, метаболизм I: 354—355
 γ-Аминобутират-трансаминаза I: 354
 β-Аминоизобутират I: 28, 340; II: 27, 28, 31
 α-Амино-β-кетoadипат I: 343, 344, 358
 Аминокислоты I: 21—32
 — биосинтез I: 299—305
 — в белках I: 33—41
 — — — определение I: 36—37
 — всасывание II: 296—297
 — глюкогенные I: 198
 — дезаминирование I: 168
 — ионные формы I: 22—24
 — катаболизм азота I: 306—316
 — — углеродного скелета I: 317—342
 — метаболизм I: 167—168, 171
 — незаменимые II: 276
 — обмен между органами I: 311—313
 — образующие ацетил-КоА I: 327—335
 — — α-кетоглутарат I: 319—322
 — — оксалоацетат I: 319
 — — пируват I: 322—327
 — — сукцинил-КоА I: 335—341
 — превращение в специализированные продукты I: 343—355
 — растворимость I: 24
 — свойства I: 28—29
 — серусодержащие, нарушения метаболизма I: 325, 326
 — структура I: 24
 — химические реакции I: 24, 28
 — цветные реакции I: 24, 28
 — pI I: 22—23
 δ-Аминолевулиновая кислота (АЛК) I: 358, 360, 363, 364, 365
 Аминолипиды I: 151
 Аминомасляная ацидемия I: 355
 γ-Аминомасляная кислота (γ-аминобутират, ГАМК) I: 28, 345, 346, 354, 355
 2-Амино-6-оксипурин II: 6
 Аминопептидаза(ы) I: 67; II: 291, 293
 Аминопирин I: 124, 207
 6-Аминопурин II: 6
 Аминосакхара I: 146
 — метаболизм I: 210, 211
 Аминотрансферазы I: 307
 — сыворотки, нормальное содержание II: 369, 382
 Аммиак II: 298
 — в крови, нормальное содержание II: 369
 — метаболизм I: 306, 307, 309—311, 315
 — образование I: 309—310
 — транспорт I: 310—311
 Аммиачное отравление I: 309, 310
 Аммонотеллические организмы I: 307
 Амобарбитал I: 131
 Амплификация генов II: 120—121
 Амфиболические интермедиаторы I: 317, 318, 322, 333, 337, 341
 — метаболиты I: 299, 304
 — пути I: 165
 АМР циклический (сАМР) I: 192, 193, 194, 244, 270, 295; II: 5, 10
 — — синтез I: 270
 Анаболические процессы I: 112
 — пути I: 99, 165
 Анафилаксия I: 238, 245
 Анаэробные дегидрогеназы I: 119, 121
 Анаэробный гликолиз I: 181
 Ангиотензин I II: 212, 213
 — II II: 159, 161, 171, 212, 213
 — III II: 212, 213
 Ангиотензиноген II: 212
 Ангиотензин-превращающий фермент II: 213
 Ангиотензины I: 220
 Андроген-связывающий белок (АСБ) II: 232
 Андрогены II: 156, 169, 211, 228, 233, 234, 236
 — биосинтез II: 208, 230
 — механизм действия II: 233, 234
 Андростендион II: 206, 207, 210
 Андростерон II: 231
 Анемия II: 274, 297
 — Фанкони II: 81
 Анкирин II: 132
 α- и β-Аномеры I: 142
 Антагонисты II: 155—156, 216, 217
 Антибиотики как ингибиторы синтеза белка II: 105, 107
 Антиген карциноэмбриональный (КЭА) II: 252
 Н-У-Антиген II: 244, 245
 Антигенные детерминанты II: 321
 Антигены II: 121, 244, 310—311
 — групп крови II: 310—311
 — — — локус секреторный II: 310
 — — — ABO II: 310—311
 — — — H-локус II: 310
 Т-Антигены II: 357
 Антикоагулянты II: 329—330
 Антикодон II: 96
 — узнавание кодона II: 97
 Антимицин А, окислительное фосфорилирование I: 132
 Антиоксиданты I: 126, 161
 Антигела II: 121, 296—297, 321, 324
 α₁-Антитрипсин сыворотки, нормальное содержание II: 382
 Антиромбин II: 317, 318
 — III II: 326, 330
 Апобелки А I: 258, 259, 261, 262, 279
 Апобелок В I: 261, 262, 264, 266, 267, 284, 285
 — В-100 (Апо-В-100), рецептор I: 280
 — С I: 260, 261, 262, 266, 285
 — С-II I: 263
 — D I: 264, 281
 — E (Апо-E) I: 259, 260, 261, 262, 265, 266, 286
 — — рецепторы I: 261, 262, 264, 265, 286
 Аполипопротеины (апобелки) I: 258—259, 260, 262
 Апоферменты I: 65, 121
 Арабинозилцитозин II: 13
 Арахидоновая кислота I: 153, 238, 239, 240, 241, 243, 244; II: 275, 278
 Аргиназа I: 102, 103, 314, 315, 316
 Аргинин I: 26, 296, 299, 304, 320—321, 347; II: 298
 — биосинтез I: 304
 — метаболизм I: 347
 — превращение I: 347
 Аргининосукциназа I: 314, 316, 317
 Аргининосукцинат I: 313, 314, 315
 Аргининосукцинатная ацидурия I: 315—316, 317

- Аргининосукцинат-синтаза I: 314, 315
 Аргининфосфат, синтез I: 347
 Арилсульфатаза(ы) I: 254, 255; II: 315, 316
 Арсенат I: 184, 185
 — цикл лимонной кислоты I: 175
 Артрит подагрический острый II: 29
 Аскорбиновая кислота (витамин C) I: 205, 207; II: 275, 278, 280, 382
 Аспарагин I: 25, 299, 301, 318, 319
 Аспарагиназа I: 310, 319
 Аспарагинсинтаза I: 301
 Аспарат I: 25, 178, 179, 296, 299, 301, 318, 319
 Аспарат-транскарбамоилаза (АТКаза) I: 103, 106, 108; II: 25, 26, 28
 Аспирин I: 204, 238, 242, 243, 244
 Атаксия-телеангиэктазия II: 81
 Атеромы I: 285
 Атеросклероз I: 283, 284
 Атрактилозид I: 132
 АТРаза I: 50; II: 335, 337, 338, 340
 K⁺-АТРаза II: 287
 Na⁺/K⁺-АТРаза I: 144; II: 141
 Na⁺/K⁺-АТРазный насос II: 191
 АТР-синтаза I: 133, 135, 136, 272
 АТР-цитратлиаза I: 180, 215, 217, 235, 236, 271
 Ацетальдегид I: 268, 326
 2-Ацетаминофлуорен II: 353
 Ацетат I: 235, 236, 328
 N-Ацетилгалактозамин (GalNAc) I: 150; II: 301, 303, 310
 β-D-Ацетилгексозаминидаза II: 316
 Ацетилгексозамины в гликопротеинах I: 150
 N-Ацетилглутамат-γ-полуальдегид I: 304
 N-Ацетилглюкозамин (GlcNAc) I: 150, 210; II: 301, 302, 304, 306, 307, 308
 α-N-Ацетилглюкозаминидаза II: 315, 316, 317
 N-Ацетилглюкозамин-пирофосфорилдолихол (GlcNAc-пирофосфорилдолихол) II: 305, 306
 N-Ацетилглюкозамин-6-сульфатаза, недостаточность II: 315, 316
 N-Ацетилглюкозамин-фосфотрансфераза (GlcNAc-фосфотрансфераза) II: 307, 308, 309
 N-Ацетилнейраминаовая кислота (NeuAc) I: 150, 210, 211, 253; II: 301, 302, 303, 304
 N-Ацетилсеротонин I: 351
 Ацетилхолин II: 156, 159, 338
 Ацетилхолиновые рецепторы II: 338
 Ацетил-CoA I: 172, 178, 179, 180, 186, 215, 233, 235, 328, 335, 340
 — катаболизм I: 172—180
 — метаболизм холестерина I: 274
 — образование из аминокислот I: 327—335
 — цикл лимонной кислоты I: 175
 Ацетил-CoA-ацилтрансфераза I: 227
 Ацетил-CoA-карбоксилаза I: 215, 235, 270; II: 261
 — биосинтез жирных кислот I: 231, 232
 — регуляция липогенеза I: 288
 Ацетоацетат I: 289, 290, 291, 292, 296, 328, 339
 — образование I: 290, 292
 Ацетоацетил-фермент I: 233, 234
 Ацетоацетил-CoA I: 290, 291, 292, 297, 318
 Ацетоацетил-CoA-синтаза I: 291
 Ацетон I: 289, 292; II: 382
 Ацетоновые тела I: 289
 Ацидурия дикарбоновая I: 229
 Ацилглицеролы I: 151
 — биосинтез I: 247—251
 — метаболизм I: 247—251
 1-Ацилглицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза I: 248, 249
 1-Ацилдигидроксиацетонфосфат-редуктаза I: 248
 Ацил(ацетил)-малонил-фермент I: 233, 234
 Ацилтрансфераза I: 250
 Ацилтрансферазы, классификация I: 64
 Ацил-CoA-дегидрогеназа I: 123, 227, 228, 229, 230, 231
 Ацил-CoA-синтаза (тиокиназа) I: 116, 198, 225, 226, 228, 249, 268, 269
 — в митохондриях I: 136
 Ацил-CoA-тиоэфиры I: 337, 341
 Ацил-CoA-холестерол-ацилтрансфераза (АХАТ) I: 280
 Аэробные дегидрогеназы I: 119, 120—121
 — организмы, цикл лимонной кислоты I: 173
 Аэробный гликолиз I: 181
 Бактерии кишечные II: 297, 298
 Бактериофаг лямбда (λ) II: 113—118
 — — жизненный цикл и переключение пути развития II: 114, 116—117
 Барбитураты, окислительное фосфорилирование I: 131
 Барорецепторы II: 184, 212
 Белки I: 42—51, 109, 232; II: 152, 154, 163, 164, 167, 232, 276—277, 284, 287, 291, 292
 — высаливание II: 319
 — гем I: 52, 53, 54, 55, 58
 — глобулярные и фибриллярные I: 43
 — денатурация I: 48
 — дисульфидные связи I: 44
 — кислые в хроматине II: 64
 — классификация I: 42—43
 — конвертирующие I: 109
 — мембранные II: 131—132
 — — интегральные и периферические II: 132
 — мышечные II: 334—336, 340
 — неупорядоченная конформация (клубок) I: 47
 — обновление I: 306
 — определение молекулярной массы I: 50—51
 — плазмы II: 319—325
 — получение с помощью рекомбинантных ДНК II: 46—47
 — процессинг II: 105
 — растворимость I: 42
 — регулярные GTP-зависимые II: 162—163
 — сократительные и структурные II: 332—350
 — α-спираль I: 45—46
 — структура вторичная I: 47, 48, 49—50
 — — первичная I: 47, 48—49
 — — третичная I: 47, 48, 49—50
 — — четвертичная I: 47, 50—51
 — субъединицы I: 47
 — сыворотки и плазмы, содержание II: 377, 382
 — транспортные II: 152
 — хроматина II: 64
 Белково-энергетическая недостаточность II: 277
 Белок-активатор катаболических генов (САР-белок) II: 112
 Белок андроген-связывающий II: 178
 — ацилпереносающий (АПБ) I: 231—232, 234
 — железо-серный (FeS) I: 128, 129
 — катаболический регуляторный (КРБ) II: 163
 — кортикостероид-связывающий II: 210
 — переносчик эфиров холестерина I: 281
 — пищевая ценность II: 276—277
 — D-связывающий II: 200
 — синтез I: 100; II: 94—107
 — — и генетический код II: 94—107
 — — ингибиторы II: 105, 107
 — — инициация II: 102, 103
 — — терминация II: 105, 106
 — — элонгация II: 102, 104
 — стерол-переносающий I: 275
 — фосфорилирование-дефосфорилирование II: 261
 — сго (сго-белок) II: 115, 116, 118
 Белок-репрессор II: 115, 116, 118
 Z-Белок I: 225, 260
 Бензпирен II: 353, 355, 356
 Беременность I: 267, 289, 294; II: 239—240

- Бикарбонаты сыворотки и плазмы, нормальное содержание II: 370, 382
- Биливердин IX-а I: 366, 367
- Биливердинредуктаза I: 367
- Билирубин, конъюгация I: 367
- метаболизм в кишечнике I: 368—369
- определение содержания в сыворотке, методика Эрлиха I: 369
- поглощение печенью I: 367
- секреция в желчь I: 367—368
- сыворотки, нормальное содержание II: 371, 382
- Билирубиндиглюкуронид I: 367, 368, 369
- Билирубин-уробилиногеновый цикл I: 371
- Биотин I: 196, 198, 199, 231; II: 275, 279, 282
- Биотинзависимые ферменты I: 198, 199
- Биоэнергетика I: 111—117
- 1,3-Бисфосфоглицерат I: 114, 115, 116, 183, 184, 185, 186, 197
- 2,3-Бисфосфоглицерат (ДФГ) I: 59—60, 185, 186
- Бисфосфоглицератмутаза I: 185
- 2,3-Бисфосфоглицератфосфатаза I: 185
- Блоттинг II: 43
- Болезнь Аддисона II: 183, 219
- Андерсен I: 195
- Виллебранда II: 329
- Вильсона I: 345, 347; II: 285
- Волмана I: 285
- Гильберта I: 370
- Гирке I: 194—195; II: 30, 31
- Гоше I: 247, 254
- Грейвса II: 156, 192
- «кленового сиропа» I: 340, 341
- Болезни лизосомные I: 255
- Зандхоффа II: 316
- I-клеточная II: 309
- Кори I: 195
- Краббе I: 254
- Крона I: 242
- Нимана—Пика I: 254
- Помпа I: 195
- Рефсума I: 229, 231
- сердца ишемическая I: 283, 284; II: 278, 282
- Тангира, липопроотеины I: 285
- Таруи I: 195
- Тея—Сакса I: 247, 254; II: 316
- Фабри I: 254
- Фарбера I: 254
- Форбса I: 195
- Хартнупа I: 335, 346; II: 274, 282, 297
- ямайская рвотная I: 229
- Бомбезин II: 270, 272
- Брадикинин I: 35; II: 213
- Брожение, дрожжи I: 181
- и гниение в кишечнике II: 297—298
- Бутирил-СоА I: 235
- Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) II: 170, 171, 174, 268, 269, 270, 271
- Вазопрессин I: 220, 249, 269, 270; II: 159, 162, 183, 184, 257
- Валин I: 25, 28, 33, 296, 299, 311, 335, 338, 340, 341; II: 277
- биосинтез I: 305
- катаболизм I: 335, 338—339
- Валиномицин I: 139
- Ванилилминдальная кислота (ВМК) II: 224
- Векторы экспрессирующие II: 42—43
- Вестерн-блоттинг II: 43, 44, 51
- Виментин II: 346
- Винкулин II: 357
- Вирус полиомы II: 356
- саркомы Рауса, онкогены II: 357, 358
- Эпштейна — Барр II: 357
- SV 40 II: 356
- — энхансерный элемент II: 123
- Вирусы онкогенные II: 356—358
- Витамин А II: 280, 281
- В₂ II: 275, 279
- В₆ I: 334; II: 275, 279, 282
- В₁₂ I: 198, 339, 341, 342; II: 275, 279, 280, 282
- — всасывание II: 280
- D II: 194, 199, 200, 201, 203, 280, 281
- D₂ II: 281
- D₃ II: 281
- E I: 126, 161, 267; II: 281
- K II: 280, 281
- K₁ II: 281
- K₂ II: 281
- Витамины I: 267; II: 275, 278—280, 281
- водорастворимые II: 275, 278, 279—280
- группы B I: 66; II: 278, 279
- жирорастворимые II: 275, 278, 280, 281
- лечение заболеваний II: 282
- Вода внеклеточная II: 128
- внутриклеточная II: 128
- Водородные связи I: 44
- Волокна пищевые (клетчатка) II: 278, 291
- — — потребность II: 278
- Воска I: 151
- Галактитол I: 210
- Галактоза I: 142, 150, 205, 209, 210, 211, 259; II: 291, 294, 301
- метаболизм I: 205, 209—211, 221
- превращение в глюкозу I: 209
- Галактозамин I: 146
- Галактоземия I: 210—211
- Галактозид(ы) I: 144
- Галактозидаза (ы) II: 302
- β-Галактозидаза(ы) I: 100; II: 315, 316
- ген II: 113
- гидролиз лактозы II: 111
- недостаточность I: 254
- Галактозилтрансфераза II: 302
- Галактозилцерамид I: 157—158, 252, 253, 254
- Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза I: 209
- Галактокиназа I: 209
- Галакторея II: 177
- Ганглиозидоз генерализованный I: 254
- Ганглиозиды I: 158, 253; II: 129, 316
- Гастрин II: 267, 268, 269, 270, 272, 293
- Гастрономы II: 272
- Гастрин-релизинг-пептид (ГРП) II: 272
- Гастроэнтерит II: 295
- Гексаеновые кислоты I: 153
- Гексозаминидазы I: 254
- Гексозомонофосфатный шунт I: 199—204, 233
- Гексозы I: 140, 150, 205
- Гексокиназа I: 64, 69, 115, 182, 183, 185, 189, 197, 207, 209, 215, 222
- Гем I: 52, 53, 54, 55, 58, 356, 366
- биосинтез, регуляция I: 360, 361
- — стадии I: 360, 363, 364
- катаболизм I: 366—368
- синтез I: 343, 360, 361
- Гематопорфирин I: 361, 362
- Гемин I: 366
- Гемовая группа I: 123, 124
- Гемоглобин(ы) I: 52, 55—62, 185, 356, 366; II: 71, 98, 99, 100
- дезоксигенированный I: 60
- оксигенированный I: 57
- фетальный I: 60
- S I: 60—61
- Гем-оксигеназа I: 366
- Гемопротеины железосодержащие I: 123
- Геморрагические заболевания II: 329

- Гемостаз фазы II: 325
 Гемофилия II: 328, 329
 Гемфиброзил I: 285
 Ген(ы), амплификация II: 361, 362
 — в ходе развития эукариот II: 120—121
 — вариабельных областей (V_L и V_H) II: 324
 — β -глобина II: 47, 48
 — глобиновые, мутации II: 98, 99
 — делеции и вставки II: 100, 101
 — иммуноглобулинов, перестройка II: 121
 — индуцибельный II: 111
 — инсулина человека II: 252, 253
 — константных областей (C_L и C_H) II: 324
 — конститутивная экспрессия II: 111
 — организация II: 36
 — процессированные II: 72
 — разнообразия (D) II: 324
 — репрессора, регуляция экспрессии II: 114, 115
 — соединяющей области (J) II: 324
 — транскрипция II: 36, 160
 — устойчивости к ампициллину II: 40
 — — тетрациклину II: 40
 — химерные II: 124
 — человека, локализация II: 46
 — экспрессия антигенов групп крови II: 310
 — — влияние инсулина II: 262
 — — координированная II: 111
 — — регуляция II: 109—126
 — эукариотические, экспрессия II: 37
 — *cro*, регуляция экспрессии II: 114, 115, 116
 — *gag*, вирусные антигены II: 357
 — *myc*, активация протоонкогена II: 359, 360, 361
 — *src*, тирозиновая протеинкиназа II: 357, 358, 362, 363, 364
 Генетические перестройки II: 73
 Генетический код и синтез белка II: 94—107
 Генетическое картирование II: 46
 Генная инженерия II: 35
 — конверсия II: 72—73
 Геном гаплоидный человека II: 67, 68—69, 70
 — млекопитающих, генетическая организация II: 68—70
 Геномные библиотеки II: 41—43
 Гепарансульфат II: 311, 312, 314, 316, 317
 Гепарин I: 150, 263; II: 311, 312, 313—314, 316, 317
 — активация антитромбина III II: 330
 — антикоагулянтная активность II: 317
 Гепаринсульфамидаза II: 316
 Гептозы I: 140
 Гетерополисахариды I: 140—141
 Гетеротрофные организмы I: 113
 Гетерохроматин II: 67
 — конститутивный II: 67
 — факультативный II: 67
 Гиалуронидаза II: 311, 316
 Гиалуроновая кислота I: 146, 149, 150, 210; II: 311, 312, 316
 Гибридизация ДНК и РНК II: 36, 43, 51
 Гигантизм II: 176
 Гидратаза I: 232, 233, 236
 3-Гидроксиантранилат I: 334, 335
 3-Гидроксиантранилат-диоксигеназа I: 124
 3-Гидроксиантранилатоксидаза I: 334
 Гидроксипатит II: 193, 347
 3-Гидроксиацил-CoA-дегидрогеназа I: 227, 228
 D(–)-3-Гидроксибутират I: 289, 290, 291, 292, 293
 D(–)-3-Гидроксибутиратдегидрогеназа I: 289, 290, 291
 β -Гидроксиизобутират I: 338, 339, 340
 3-Гидроксикинуридин I: 334, 335
 18-Гидроксилаза II: 208, 220
 21-Гидроксилаза II: 208, 220
 7 α -Гидроксилаза I: 281, 282, 283
 17 α -Гидроксилаза II: 229
 11 β -Гидроксилаза II: 208, 220
 Гидроксилазы I: 124
 Гидроксиламин I: 39
 Гидроксилизин I: 302, 303, 304
 — биосинтез I: 304
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-CoA (ГМГ-CoA) I: 274, 275, 276, 290, 291, 292, 338, 339
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-CoA-лиаза (ГМГ-CoA-лиаза) I: 290, 292
 Гидроксиметилглутарил-CoA-редуктаза (ГМГ-CoA-редуктаза) I: 103, 108, 275, 278, 283; II: 261, 309
 Гидроксиметилглутарил-CoA-синтаза (ГМГ-CoA-синтаза) I: 275, 290, 291
 5-Гидроксиметилцитозин II: 6
 Гидроксипероксид I: 245
 4-Гидроксипиразолпиримидин II: 13
 Гидроксипролин I: 25, 296, 299, 301—303, 308, 327
 — биосинтез I: 303
 — катаболизм I: 327
 Гидроксипролиндегидрогеназа I: 327
 15-Гидроксипростагландин-дегидрогеназа I: 245
 3 β -Гидроксистероид-дегидрогеназа (3 β -ОН-СГ) II: 209, 229
 17 β -Гидроксистероид-дегидрогеназа (17 β -ОН-СГ) II: 229
 5-Гидрокситриптамиин I: 350, 351
 5-Гидрокситриптофан I: 349, 350
 5-Гидрокситриптофан-декарбоксилаза I: 350
n-Гидроксифенилпируват I: 328, 329
n-Гидроксифенилпируватгидроксилаза I: 328
 7 α -Гидроксистерол I: 282
 Гидролазы, классификация I: 64
 Гидролиз I: 21
 — протеолитическими ферментами I: 102
 Гидропероксидазы I: 120, 123—124
 Гидрофобные взаимодействия I: 44
 Гипераланинемия II: 282
 Гиперальфалипопротеинемия семейная I: 286
 Гипераммониемия I: 315, 333
 Гипераргининемия I: 316, 321
 Гипербилирубинемия I: 369—372
 Гипергликемия I: 212, 223, 224; II: 254
 Гиперкетонемия I: 289
 Гиперлизинемия I: 333
 Гиперлипопротеинемия I: 285—286
 Гипероксалурия первичная, метаболизм глицина I: 322—323
 Гиперпаратиреоз II: 197, 199
 Гиперплазия врожденная надпочечников II: 219—220
 Гиперпролинемия I: 319
 Гипертиреоз II: 156, 192
 — основной обмен II: 276
 Гипертриацилглицеролия семейная I: 286
 Гиперурикемия II: 29—31
 Гиперфенилаланинемия I: 330
 Гиперхолестеролия I: 283, 285
 — семейная I: 285
 Гипобеталипопротеинемия семейная I: 285
 Гипогаммаглобулинемия II: 325
 Гипогликемия I: 194, 207, 212, 223, 224, 294
 Гипогонадизм II: 243, 244
 Гипоксантин II: 6, 11, 15, 16, 21, 22, 24, 80
 Гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансфераза II: 21, 22, 30
 Гипоксия I: 185
 Гипомеланоз I: 353
 Гипопаратиреоз II: 198—199
 Гипотиреоз I: 284, 285; II: 191
 — основной обмен II: 276
 Гипоурикемия II: 29, 30, 31
 Гипофиз I: 270; II: 170, 172—185, 383
 Гиллурат, биосинтез I: 343, 344
 Гистамин I: 346
 Гистидаза I: 103, 321

- Гистидин I: 26, 81, 296, 299, 305, 321—322, 346; II: 277, 298
 — биосинтез I: 305
 — катаболизм I: 321—322
 Гистидиндекарбоксилаза I: 346
 Гистединемия I: 321
 Гистон(ы) I: 42; II: 36
 — в хроматине II: 64—65
 — димеры II: 65—66
 — октамеры II: 65—66
 — тетрамеры II: 65—66
 Гистоновый кор II: 78
 Гликоген I: 148, 149, 181, 183, 192, 196, 197, 208, 210, 215, 287, 294, 296, 318; II: 292, 293, 340
 — биосинтез, механизм ветвления I: 190—191
 — метаболизм I: 189—195
 — регуляция I: 219—220
 Гликогенез I: 168, 189—191, 190, 192, 215, 220
 Гликогенозы I: 194—195
 Гликогенолиз I: 168, 190, 191, 192, 193, 219—220
 Гликогенсинтаза I: 189, 190, 191, 192—194, 198, 214, 215, 216, 219; II: 261
 Гликогенфосфорилаза I: 192
 — мышечная II: 340—341
 Гликозаминогликаны I: 149, 211; II: 299, 311, 312, 317, 318
 — структура II: 312
 — и протеоглики, функции II: 317—318
 Гликозидазы II: 302
 Гликозиды I: 143—144
 — сердечные I: 144
 Гликозилирование гликопротеинов, ингибиторы ферментов II: 309
 — регуляция II: 307—309
 Гликозилтрансферазы II: 308, 311
 Гликозурия почечная I: 224
 Гликокаликс I: 150
 Гликоконъюгаты II: 299
 Гликолиз I: 114, 130, 166, 181—188, 200, 202, 203, 214, 215, 216, 217, 219; II: 340, 341
 — анаэробный I: 181
 — аэробный I: 181
 — последовательные стадии I: 182—185
 — регуляция I: 214—219
 Гликолипиды I: 151, 157—158, 209, 252—255
 Гликольальдегид активный I: 200, 201
 Гликопротеин-гликозилтрансферазы мембраносвязанные II: 304
 Гликопротеины I: 150, 209, 210, 211; II: 299—310, 314, 315, 320
 — гликозилирование, регуляция II: 307—309
 — деградация полисахаридных цепей II: 314, 316
 — и метастазирование II: 366
 — классификация II: 303
 — олигосахаридные цепи, функции II: 300
 — определение, очистка и структурный анализ II: 300
 — полилактозамины II: 305
 — N-связанные II: 304—307
 — O-связанные II: 303—304
 — функции II: 299, 300
 Гликофинголипиды I: 151, 157—158, 211, 247, 252—255; II: 129
 — и метастазирование II: 366
 Гликофорин I: 150
 Гликохенодезоксихолевая кислота I: 282
 Гликохолевая кислота I: 282
 Глицентин II: 272—273
 D-Глицеральдегид I: 142, 145, 207
 Глицеральдегид-3-фосфат I: 182, 183, 184, 197, 199, 201, 202, 203
 Глицеральдегид-фосфатдегидрогеназа I: 137
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа I: 183, 184, 207, 235
 Глицерол I: 151, 196, 197, 198—199, 247, 248, 261, 262, 263, 269, 295, 297, 298; II: 290, 293, 296
 Глицеролкиназа I: 197, 198, 247, 248, 268
 Глицерол-3-фосфат I: 114, 197, 198, 249, 269, 295, 296, 297; II: 290, 296
 Глицеролфосфат-ацилтрансфераза I: 270
 Глицерол-3-фосфатацилтрансфераза I: 248, 249
 Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа I: 123, 136, 197, 199, 248, 249
 Глицеролфосфохолингидролаза I: 251
 Глицерофосфатный челночный механизм I: 136, 137
 Глицерофосфолипиды I: 151, 250
 — распад и обновление I: 251
 Глицин I: 25, 296, 299, 301, 302, 311, 322—323, 326, 343—344, 354
 — образование холина I: 301, 302
 — превращение I: 343—346
 — расщепление I: 322, 323, 326
 Глицинамидкиносинтетаза II: 17
 Глицинамидрибозилфосфат-формилтрансфераза II: 17
 Глицинамидриботид (ГАР) II: 17
 Глициновые конъюгаты, образование I: 343
 Глицинсинтазный комплекс I: 322, 323
 Глицинурия I: 322
 Глобин I: 366
 Глобулин(ы) I: 42, 43; II: 319, 320
 Глутамат I: 178, 179, 296, 299, 300, 301, 304, 308, 309, 310, 311, 318, 319
 L-Глутамат I: 300, 303, 307, 308, 319, 321, 332, 333, 354, 355
 Глутаматдегидрогеназа I: 300, 309, 315
 L-Глутаматдегидрогеназа I: 308, 309
 L-Глутаматдекарбоксилаза I: 354, 355
 Глутамат-трансаминаза I: 308
 Глутамат-формиминотрансфераза I: 321
 Глутамин I: 26, 299, 300, 310, 311, 319; II: 25, 26, 341
 Глутаминаза I: 310, 319
 Глутаминовая кислота I: 26
 Глутаминсинтетаза I: 65, 300, 310, 311
 Глутатион I: 35, 352
 Глутатион-инсулин-трансгидрогеназа II: 254
 Глутатионпероксидаза I: 124, 162, 204
 Глутатионредуктаза I: 204
 Глюкагон I: 192, 193, 217, 223, 270, 271; II: 148, 159, 162, 247, 250, 263, 264—265, 272
 — аминокислотная последовательность II: 263
 — биосинтез и метаболизм II: 264
 — влияние на фосфорилазу I: 192—193
 — гипергликемический эффект I: 223
 — ингибирование липогенеза I: 288
 — скорость синтеза ферментов I: 102
 — физиологические эффекты II: 264—265
 Глюкантрансфераза I: 190, 191
 Глюкоза I: 140, 181, 182, 184, 186, 187, 188, 189, 190, 196, 197, 198, 199, 205, 210, 211, 259, 268—269, 290, 292, 294, 296, 297, 298; II: 291, 294, 295, 297
 — всасывание II: 294—295
 — в сыворотке и плазме, нормальное содержание II: 374, 382
 — катаболизм I: 189—190
 — липогенез I: 287
 — метаболизм I: 205, 207, 221, 268—269
 — мутаротация I: 142, 143
 — почечный порог I: 223
 — регуляция концентрации в крови I: 222
 — синтез жирных кислот I: 179, 180
 — структура I: 141
 — толерантность I: 224, 286
 — транспорт II: 142—143, 295
 Глюкозамин I: 146, 210, 211
 Глюкозан I: 146
 Глюкозиды I: 144; II: 294
 Глюкозилтрансфераза I: 189

- Глюкозилцерамид I: 157, 252, 253, 254
 Глюкозо-аланиновый цикл I: 221, 222, 312; II: 341
 Глюкозо-1,6-бисфосфат I: 115, 189
 Глюкозо-жирнокислотный цикл I: 297
 Глюкозооксидаза I: 121
 Глюкозо-1-фосфат I: 114, 189, 191, 192, 206
 Глюкозо-6-фосфат I: 114, 115, 182, 183, 189, 197, 200, 203, 206, 208, 210, 215, 222, 235, 269, 295, 297
 Глюкозо-6-фосфатаза I: 71, 190, 191, 197, 198, 209, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221; II: 30, 31
 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа I: 103, 200, 201, 202, 203, 204, 215, 271
 Глюкозурия I: 223—224, 255
 Глюкокиназа I: 182, 183, 185, 189, 197, 208, 215, 222
 Глюкокортикоидные гормоны II: 214—218
 — — классификация и механизм действия II: 216—218
 — — иммунологический ответ организма-хозяина II: 215
 — — реакция «борьба или бегство» II: 216, 221
 — — регуляция скорости транскрипции II: 217—218
 Глюкокортикоидный рецептор II: 216—217
 Глюкокортикоиды I: 215, 223, 270, 271; II: 124, 181, 205
 — синтез II: 208
 — скорость синтеза ферментов I: 102
 Глюконеогенез I: 168, 175, 178, 179, 182, 196—199, 215, 216, 294, 296, 298, 312; II: 214, 256—257
 — в печени, регуляция I: 219
 — при голодании I: 298
 — регуляция I: 214, 215, 216, 217
 Глюконолактонгидролаза I: 200, 201
 Глюкуронидаза, недостаточность II: 315
 β -Глюкуронидазы I: 368; II: 316
 Глюкуроновая кислота I: 205; II: 311
 Голодание I: 222, 229, 237, 240, 242, 260, 267, 278, 289, 297—298; II: 275, 277, 341
 Гомеостаз I: 76, 98—99, 212; II: 194—196, 199
 Гомеостаз фосфата II: 196
 Гомогентизат I: 327, 328
 Гомогентизатдиоксигеназа I: 124
 Гомогентизатоксидаза I: 328
 Гомокарнозин I: 346
 Гомологичные хромосомы, кроссинговер II: 71
 Гомополисахариды I: 140
 Гомосерин I: 27, 303, 304, 335, 336
 Гомоцистеин I: 27, 303, 304, 325, 335, 336
 Гомоцистинурия I: 325, 326; II: 282
 Гонадолиберин-ассоциированный пептид (ГАП) II: 170, 171, 172
 Гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин, ГнРГ) II: 170, 171, 179, 232, 238, 239
 Гонадотропин хорионический человека (ХГЧ) II: 149, 159, 170, 177, 178, 239, 240
 Гонадотропины II: 178—179
 Гормон адренотропный *см.* Адrenокортикотропный гормон
 — антидиуретический (АДГ) II: 159, 170, 171, 183, 184—185
 — ингибирующий высвобождение гормона роста II: 171.
См. также Соматостатин
 — лютеинизирующий (лютропин, ЛГ) II: 149, 159, 170, 177, 178, 231, 232, 233, 238, 239
 — лютеотропный II: 176—177. *См. также* Пролактин
 — меланоцит-стимулирующий (МСГ) I: 36, 270; II: 148, 159, 162, 170, 180, 183
 — паратиреоидный (ПТГ) II: 148, 156, 159, 193, 194—199
 — препаратиреоидный (препроПТГ) II: 194, 195
 — пролактин-ингибирующий (ПИГ) II: 171, 172. *См. также* Пролактостатин
 — роста-рилизинг-гормон II: 171. *См. также* Соматилиберин
 — роста человека, структура гена II: 173
 — тиреотропный (тиреотропин, ТТГ) II: 179—180
 — фолликулостимулирующий (ФСГ) II: 149, 159, 170, 177, 178, 232, 238, 239
 Гормон-рецепторный комплекс, связывание с ДНК II: 159
 Гормон-чувствительный элемент (ГЧЭ) II: 160
 Гормоны α_2 -адренергические II: 161
 — β -адренергические II: 161
 — сАМР как второй посредник II: 158, 161
 — биосинтез и превращения II: 148—149
 — гипоталамуса II: 170—172
 — гипофиза передней доли II: 172—183
 — гликопротеиновые II: 177—180
 — группы I, механизм действия II: 159—166
 — — II (пептиды), механизм действия II: 161—169
 — действие II: 158—169
 — желудочно-кишечного тракта II: 267—273
 — — — механизм действия II: 269—271
 — классификация II: 158—159
 — коры надпочечников II: 205—220
 — мозгового вещества надпочечников II: 221—227
 — поджелудочной железы II: 247—266
 — половых желез II: 228—246
 — регуляция метаболизма кальция II: 193—204
 — — по механизму обратной связи II: 149—150
 — рецепторы II: 149, 150—157
 — роста (ГР) I: 270, 271; II: 172, 173—176
 — — регуляция секреции по механизму обратной связи II: 174, 175
 — семенников II: 228—235
 — — биосинтез II: 228—230
 — стероидный надпочечников II: 205—220
 — тиреоидные II: 160
 — щитовидной железы I: 223, 270, 271; II: 186—192
 — — — регуляция синтеза и высвобождения II: 190—191
 — эффект аутокринный II: 147
 — — паракринный II: 147
 — яичников II: 235—244
 — — механизм действия II: 243—244
 — — регуляция и физиологическое действие II: 238—243
 Грамицидин S I: 35
 Гуаназа II: 16, 24
 Гуанилатциклаза II: 11, 166
 Гуанин II: 6, 7, 15, 16, 21, 22, 35; II: 73
 Гуанозин II: 7, 8, 9, 11, 16, 21
 Гуанозиндифосфат (GDP) II: 301
 Гуанозинмонофосфат (GMP) II: 19, 20, 21, 22, 23
 — циклический (с GMP) II: 5, 11, 166
 Гуанозинтрифосфат (GTP) I: 117, 178, 196; II: 345
 — — как кофактор ФЭ-2 II: 102, 103
 ГТРаза, инактивация II: 163
 Дебранчинг-фермент I: 191, 195
 Дегидрогеназа L-аминокислот I: 120
 — количественный анализ I: 68
 18-Дегидрогеназа, недостаточность II: 220
 NADH-Дегидрогеназа I: 123, 128
 Дегидрогеназы анаэробные I: 121, 123
 — аэробные I: 119, 120—121
 — зависимые от никотинамидных коферментов I: 121
 — флавопротеиновые I: 128
 — NAD-зависимые I: 121, 127, 130
 — NADP-зависимые I: 121
 7-Дегидрохолестерол, основные свойства II: 281
 Дегидроэпиандростерон (ДЭА) II: 205, 207, 208, 209, 229
 Дезаминирование аминокислот I: 178
 — окислительное I: 308—309
 Дезоксиаденилат II: 53
 2'-Дезоксиадениловая кислота (dAMP) II: 8
 5'-Дезоксиаденозилкобаламин I: 341, 342
 Дезоксиаденозин II: 53
 2'-Дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP) II: 8, 9
 Дезоксигемоглобин S I: 60—61
 Дезоксигуанилат II: 53

- Дезоксигуанозин ТП: 53
 11-Дезоксикортизол (соединение S) II: 207, 209, 210
 11-Дезоксикортикостерон (ДОК) II: 207
 Дезоксирибоза I: 144
 Дезоксирибонуклеаза (ДНКазы) II: 92, 290, 293
 Дезоксирибонуклеозидтрифосфат в синтезе ДНК II: 73, 74
 Дезоксисахара I: 144
 Дезоксикислотная кислота I: 282, 283
 Дезоксицитидилат II: 53
 Дезоксицитидин II: 27
 Дезоксицитидинкиназа II: 27
 Дезоксицитозин II: 53
 Деиодиназа II: 187
 Декарбоксилаза бактериальная II: 297
 — α -кетокислот I: 341
 Декарбоксилирование окислительное I: 177
 — — пирувата I: 186
 Дексаметазон II: 207
 Декстрины I: 140, 149
 Денатурация белков I: 48
 — ДНК II: 56
 Дендриты II: 344
 Дерепрессия ферментов I: 100—101
 Дерматансульфат II: 311, 312, 314, 316
 Десатураза I: 250
 Δ^9 -Десатуразная система I: 239, 240
 Δ -Десатуразы I: 240, 241
 Десатурация I: 240
 Десенсибилизация II: 153, 198
 Десмин II: 346
 Десмогестерол I: 275, 277
 Десульфиназа I: 324
 Диабет несахарный нефрогенный наследственный II: 156, 185
 — — — приобретенный II: 185
 — сахарный I: 166, 212, 224, 229, 256, 260, 265, 272, 284, 285, 286, 294; II: 254, 263, 278
 — — — инсулинзависимый типа I II: 263
 — — — — II (ИНСД) I: 286; II: 156, 263
 — — — метаболизм сорбитола I: 207
 — — — фруктозы I: 207, 208
 Диабетическая катаракта I: 207
 Диазонорлейцин II: 20
 Диацилглицерол(ы) I: 155, 250, 271; II: 168
 1,2-Диацилглицерол I: 249, 266; II: 290, 293
 Диацилглицерол-ацилтрансфераза I: 248, 249
 Диацилглицероллипаза I: 271
 1,2-Диацилглицеролфосфат (фосфатидат) I: 248, 249
 Дигидроксияцетон I: 140, 145
 — активный I: 201
 Дигидроксияцетонфосфат I: 182, 183, 197, 199, 207, 248, 249, 250
 Дигидроксияцетонфосфат-ацилтрансфераза I: 248
 5,6-Дигидроксииндол I: 352
 3,4-Дигидроксифенилаланин (ДОФА) I: 27, 352, 353; II: 222, 223
 1,25-Дигидроксистероидкальциферол II: 149
 Дигидролипоилдегидрогеназа I: 123, 186
 Дигидролипоилтрансфераза I: 186
 Дигидрооротаза(ы) I: 103; II: 25, 26, 32
 Дигидрооротатдегидрогеназа II: 25
 Дигидрооротовая кислота (ДГОК) II: 26
 Дигидротестостерон (ДГТ) II: 229, 231, 232, 233, 234, 235, 245
 Дигидроурацил (ДГУ) II: 28, 62
 Дигитонин I: 136
 Диеновые кислоты I: 153
 Δ^2 -транс- Δ^4 -цис-Диеноил-СоА-редуктаза I: 230, 231
 Диодтирозин (ДИТ) II: 186, 187, 189
 Димеркапрол I: 132
 Диметиладенин II: 6
 3,3-Диметилаллилпирофосфат I: 275, 276
 Динеин II: 345
 Динитрокрезол I: 132
 Динитрофенол I: 132
 Диоксигеназы I: 124
 Дипальмитиллецитин I: 156
 Дипептидазы II: 291, 294
 Дисахариды I: 140, 146, 147
 — структура I: 147
 Дисахаридурия II: 295
 Дисбеталипопротеинемия семейная I: 285
 Дисгенезия гонад II: 244
 Дислипопротеинемия I: 285—286
 Дисульфидные связи в белках I: 44
 Дифосфатидилглицерол I: 156, 249
 Дифтерийный токсин II: 107
 Диформетилорнитин как ингибитор I: 348
 Диффузия облегченная II: 139, 140—141
 — пассивная II: 138
 ДНК, апириимидинизация II: 80
 — апуринизация II: 80
 — бактериальная гираза II: 57
 — бороздка большая II: 113, 114
 — бороздки II: 56
 — гиперхромный эффект денатурации II: 56
 — деградация и репарация II: 79—81
 — делеции, вставки и перестройки II: 48
 — денатурация II: 56
 — диспергированные повторы длинные II: 70
 — — — короткие II: 70
 — ионизирующая радиация II: 79, 80
 — клонирование II: 40—41
 — кодирующая (матричная) цепь II: 54, 82
 — липкие концы II: 37, 38, 39, 40, 51
 — матричная цепь II: 73, 75
 — метод последовательной гибридизации II: 50
 — модель Уотсона и Крика II: 55
 — мутации I: 100
 — некодирующая II: 69
 — организация и репликация I: 64—81
 — основные свойства II: 35—36
 — повреждения химическими канцерогенами II: 355
 — полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) I: 74; II: 50
 — поперечные сшивки II: 79, 81
 — последовательности повторяющиеся (повторы) II: 69, 70
 — — уникальные II: 69
 — Прибнов-бокс II: 85, 86
 — «прыгающая» II: 72
 — рекомбинантные, технология II: 35—52
 — релаксированная II: 57
 — репликация II: 64, 73—81
 — — полуконсервативный механизм II: 57—58
 — — полунепрерывная II: 75, 76
 — рестриктазные карты II: 39
 — роль в канцерогенезе II: 356
 — секвенирование II: 43—44, 45
 — — методом Максама—Гилберта II: 44, 45
 — — — Сэнгера II: 44
 — синтез, инициация II: 73, 74
 — — прерывистая полимеризация дезоксирибонуклеотидов II: 75
 — — регуляция II: 78—79
 — — «репликационные пузыри» II: 76
 — — S-фаза II: 78, 79
 — структура II: 54, 56
 — суперспиральная II: 57, 78
 — топоизомеразы II: 57, 77, 78
 — транспозиции II: 72
 — тупые концы II: 37, 38, 39, 40, 52
 — фага λ , интеграция с хозяйским геномом II: 113

- — — лизогенный путь II: 114
- — — литический путь II: 114
- — — оператор (O_R) II: 114, 115
- — — промотор(ы) II: 115, 116, 117
- 5'-фланкирующая последовательность II: 36
- А-форма II: 55
- В-форма II: 53, 55, 57
- Z-форма II: 54, 55, 56
- фрагменты Оказаки II: 73, 75
- функция II: 57—58
- химерные молекулы II: 39—40, 41, 52
- химические свойства II: 53—54
- эксцизионная репарация II: 80
- энхансеры II: 36, 359, 360
- эукариотических организмов II: 64, 69
- ДНКаза I II: 67
- ДНК-зонды I: 74
- ДНК-копии (кДНК) II: 359
- ретровирусов, длинные концевые повторы II: 70, 359, 360
- ДНК-лигаза II: 75, 77, 80
- ДНК-полимераза РНК-зависимая II: 60, 78
- I II: 73
- гамма ($POI \gamma$) II: 76
- ДНК-топоизомераза II: 77, 78
- Долихол I: 155, 160, 276, 278; II: 305, 306
- биосинтез I: 276
- Долихолкиназа II: 305
- Долихол-Р-Р-полисахарид, синтез протеогликанов II: 311
- Долихолфосфат ($DoI-P$) II: 305, 306
- ДОФА-декарбоксилаза (ДД) I: 353; II: 223
- Дофамин I: 353; II: 171, 174, 181, 221, 222, 223, 225
- Дофамин- β -гидроксилаза (ДБГ) II: 223, 224, 225
- Дофамин- β -оксидаза I: 353
- Дрожжи, брожение I: 181
- Дыхательная цепь I: 119, 121, 123, 127—132, 133, 134, 135, 139, 174, 186, 187, 188, 227, 228
- Дыхательный контроль I: 112, 131, 132, 136, 221, 272
- Еноил-СоА-гидратаза I: 227, 228
- Еноилредуктаза I: 232, 233
- Енолаза I: 183, 185
- Железо I: 121, 123, 128
- в сыворотке, нормальное содержание II: 374, 382
- негемовое I: 128
- основные свойства II: 285
- Железопорфирины I: 356
- Железы языка II: 292
- Желтуха I: 369
- гемолитическая I: 369, 372
- идиопатическая хроническая I: 371—372
- холестатическая I: 372
- холеурическая I: 370, 371
- ядерная I: 370
- Желудок II: 286, 292, 383
- железы II: 292
- Желудочно-кишечный тракт, гормоны II: 267—273
- — — пищеварение и всасывание II: 274—298
- Желудочный ингибиторный полипептид (ЖИП) II: 254, 267, 268, 269, 271
- Желчные камни, образование II: 288
- кислоты I: 280, 281—283; II: 288
- — — биосинтез I: 281—283
- — — регуляция I: 283
- — — кишечно-печеночная циркуляция I: 281, 283
- пигменты I: 366—372
- — — образование I: 366—368
- соли I: 281, 284, 285; II: 288, 293
- Желчный пузырь, переваривание II: 293
- Желчь I: 281, 283, 286, 367, 368, 371; II: 287—289
- Жир(ы) I: 151, 256, 266, 267, 287, 288, 294, 295, 297, 318
- мобилизация I: 268, 270
- превращение в другие вещества I: 294—296
- Жирные кислоты I: 151—155, 215, 225—237, 252, 260, 262, 263, 265, 267, 294, 295, 296
- — активация I: 225—226
- — длинноцепочечные, биосинтез I: 233, 235
- — — регуляция окисления I: 294
- — — моноеновые I: 152, 153
- — — мононенасыщенные I: 152
- — — синтез I: 239—240
- — — моноэтенонидные I: 152
- — — насыщенные I: 152
- — — биосинтез I: 231—237
- — — незаменимые (НЖК) I: 238, 241—242, 244—245
- — — ненасыщенные I: 152—154, 230, 231, 238—242
- — — метаболизм I: 238—240
- — — окисление I: 230, 231
- — — *цис-транс*-изомерия I: 154, 242
- — — номенклатура I: 151—152
- — — окисление I: 218, 225—231
- — — и биосинтез I: 225—237
- — — регуляция I: 289—294
- — α - и ω -окисление I: 229
- — β -окисление I: 226—229, 230, 231, 269
- — полиеновые I: 152
- — полиненасыщенные I: 152
- — — перекисное окисление I: 231
- — — синтез I: 240
- — — уровень холестерина в крови I: 284
- — — эссенциальные (незаменимые) II: 278
- — полиферментный комплекс I: 232, 233, 234
- — полиэтенонидные I: 152
- — свободные (СЖК) I: 225, 226, 229, 256, 257, 258, 259—260, 265, 266, 267, 268, 269, 287, 288, 289, 291, 292, 293, 294, 297, 298
- — — β -окисление I: 292, 293
- — — эстерификация I: 292, 293
- — синтазный комплекс I: 231—234
- — синтез I: 179, 180, 231—236, 265
- — — регуляция I: 287—289
- Жировая ткань I: 271, 292, 293, 295, 297, 298; II: 149, 162, 175, 220
- — бурая, термогенез I: 272
- — метаболизм I: 268—270, 294, 295
- Зимогены I: 93; II: 289
- Зимостерол I: 275, 277
- Зонды молекулярные II: 43
- Идиотипы II: 325
- Идуронатсульфатаза II: 315, 316
- α -L-Идуронидаза II: 315, 316
- Изовалериановая ацидемия I: 341
- Изовалерил-СоА-дегидрогеназа I: 341
- Изoleyцин I: 25, 296, 299, 305, 311, 335, 337, 339, 340
- биосинтез I: 305
- катаболизм I: 335, 337, 339—341
- пищевая потребность II: 277
- Изомальтаза II: 291, 294
- Изомер оптический I: 142
- Изомераза(ы) I: 64; II: 290
- цис-транс*-Изомеразы I: 64
- $\Delta^{5,4}$ -Изомераза II: 209, 229
- Изомерия геометрическая I: 154
- сахаров I: 141—142
- Изопентинилпирофосфатизомераза I: 276
- Изоферменты (изозимы) I: 71—72
- Изоцитрат I: 174, 175, 235
- Изоцитратдегидрогеназа I: 174, 175, 177, 233, 235, 236
- NAD-зависимая митохондриальная I: 221

- 4-Имидазолон-5-пропионат I: 321
 Имидазолонпропионатгидролаза I: 321
 Имидазолпируват I: 321, 322
 Иминокислоты I: 26
 Иммуные ответные реакции на введение иммуногена II: 324
 Иммуноген II: 324
 Иммуноглобулин (IgG) тиреоид-стимулирующий II: 192
 Иммуноглобулины II: 121—123, 320, 321—325
 — домены II: 321
 — классы и типы цепей II: 322, 323
 — область вариабельная (V) II: 321, 322, 323
 — — гипервариабельная II: 323
 — — константная (C) II: 321, 322
 — переключение синтеза классов II: 122—123
 — свойства II: 322, 323
 — цепи легкие (L) II: 121, 321, 322, 323, 324
 — — тяжелые (H) II: 121—122, 321, 322, 324
 Иммунодефицит II: 29, 30, 31
 Иммуноэлектрофорез I: 258
 IMP-циклогидролаза II: 17
 Инвертаза I: 100
 Ингибирование аллостерическое, кинетика I: 107—108
 — — кооперативность I: 107
 — кооперативное I: 105
 — кумулятивное I: 105
 — по принципу обратной связи I: 104—106, 107, 108, 110
 — — — — — множественное I: 105
 — согласованное (мультивалентное) I: 105
 Ингибитор-I I: 192, 193, 194
 Ингибиторы трансляции II: 105, 107
 Индол II: 298
 Индол-3-ацетат I: 350
 Индол-5,6-хинон I: 352
 Индуктор нерасходуемый II: 113
 Индукция синтеза ферментов I: 100
 Инициация канцерогенеза II: 355—356
 Инозин II: 15, 16, 22
 Инозинмонофосфат (IMP) II: 17, 19, 21, 22, 23, 342
 Инозинтрифосфат (ITP) I: 196
 Инозитолтрифосфат II: 145
 Инсулин I: 49, 193, 194, 215, 222—223, 269, 270, 271, 272; II: 148, 156, 247—263
 — биосинтез II: 249—253
 — влияние на экспрессию генов II: 262
 — гипогликемия I: 294
 — глюконеогенез II: 256—257
 — комплексы с цинком II: 249
 — липогенез II: 256
 — метаболизм II: 254
 — — белков II: 257
 — механизм действия II: 259—262
 — расщепление проинсулина II: 251
 — регуляция секреции II: 253—254
 — синтез проинсулина II: 249, 250, 251
 — стимуляция липогенеза I: 288
 — структура II: 248—249
 — — проинсулина II: 250
 — трансляция мРНК II: 262
 — утилизация глюкозы II: 256
 — фосфорилирование-дефосфорилирование белка II: 261
 — химические свойства II: 248—249
 — человека, ген II: 252, 253
 Инсулиновая недостаточность II: 255, 257, 258
 Инсулиновый рецептор II: 259, 263, 264
 Инсулиноподобный фактор роста (ИФР) II: 154, 159, 168, 170, 174
 — — — 1 (ИФР-1) II: 174, 175, 263, 264
 — — — 2 (ИФР-2) II: 175, 263, 264
 Инсулин-специфическая протеиназа II: 254
 Интрон(ы) I: 38; II: 36, 37, 51, 52, 69—70, 88, 94
 Инулин I: 149
 Иод, основные свойства II: 285
 Иодид, метаболизм II: 187—189
 Ионофоры I: 139; II: 139
 Кадаверин I: 348; II: 298
 Калий II: 283, 377, 382
 Калликреин II: 328
 Кальмодулин I: 192, 193, 220; II: 165, 167, 335, 338, 339, 345
 Кальсеквестрин II: 338
 Кальций II: 166—168, 193—204, 283, 289, 293, 371, 382
 — гомеостаз II: 194—196, 199
 — действие гормонов II: 166, 167
 — как медиатор действия гормонов II: 167—168
 — метаболизм II: 166—167
 — регуляция метаболизма гормонами II: 193—204
 Кальций-связывающий белок (КСБ) II: 193, 202
 Кальцитонин (КТ) II: 159, 161, 193, 197, 203—204
 — как опухолевый маркер II: 352
 — механизм действия II: 203—204
 — структура II: 203
 Кальцитриол II: 193, 194, 195, 199—202
 — биохимия II: 200—201
 — механизм действия II: 201—203
 — рецептор II: 201
 Кальцификация эктопическая II: 193
 Канцерогенез химический II: 353, 355—356
 Канцерогены химические II: 353, 354, 355
 Карбамоиласпартат II: 26
 Карбамоилфосфат I: 114, 313, 314, 315; II: 25, 26
 Карбамоилфосфатсинтаза I: 313, 314, 315; II: 25, 26, 28
 Карбоангидраза I: 57, 59; II: 286
 Карбоксин I: 132
 Карбоксипептидаза I: 67; II: 289, 293
 Карбомицин I: 146
 Кардиолипид I: 156, 248, 249
 — в митохондриях I: 136
 Кариотип человека II: 69
 Карликовость II: 175, 176
 Карнитин I: 226, 227, 229
 Карнитин-ацетилтрансфераза I: 226
 Карнитин-ацилкарнитин-транслоказа I: 226
 Карнитин-пальмитоилтрансфераза I: 226, 229, 293
 Карнозин I: 345—346
 Карнозиназа сывороточная, недостаточность I: 346
 β-Каротин II: 281
 — в сыворотке, нормальное содержание II: 382
 Карциноид I: 350
 Катаболизм I: 214
 Катаболическая репрессия II: 112
 Катаболические процессы I: 112
 — пути I: 99, 165
 Кatalаза I: 120, 124, 308, 309, 357
 Катализ, ионы металлов I: 95—97, 104
 — кислотный I: 95
 — механизм «пинг-понг» I: 94—95
 — основной I: 95
 Катализаторы белковые I: 63
 — роль в образовании переходных состояний I: 77
 Каталитический центр ферментов I: 104, 107
 — — — — — модель индуцированного соответствия I: 79—80
 — — — — — «ключ-замок» I: 79
 Катепсин B II: 197
 — D II: 197
 Катехоламины I: 145, 219—220, 271; II: 147, 148
 — биосинтез II: 222—223
 — классификация и механизм действия II: 225—227
 — метаболизм II: 223—224
 Катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) II: 224, 225
 Катехолоксидаза I: 120
 Катехол-эстрагены II: 236

- Кахексия I: 300
 Квашиоркор I: 300, 307; II: 274, 277, 295
 Кератансульфат(ы) II: 312, 313, 316, 317
 Кератины II: 346
 Кетоацидоз I: 289
 Кетоацилредуктаза I: 232, 233
 3-Кетоацилсинтаза I: 232, 233, 234
 3-Кетоацил-фермент I: 233, 234
 3-Кетоацил-СоА-редуктаза I: 236
 3-Кетоацил-СоА-синтаза I: 236
 α -Кетобутират I: 335, 336
 Кетогенез I: 171, 274, 289—294, 298
 — регуляция I: 292—294
 α -Кетоглутарат I: 174, 175, 178, 179, 235, 296, 300, 311, 318, 319, 332, 333, 355
 α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс I: 174, 175
 Кетоза(ы) I: 140, 145, 194, 229, 267, 289, 290, 292, 293, 294
 Кетоизомераза I: 203
 Кетонемия I: 289, 292
 Кетоновые тела I: 151, 171, 215, 289, 290, 291, 293, 294, 297, 298
 Кетонурия I: 289, 341
 — скачкообразная I: 341
 3-Кетосфинганин I: 252
 3-Кетосфинганин-редуктаза I: 252
 3-Кетотиолаза I: 227, 228
 Кефалин I: 156, 157, 249
 Киназа(ы) I: 192, 193, 194
 — редуктазы I: 278
 — фосфорилазы I: 192, 193, 194; II: 261
 — Ca^{2+} /кальмодулинчувствительная I: 193
 Кинетика, метод остановленной струи I: 91—92
 Кинетохор II: 345
 Кининоген высокомолекулярный II: 328, 329
 Кинуренин I: 334
 Кинурениназа I: 334
 Кинуренин-антранилатный путь I: 333
 Кинуренин-формилаза I: 334
 Кислород, поглощение II: 275
 Клатрин II: 144
 Клетка(и), нормальный состав среды II: 127—128
 — состав II: 128
 — Лейдига II: 228, 232
 — Сертоли II: 178, 228, 232
 Клеточная подвижность II: 342—347
 Клофибрат I: 229, 285, 337
 Кобаламин I: 339; II: 275, 279
 Кобальт, основные свойства II: 285
 Ковалентная модификация ферментов I: 214, 217—218
 Ковалентные связи, образование I: 65, 78
 — разрыв и образование I: 78—79
 Кодон(ы) II: 94—96, 97, 98, 118, 119
 — инициаторный II: 102
 — «качание» II: 96, 97
 Колипаза II: 289
 Коллаген I: 302, 303, 304; II: 105
 — взаимодействие с гликозаминогликанами и протеогликанами II: 317
 — синтез II: 347—349
 — тройная спираль II: 347, 349
 Коллагеназа, тип IV, роль в метастазировании II: 366
 Коллагеновые фибриллы II: 347, 349
 Коллагенозы наследственные II: 350
 Компактин I: 275, 284
 Компартиментация ферментов, «челночные механизмы» I: 103
 Комплекс полиферментный, синтез жирных кислот I: 232, 233, 234
 Комплексы макромолекулярные, регуляция ферментативной активности I: 103—104
 — тройные фермент—металл—субстрат I: 96—97
 Конканавалин А (con A) I: 150; II: 302, 303
 Коннексоны II: 146
 Константа равновесия I: 83—84
 транс-Конфигурация I: 242
 цис-Конформация I: 238
 Копропорфиноген(ы) I: 359, 360, 361, 362
 Копропорфиноген-оксидаза I: 359, 360, 363, 365
 Копропорфирины I: 357, 362
 Копропорфирия наследственная I: 364, 365
 Копростерол (копростанол) I: 160, 281
 Кора надпочечников I: 270; II: 205
 — — гормоны II: 205—220
 — — биосинтез II: 207—210
 — — зоны II: 205
 Корепрессор I: 101
 Кортизол II: 171, 205, 207
 — в плазме, нормальное содержание II: 383
 — секреция II: 211
 Кортизон (соединение E) II: 207
 Кортикостероид-связывающий глобулин (КСГ) II: 210, 230, 237
 Кортикостерон II: 205, 207, 208
 Кортикотропин-рилизинг-гормон (кортиколиберин, КРГ) II: 159, 161, 170, 171, 181
 Космиды, клонирование ДНК II: 40, 41
 Кости, минерализация II: 193
 Косубстрат I: 124
 Кофеин I: 270, 271; II: 6, 7
 Кофермент А (CoA) I: 177, 215, 233
 — синтез I: 178
 — Q I: 127, 128, 130
 Коферменты I: 65—66, 104
 — как вторые субстраты I: 65—66
 — никотинамидные I: 121—123
 Крахмал I: 146, 148, 149; II: 289, 292, 293
 Креатин I: 115, 116, 354
 — биосинтез I: 344, 354
 — мочи, нормальное содержание II: 373
 Креатинин I: 354
 — в сыворотке и плазме, нормальное содержание II: 373, 382
 Креатинкиназа I: 136
 Креатинфосфат I: 113, 114, 354; II: 332, 340
 Креатинфосфокиназа (КФК) II: 340
 — сыворотки, нормальное содержание II: 372—373, 382
 Кретинизм II: 191
 Кровь, плазма II: 319—325
 — свертывание II: 325—330
 — — активация фактора X II: 327
 — — амплификация II: 328
 — — пути внутренний, внешний и общий конечный II: 325, 328
 — функции II: 319
 Кроссинговер гомологичных хромосом II: 71
 — неравный II: 71
 Кротоназа I: 338
 Ксантин II: 6, 15, 16, 21, 23, 24
 Ксантиндегидрогеназа I: 120
 Ксантиновые камни II: 30, 31
 Ксантиноксидаза (ксантиндегидрогеназа) I: 103, 120; II: 16, 24, 30
 — недостаточность II: 30, 31
 Ксантинурия II: 30, 31
 Ксантинозинмонофосфат (ХМР) II: 19
 Ксантомы I: 286
 Ксантиуренат I: 334, 335
 Ксенобиотики, метаболизм II: 354
 Ксеродерма пигментная II: 81
 Ксерофтальмия II: 274
 Ксилитол I: 205, 206, 207
 Ксилулозо-5-фосфат I: 200, 201, 203, 205, 206

Кумарин II: 330

Лайнуивера—Бэрка график I: 86—87, 89

Лактаза II: 291, 294, 295

— недостаточность II: 295

Лактат I: 178, 181, 185, 196, 197, 198, 296

— в крови, нормальное содержание II: 382

Лактатацидоз I: 186; II: 282

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) I: 183, 185, 196, 324, 354, 355

— в сыворотке, нормальное содержание II: 375, 382

— изоэзимы I: 71—72

Лактоген плацентарный II: 172, 177

Лактоза I: 140, 147, 209, 210; II: 291, 294, 295

— гидролиз β-галактозидазой II: 111

— синтез I: 209

Лактозосинтаза I: 209, 210

Ламеллоподии II: 343, 344

Ланостерол I: 275, 277

Лейкодистрофия метахроматическая I: 254

Лейкотриены (ЛТ) I: 153, 154, 238, 241, 242, 243, 245—246

Лейцин I: 25, 299, 305, 311, 327, 337, 338

— катаболизм I: 337, 338

— пищевая потребность II: 277

Лей-энкефалин II: 273

Лектины I: 150; II: 302—303

Лецитин I: 156, 249, 251

Лецитин: холестеролацилтрансфераза (ЛХАТ) I: 251, 264, 280, 281, 286

— семейная недостаточность I: 286

Лиаза(ы) I: 64; II: 229

— классификация I: 64

C₁₇₋₂₀-Лиаза II: 229, 231

Лигазы I: 65; II: 75

Лигирование II: 39—40, 51

Лигноцериновая кислота I: 152, 252

Лизилгидроксилаза I: 304

Лизин I: 26, 299, 305, 308, 327, 332—333; II: 277

— биосинтез I: 305

— катаболизм I: 332

Лизолецитин I: 157, 251, 252, 264

Лизосомы II: 143

Лизофосфолипаза I: 251

Лизофосфолипиды I: 157, 251; II: 290, 296

Лизоцим, каталитический центр I: 80—81

Лимонная кислота I: 172

Лимфома Беркитта II: 357

— — реципрокная транслокация II: 360, 361

Линолевая кислота I: 230, 231, 238, 239, 240, 241, 242; II: 275, 278

α-Линоленовая кислота I: 238, 239, 240, 241; II: 278

Липаза гормонзависимая жировой ткани I: 214

— гормон-чувствительная I: 268, 269, 270

— панкреатическая II: 289, 293

— печени гепарин-освобождаемая I: 263

— языка II: 286, 287, 292

Липидный бислой II: 130—131

Липиды I: 151—164; II: 382

— всасывание II: 295—296

— метаболизм I: 167, 171, 263, 264, 287—297

— методы разделения и идентификации I: 162—164

— нейтральные I: 151

— перекисное окисление I: 160—161

— пероксиды I: 267

— пищевая потребность II: 278

— плазмы крови I: 256—259

— транспорт I: 169

— и запасание I: 256—272

— физические свойства I: 155

Липогенез I: 168, 170, 215, 231, 235, 236, 268, 269, 271, 287—289

— регулирующие факторы I: 287—289

— регуляция ацетил-СоА-карбоксилазы I: 288

— — гормональная I: 288—289

Липоксигеназный путь I: 242, 243, 245

Липоксигеназы I: 161, 245

Липолиз I: 170, 268, 269, 270

— регуляция I: 271

α-Липопротеин I: 258

β-Липопротеин I: 258, 280, 285, 286

Липопротеинлипаза I: 170, 259, 261, 262, 263, 270, 285; II: 317

— семейная недостаточность I: 285

Липопротеины I: 151, 170, 244, 256, 260, 262, 263, 264, 266, 285, 295

— высокой плотности (ЛПВП, α-липопротеины) I: 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264—265, 266, 279, 281, 284, 286

— низкой плотности (ЛПНП, β-липопротеины) I: 257, 258, 259, 262, 264, 279—280, 281, 284, 285, 286

— — — рецепторы I: 265, 279—280

— очень низкой плотности (ЛПОНП) I: 171, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 279, 280, 281, 284, 285, 286

— средней плотности (ЛПСП) I: 257, 259, 262, 264, 280, 284

Липосомы I: 163, 164; II: 132, 133, 290

Липотропин (ЛПГ) II: 159, 161, 170, 180

β-Липотропин (β-ЛПГ) I: 35, 36; II: 182

Липотропный фактор I: 267

Литохоловая кислота I: 282, 283

Магний I: 182, 200; II: 284

— сыворотки, нормальное содержание II: 375—376, 382

Макроэлементы II: 280, 282, 283—284

Макроэргическая связь I: 177

Малат I: 175, 176, 197, 198, 235, 236

Малатдегидрогеназа I: 71, 137, 175, 176, 177, 235, 236

Малатный челночный механизм I: 137

Малонат, цикл лимонной кислоты I: 175

Малонил-СоА I: 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 240, 241, 293

— биосинтез I: 231, 232

Мальтаза (α-глюкозидаза) II: 291, 294

— кислая I: 195

Мальтоза I: 140, 147; II: 294

Маммотропин II: 176

Манноза II: 142, 144, 145, 150, 259

Маразм II: 277

Марганец I: 185; II: 285

Масс-спектрометрия II: 300

Мевалонат I: 274, 275, 276, 277

Мевалонаткиназа I: 276

Мевинолин I: 275, 284

Медь в оксидазах I: 119, 120

— — сыворотке, нормальное содержание II: 371, 382

— основные свойства II: 285

Меланины I: 351—353

— биосинтез I: 351—352

Меланогенез II: 183

Меланопротеин I: 351

Меланосомы I: 351

Меланоциты I: 351, 353

Мелатонин, биосинтез и метаболизм I: 350, 351

Мембрана(ы), активный транспорт II: 139, 141—142

— амфифильная природа II: 129—130

— асимметрия II: 131—132

— включение белков, сигнальная гипотеза II: 136, 137, 138

— — — триггерная гипотеза II: 136—137, 138

— жидкостно-мозаичная модель структуры II: 133—135

— искусственные II: 133

— липидные бислоиные, коэффициенты проницаемости воды II: 131

— — образование I: 163, 164

— липиды II: 128—130

- — организация II: 130—131
- митохондриальная I: 132
- — транспортные системы I: 138—139
- сборка II: 135—137
- структура, сборка и функции II: 127—146
- текучесть II: 134, 135
- транспортные системы II: 139—140
- — — антипорт II: 140
- — — котранспорт II: 140
- — — симпорт II: 140
- — — унипорт II: 140
- ферментные маркеры II: 131
- Менахинон, основные свойства II: 281
- Менопауза II: 242
- Менструальный цикл II: 238—239
- Меркаптаны II: 298
- 3-Меркаптопируват I: 325
- 3-Меркаптопируватцистеин-дисульфидуря I: 326
- 6-Меркаптопурин II: 12, 13, 20
- Меромиозин легкий (ЛММ) II: 335, 336
- тяжелый (ТММ) II: 335, 336
- Меромиозины II: 335
- Метаболизм промежуточный на уровне субклеточном I: 171
- — — — тканей и органов I: 168—171
- Метаболиты I: 99
- Метаболические пути I: 165, 166, 212—214
- — локализация I: 168—171
- Метакрил-СоА I: 338, 340
- Металлотионеин II: 124
- Металлоферменты I: 96
- Металлофлавопротеины I: 120, 128
- Метан II: 298
- Метанефрины II: 224
- Метастазирование II: 365—366
- Метгемоглобинемия I: 60
- N⁵,N¹⁰-Метенилтетрагидрофолат II: 17, 19
- Метилазы сайт-специфические II: 37
- N-Метил-4-аминоазобензол II: 353
- 2-Метил-3-аминопропионат I: 28
- α-Метилацетоацетил-СоА I: 340
- α-Метил-β-гидроксibuтирил-СоА I: 340
- 3-Метилгистидин II: 341
- транс-Метилглутаконатный шунт I: 275, 276
- β-Метилглутаконил-СоА I: 338, 339
- N⁷-Метилгуанин II: 6
- N⁵,N¹⁰-Метилентетрагидрофолат I: 322; II: 19, 25
- β-Метилкротонил-СоА I: 337, 338, 339
- Метилксантины I: 270, 271
- Метилмалонат I: 339, 341
- Метилмалонил-СоА I: 198, 335, 339, 340, 341, 342
- Метилмалонил-СоА-изомеразы I: 198
- Метилмалонил-СоА-мутаза I: 339
- Метилмалонил-СоА-рацемазы I: 198
- Метилмалоновая ацидурия I: 198, 342; II: 282
- Метилпентозы в гликопротеинах I: 150
- Метилтиоаденозин I: 349
- 5-Метилцитозин II: 6
- Метионил-тРНК II: 102, 103
- Метионин I: 25, 267, 296, 299, 303, 305, 335, 336, 346, 349; II: 10
- биосинтез I: 305
- катаболизм I: 335—336
- превращение в пропионил-СоА I: 335, 336
- 3-Метокси-4-гидроксиминдальная кислота II: 224
- 5-Метоксинидол-3-ацетат I: 350, 351
- 5-Метокситриптами I: 350, 351
- Мет-энкефалин II: 273
- Миелома II: 325
- Микроворсинки II: 342, 343, 344
- Микросомальные системы удлинения цепей жирных кислот I: 237, 239, 240
- Микросомы, цитохром P-450 I: 124
- Микротрубочки II: 342, 344-345, 346
- Микрофиламенты II: 342
- Микроэлементы II: 282, 285—286
- Минерализация костей II: 193
- Минералокортикоиды II: 205
- синтез II: 207—208
- Минеральные вещества, потребность II: 280, 282, 283—284, 285—286
- Мноацетилаткиназа II: 341
- Миоглобин(ы) I: 52—55, 56, 356; II: 341
- Миозин II: 334, 335, 338, 339, 340, 344
- Миозиновые филаменты II: 334, 337
- Миоинозитол I: 156, 157; II: 168
- Мнокиназа II: 20
- Мнофибрилла II: 333
- Мнофосфорилаза I: 195
- Миссенс-мутации II: 99—100
- Митотическое веретено II: 344
- Митохондриальная мембрана I: 132—133, 135, 136—139, 174, 241
- — — транспортные системы I: 136—139
- Митохондриальный матрикс I: 174
- Митохондрии I: 121, 127, 131
- дыхательная цепь, организация I: 127—130
- энергозависимый ионный транспорт I: 138
- Михаэлиса константа I: 85—87
- Михаэлиса—Ментен уравнение I: 85—88
- — — ограничения I: 87—88
- Мицеллы I: 163, 164; II: 130, 133, 288
- дисковидные II: 290
- Мозг, аминокислоты I: 311—312
- Молибден I: 121; II: 285
- Молочная железа и лактация II: 241
- Моноаминоксидаза (МАО) I: 119, 120, 136, 350, 351; II: 224, 225
- Моноацилглицерол I: 155, 248; II: 290, 291, 293, 295—296
- Моноацилглицерол-ацилтрансфераза I: 248, 249
- Моноацилглицерофосфат-ацилтрансфераза I: 136
- Моноеновые кислоты I: 152, 153
- Моноидтирозин (МИТ) I: 27; II: 186, 187, 189
- Мономеры I: 47
- Монооксигеназы I: 124; II: 354, 355
- Моносахариды I: 140, 143; II: 291, 295, 297
- Моноэтенонидные кислоты I: 152
- Мотилин II: 268, 269, 270, 272
- Мочевая кислота I: 120; II: 6, 15, 16, 24—25, 380—381
- — — выделение из организма I: 307
- — — образование аллантиона II: 24
- — — из пуриновых нуклеозидов II: 16
- Мочевина I: 306, 307, 309, 313—316; II: 380
- Муколипидозы II: 311, 315, 316
- Мукополисахаридозы II: 299, 311, 315, 316
- Мукополисахариды I: 149; II: 299
- Мукопротеины I: 150
- Мутагенная активность, определение по методике Эймса II: 355
- Мутагены II: 355
- Мутаротация I: 142, 143
- Мутации II: 70, 98—100
- глобиновых генов II: 98—99
- миссенс-эффект II: 98
- сдвига рамки считывания II: 100
- точечные II: 361, 362
- транзиции II: 98
- трансверсии II: 98
- Мышцы II: 332—342
- аминокислоты I: 311
- гладкие II: 332, 337, 338, 339, 340
- гликоген I: 189

- молекулярная функция II: 336—337
- поперечнополосатые II: 332, 333, 334, 337, 338, 339, 340
- — структура II: 333—334
- сердечные II: 332, 337, 338
- скелетные I: 181; II: 332, 337, 340, 341
- — гликолиз I: 181
- — метаболическая функция I: 168
- сокращение I: 181; II: 333, 337, 338, 339

Надпочечники, мозговой слой II: 221

Натриевый насос II: 294

Натрий II: 283, 378, 382

Нейраминидазы II: 302

Нейраминавая кислота I: 150

Нейрин II: 297

Нейромедиаторы II: 147

Нейротензин II: 268, 269, 273

Нейрофизины II: 183

Нейрофиламенты II: 346

Нексин II: 345

Неомицин I: 285; II: 298

Нервная система парасимпатическая II: 221

— — симпатическая I: 270—271; II: 221

Нервный импульс, передача II: 142

Нервоновая кислота I: 252

Нефроз липоидный I: 284

Ниацин I: 121, 177; II: 275, 279, 282

Нигерицин I: 139

Никотинамид I: 66, 121; II: 279

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) I: 121, 122, 123, 125, 177, 181, 215, 227, 228

— восстановленный (NADH) I: 124, 125, 176, 181, 215

Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) I: 121, 122, 125, 202, 233, 234, 235, 236, 249

— восстановленный (NADPH) I: 124, 125, 204, 231, 234, 236, 237, 239, 249

Никотинамидные коферменты, механизм окисления и восстановления I: 121, 123

Никотиновая кислота I: 121, 271, 335; II: 279

Ник-трансляция II: 51

Нингидрин I: 24, 28

л-Нитрофенилацетат I: 91—92

Нозерн-блоттинг II: 43, 51

Нонсенс-кодон(ы) II: 95, 96, 98

Норадреналин I: 192, 269, 270, 271, 272, 353; II: 221, 222, 223, 225, 227, 382

Нуклеазы II: 92—93

Нуклеиновые кислоты, структура и функция II: 53—63

Нуклеозидазы II: 291, 294

Нуклеозиддифосфаткиназа I: 117; II: 20

Нуклеозидмонофосфаткиназа I: 117; II: 20

Нуклеозиды II: 7, 8, 9, 13, 15, 16, 22

Нуклеоплазмин II: 66

Нуклеопротеиновые частицы малые ядерные II: 63

Нуклеопротеины в хроматидах II: 68

Нуклеосомный кор II: 66

Нуклеосомы II: 64, 65, 66

Нуклеотидазы II: 15

Нуклеотидсахара II: 301—302

Нуклеотиды II: 5—14, 15, 17—22, 26—28

Обмен основной II: 276

— промежуточный I: 165—171

Ожирение I: 284, 286; II: 156, 274, 292

Окисление I: 118

— биологическое I: 118—126

— жирных кислот длинноцепочечных, регуляция I: 293, 294

Окислительно-восстановительный потенциал I: 118—119

Окислительное дезаминирование I: 308—309

Оксалоацетат I: 172, 173, 175, 176, 178, 179, 196, 197, 235, 236, 293, 295, 296, 301, 318

Оксалосукцинат I: 174, 175

Оксигемоглобин I: 185

Оксигеназы I: 120, 124

Оксидаза(ы) I: 120, 124; II: 354

— аминокислот I: 308—309

— жирных кислот I: 227

Оксидоредуктазы I: 64, 67, 119

Оксидосквален: ланостерол-циклаза I: 275, 277

Окситоцин I: 220

Октозы I: 140

Олеиновая кислота I: 153, 238, 239, 240

Олигомеры I: 47

Олигомицин I: 132

Олигосахаридазы II: 291

Олигосахарид-пирофосфорил-долихол II: 305, 306, 307

Олигосахарид-трансфераза II: 306, 307

Олигосахариды I: 140; II: 291, 294, 304, 308, 309, 310

— процессинг II: 306—307

Онкоген вирусный (*v-onc*) II: 357, 359

— клеточный (*c-onc*) II: 359

Онкогены II: 357—363

— клеточные, трансфекция II: 359

— механизм действия II: 362, 363

— ретровирусов II: 357—358

Оператор II: 112, 113, 114

Операторный локус II: 112, 113

Оперон I: 100

— триптофановый (TRP), аттенуация II: 118

— — транскрипция II: 118—119

Лас-оперон II: 111—113

— структурные и регуляторные гены II: 111

Опиоиды II: 159, 161

Оптическая активность I: 142

Опухолевые клетки, изменения биохимические II: 365

— — свойств поверхности II: 365—366

— маркеры, использование при диагностике II: 352

Опухоли, прогрессия II: 365

Органификация II: 189

Орнитин I: 27, 35, 296, 313, 320, 347, 349; II: 298

Орнитин-декарбоксилаза, биосинтез полиаминов I: 347, 349

Орнитин-транскарбамоилтрансфераза I: 314, 315; II: 32

Оротат-фосфорибозилтрансфераза II: 25, 27, 32, 33

Оротидилат (оротидинмонофосфат, OMP) II: 25, 26, 27

Оротидилатдекарбоксилаза (OMP-декарбоксилаза), недо-

статочность II: 32, 33

Оротовая ацидурия II: 32, 33

Оротовая кислота II: 25, 26, 27, 32, 33

Осморецепторы II: 184

Остеомалация II: 199, 203, 280

Остеопороз II: 216, 242, 274, 297

Пальмитолеиновая кислота I: 238, 239

Панкреатический полипептид II: 247, 250, 265, 267, 268

Пантотеновая кислота I: 66, 177, 178, 232; II: 275, 279

Паракринный эффект II: 267

Паратиреоидный гормон (ПТГ), биохимия II: 196—197.

См. также Гормон паратиреоидный

— — механизм действия II: 198

— — протеолиз II: 197

Паращитовидные железы II: 196, 197

Пентагастрин II: 272

Пентаеновые кислоты I: 153

Пентахлорфенол I: 132

Пентозаны I: 140

Пентозофосфатный путь I: 167, 199—204, 205, 206, 214, 215, 217, 235, 269, 270, 288

Пентозурия идиопатическая I: 205, 207

Пентозы I: 140, 143, 150, 205

Пепсин I: 64; II: 287, 292

Пепсиноген II: 287, 292

С-Пептид II: 250, 251, 252

- Пептидилтрансфераза II: 102
 Пептидил-тРНК II: 102, 103, 104, 106
 Пептидная связь I: 43–44
 Пептиды I: 33–41
 — автоматический синтез I: 40–41
 — ионные формы I: 34
 — методы разделения I: 35–36
 — первичная структура I: 34
 — ПОМК, функции II: 181
 Переаминирование I: 178, 307–308, 337
 Пероксидаза(ы) I: 120, 123–124, 242, 244
 Пероксисомы I: 124
 Печеночная кома I: 309
 Печень I: 219–220, 260, 261, 262, 264, 265, 289, 290, 295, 297, 311; II: 293
 — гликоген I: 189, 219
 — жировое перерождение I: 266–267
 — и кишечник, аминокислоты I: 311
 — катаболизм хиломикронов I: 262, 264
 — кетоновые тела I: 289–290
 — метаболизм липидов I: 261, 262, 264, 265
 — — фруктозы I: 207
 — метаболическая функция I: 168
 — окисление жирных кислот длинноцепочечных I: 294
 — паренхиматозные клетки I: 260
 — переваривание II: 293
 Пиерицидин A I: 131
 Пиноцитоз I: 260; II: 144, 187
 Пиридоксаль, основные свойства II: 279
 Пиридоксальфосфат I: 192, 252, 307, 333, 334
 Пиридоксамин, основные свойства II: 279
 Пиридоксин, основные свойства II: 275, 279, 282
 Пиримидин(ы) II: 5, 6, 15, 25–29, 31–33
 — биосинтез II: 25–27
 — — регуляция II: 28
 — катаболизм II: 27
 — нарушение метаболизма II: 31–33
 Пиримидиновые нуклеотиды, метаболизм II: 15, 25–29, 31–33
 Пироглутамилгистидилпролинамид I: 35
 Пироглутаминовая кислота I: 35
 Пирофосфатаза неорганическая I: 116–117, 189
 Пирофосфомевалонатдекарбоксилаза I: 276
 GlcNAc-Пирофосфорилдолихол II: 305, 306
 Пируват I: 116, 178, 179, 180, 181, 183, 185, 186, 187, 196, 197, 208, 210, 235, 236, 293, 301, 318, 322, 323, 324, 325, 326, 327
 — окисление I: 181–188
 Пируватдегидрогеназа I: 179, 180, 187, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 235, 270, 295, 326; II: 261
 — регуляция липогенеза I: 288
 Пируватдегидрогеназный комплекс I: 186, 322
 Пируваткарбоксилаза I: 178, 196, 197, 215, 218, 293
 Пируваткиназа I: 183, 185, 197, 215, 216; II: 261
 Питание II: 274–284
 Пищеварение II: 15, 284–291, 292–294
 — в желудке II: 286–287
 Пищевые источники, теплота сгорания и энергия II: 275
 Плазма крови, белки II: 319–325
 Плазмалогены I: 157, 250
 Плазмиды как векторы для клонирования II: 40, 41, 51
 Плазмин II: 330
 Плазминоген II: 330
 Плацента, гормоны, нормальное содержание II: 383
 Плацентарные лактогены (ПЛЛ) II: 240
 Поджелудочная железа, гормоны II: 247–266
 — — островки Лангерганса II: 247
 — — пищеварение II: 289, 292
 Пол гонадный II: 244
 — фенотипический II: 245–246
 — хромосомный II: 244
 Полиаминоксидаза, пероксисомы печени I: 349
 Полиамины I: 347, 348, 349
 — катаболизм I: 349, 350
 Полидипсия II: 255
 Полиеновые жирные кислоты I: 152, 238, 241
 Полимераза бета (Pol β) II: 76
 Полимеразы альфа (Pol α) II: 76
 Полинуклеотидаза(ы) II: 15, 291, 294
 Полиолдегидрогеназа I: 208
 Полипептид(ы) I: 33, 34, 37–38; II: 248, 263, 267, 269, 271
 — желудочный ингибиторный II: 254, 267, 268, 269, 271
 — линейные I: 38
 — определение структуры методом Эдмана I: 38–39
 Полипреноидные соединения I: 160
 Полирибосомы (полисомы) II: 95, 105
 Полисахариды I: 140, 146, 148, 149–150; II: 311, 314
 Полиурия II: 255
 Полифенолоксидаза I: 120
 Полицитемия I: 60
 Полиэтиеноидные кислоты I: 152
 Половая дифференцировка II: 244–246
 Половые железы, гормоны II: 228–246
 — хромосомы II: 244
 Порфирии I: 362–365
 — человека, классификация I: 363
 Порфириногены I: 361
 Порфирины I: 356–365; II: 384
 — биосинтез I: 357–360
 — химия I: 361
 Порфирия врожденная эритропоэтическая I: 364
 — мозаичная I: 365
 — перемежающаяся острая (ПОП) I: 363
 — поздняя кожная I: 365
 — приобретенная (токсическая) I: 365
 Порфобилиноген I: 358, 359, 360, 363, 365
 Потребности в белке и аминокислотах II: 277
 — — основных компонентах пищи II: 275
 Почечнокаменная болезнь II: 30
 Почка, аминокислоты I: 311
 Прегнандиол II: 207
 Прегнантриол II: 207
 Прегненолон II: 207
 Преднизолон II: 207
 Прекалликреин II: 328, 329
 цис-Пренилтрансфераза I: 276
 Пре-мРНК, сплайсинг II: 90
 Пробелки II: 105
 Провирус II: 359, 360
 Прогестерон II: 207, 217, 229, 230, 235, 237, 239
 — биосинтез II: 237
 Прогестины II: 235, 236, 237, 238
 — метаболизм и выделение II: 237
 Проинсулин I: 49; II: 148
 Проканцероген(ы) II: 354
 Прокарбоксипептидаза II: 289, 293
 Проколлаген II: 105, 348, 349
 Пролактин (ПРЛ) II: 159, 170, 171, 172, 176–177
 Пролактостатин II: 171, 172
 Проламины I: 42
 Проллигидроксилаза I: 303
 Пролин I: 26, 296, 299, 301, 308, 319–320, 347
 Проллиндегидрогеназа I: 320
 Промотор II: 82, 83, 111, 112, 113, 123, 356, 359, 360
 — активация протоонкогена II: 359, 360
 Промотирование канцерогенеза II: 355, 356
 Промоторный элемент (ПЭ) II: 160
 Проопиомеланокортин (ПОМК) II: 148, 170, 180, 181
 Пропилтиоурацил II: 189
 Пропионил-CoA I: 198, 227, 235, 296, 335, 336, 337, 340, 341
 Пропионил-CoA-карбоксилаза I: 50, 198, 342
 Пропионовая ацидемия I: 342; II: 282

- Простагландины (ПГ) I: 153, 238, 241, 242, 243, 244, 245, 270;
 II: 258, 278
 Простагландин-эндопероксид-синтаза I: 242
 Простаноиды I: 153, 242
 Простациклины I: 153
 Протеаза(ы) I: 39; II: 366
 — сериновые, инактивация антитромбином II: 317, 318
 Протеиназа cGMP-зависимая II: 166
 Протеинкиназа(ы) I: 194; II: 163—164, 261
 — cAMP-зависимые I: 192, 193, 194, 214, 218, 219, 270, 271;
 II: 163—164, 166, 261, 362
 — cAMP-независимая II: 163
 — тирозиновая II: 357, 358, 362, 363, 364
 — Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая I: 194, 214, 289; II: 197
 Протеинфосфатаза легкой цепи миозина II: 339
 Протеинфосфатаза-1 I: 192, 193, 194, 219, 220
 Протеогликаны I: 149, 209; II: 299, 311, 314, 316, 317, 318
 — взаимодействие с липопротеинами плазмы II: 317
 — О-гликозидные связи II: 311
 — N-гликозиламиновые связи II: 311
 — деградация полисахаридных цепей II: 314
 — сиаилирование II: 311
 — структура II: 312
 Протеолиз I: 102
 Протогем I: 123
 Протомеры I: 47, 48, 72
 Протон-транслоцирующая окислительно-восстановитель-
 ная петля I: 134
 Протоны, транслокация в митохондриальной мембране I:
 133—135
 Протоонкоген(ы) II: 259, 359, 360
 Протопорфирин III I: 358
 Протопорфириноген III I: 359, 360
 Протопорфириногеноксидаза I: 360, 365
 Протопорфирия I: 365
 Протофиламенты II: 344
 Протромбин II: 326
 — активация II: 327
 Проферменты I: 93—94, 102
 Профилин II: 344
 Процессинг белков II: 105
 — РНК дифференциальный II: 125
 Прозластаза II: 289
 Псевдоген(ы) II: 11, 72
 Псевдогипопаратиреоз II: 156, 199
 Псевдоглобулины I: 43
 Псевдоподагра II: 29
 Псевдоуридин II: 9
 Птомаины II: 297
 Пуриннуклеозидфосфорилаза II: 16, 22, 30
 — недостаточность II: 31
 Пуриновые и пиримидиновые основания, физико-
 химические свойства II: 6—7
 — нуклеотиды, метаболизм II: 15—25, 29—31
 Пурин(ы) II: 5, 15, 17—24, 29—31, 35
 — биосинтез, регуляция II: 22—24
 — катаболизм II: 24
 — нарушения метаболизма II: 29—31
 — синтез I: 343; II: 17—23
 Пурамицин I: 266, 267; II: 107
 Путресцин I: 347, 348, 349, 354; II: 298

 Радиоавтография II: 46, 51, 300
 Рак II: 352
 Рахит II: 156, 199, 203, 280
 Рацемические смеси I: 142
 Реакции окислительно-восстановительные I: 119—126
 — равновесные и неравновесные I: 212—213
 — сопряженные I: 112—113
 — биоэнергетика I: 115
 — ферментативные, метаболический контроль I: 213—214
 — химические экзергонические I: 112—113, 301
 — — эндергонические I: 112—113
 Регуляция каталитической активности ферментов I: 102—
 104
 — по принципу обратной связи I: 105, 108, 110
 — синтеза и распада ферментов I: 102
 Редуктаза I: 250
 Рекомбинация хромосом II: 70—71
 Ренин II: 212
 Реннин II: 287, 292
 Рентгеновская кристаллография, определение структуры
 белков I: 49
 Репрессия катаболитная I: 101; II: 112
 — мультивалентная I: 101
 — конечным продуктом по принципу обратной связи I: 101
 — ферментов I: 100—101; II: 28
 Лас-репрессор II: 112, 113
 Рестриктазы II: 36—39
 Ретинол, основные свойства II: 281
 Ретровирусы, кДНК, длинные концевые повторы II: 70,
 359, 360
 Рецепторно-эффекторное сопряжение II: 152
 Рецепторы адренергические II: 225—226
 — гормонов II: 149, 150—157
 — — регуляция II: 153—154
 — — — повышающая II: 153
 — — — понижающая II: 153, 198
 — — резервные II: 152
 — — специфичность и избирательность II: 151
 — — структура II: 154—157
 — — узнавание и сопряжение II: 151—152
 — инсулина II: 259, 260, 263, 264
 — инсулиноподобных факторов роста II: 263
 — клеточной поверхности II: 145
 — эстрогенов II: 243
 Рецептосомы II: 144
 Рибозо-5-фосфат I: 200, 201, 203; II: 18
 Рибозо-5-фосфаткетонизомераза I: 200, 201, 203
 Рибонуклеаза(ы) (РНКаза) I: 47, 49, 81; II: 93, 290, 293
 — каталитический центр I: 81
 Рибонуклеотидредуктаза II: 20, 26
 Рибосома II: 102, 103, 105
 Рибофлавин I: 66, 120, 123, 177; II: 275, 279
 Рибофлавинфосфат I: 120
 Рибулозо-5-фосфат I: 200, 201, 203
 Рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза I: 200, 201, 203
 РНК (рибонуклеиновая кислота) II: 58—63, 82—93
 — биологические функции II: 59—60
 — в хроматине II: 64
 — N-гликозидные связи II: 59
 — процессинг II: 88—90, 120, 124, 125
 — — дифференциальный II: 125
 — синтез и процессинг II: 82—93
 — — на ДНК-матрице II: 82—85
 — — сигналы транскрипции II: 85—88
 — сплайсинг II: 36, 52
 — структурная организация II: 60—63
 — химическая природа II: 58—59
 — гетерогенная ядерная (гЯРНК) II: 62, 69, 89, 94
 — — сайты сплайсинга II: 89, 90
 — информационная (мРНК) II: 60—62. *См. также* РНК
 матричная
 — матричные (мРНК) II: 36, 37, 41, 43, 59, 61, 90—91, 94, 97,
 101, 103, 105
 — — дифференциальная трансляция II: 126
 — — полицистронная II: 111, 112
 — — стабильность II: 120, 125—126
 — — триплетный код I: 100
 — транспортные (тРНК) II: 59, 62, 91
 — — процессинг II: 91
 — — синтез белка II: 96—98

- — супрессорные II: 100—101
- рибосомные (pPНК) II: 59, 62—63, 91—92, 120
- РНКазы II: 78
- РНК-затравка II: 73, 74, 75
- РНК-полимераза ДНК-зависимая II: 82, 83, 84, 85
- — связывание с промотором II: 112, 113, 115, 116
- II ДНК-зависимая II: 68, 85, 86
- III ДНК-зависимая II: 88
- РНК-полимеразы ДНК-зависимые животных, номенклатура и локализация II: 84
- Роды II: 240—241
- Ротенон в окислительном фосфорилировании I: 131
- Сарколемма II: 333
- Саркомер II: 333, 338
- Саркоплазма II: 333
- Саркоплазматический ретикулум II: 338, 340
- Саузерн-блоттинг II: 43, 44, 45
- Сахар инвертированный I: 146
- Сахара сульфированные II: 302
- Сахараза II: 291, 294, 295
- недостаточность II: 295
- Сахарный диабет см. Диабет сахарный
- Сахароза I: 140, 147, 265; II: 291, 294
- Сахаропин I: 332, 333
- Свинец в моче, нормальное содержание II: 384
- Связи высокоэнергетические I: 177, 184, 187, 190
- Седогептулозо-7-фосфат I: 201, 203
- Секретин II: 267, 268, 269, 270, 293
- Секс-гормон-связывающий глобулин (СГСГ) II: 230, 231, 232, 237
- Селен I: 124; II: 285
- Серин I: 25, 248, 249, 252, 296, 299, 301, 311, 323, 326, 346
- Серин-гидроксиметилтрансфераза I: 301, 303, 322
- Сериндегидратаза I: 103, 322, 323, 326
- Серотонин I: 349—350; II: 273, 382
- Серповидноклеточная анемия I: 60—62, 74; II: 47, 48, 49, 50
- Сефалекс I: 69
- Сиалилтрансферазы II: 311
- Сиаловая кислота I: 150, 210, 211, 253, 259
- Синдром гепаторенальный I: 242
- Дубина — Джонсона I: 371—372
- дыхательной недостаточности I: 156
- карликовости II: 263
- Конна II: 219
- Криглера — Найяра типа I и типа II I: 370
- Кушинга II: 182, 219
- Леша — Найхана II: 30, 31
- Мак-Ардля I: 195
- Марото — Лами II: 315, 316
- Марфана II: 349, 350
- Менке II: 350
- Моркио II: 315, 316
- нарушения всасывания II: 274
- Рейе I: 242; II: 33
- Рихнера — Ханхарта I: 329
- Тернера I: 244
- тестикулярной феминизации II: 156, 235
- Хантера II: 315, 316
- Хурлера II: 299, 315, 316
- Целлевегера I: 231
- Шегрена — Ларссона I: 242
- Штейна — Левенталя II: 179, 244
- Элерса — Данлоса II: 349, 350
- Синдромы множественной эндокринной неоплазии (МЭН) II: 148
- Санфилиппо II: 315, 316—317
- эктопической продукции гормонов II: 148
- Синтазный комплекс I: 231, 232, 234
- Синтез белка, ингибиторы II: 105, 107
- — инициация II: 102, 103
- — терминация II: 105, 106
- — элонгация II: 102, 104
- Синцитиотрофобласт плаценты II: 179
- Ситостеролы I: 160, 284
- Сквален I: 274, 275, 277
- биосинтез I: 276
- Скваленсинтетаза I: 276
- Скваленэпоксидаза I: 275, 277
- Складчатый β -слой I: 46—47
- Склероз рассеянный I: 255
- Склеропротеины I: 42
- Слюна, переваривающее действие II: 284, 286
- Слюнные железы II: 284, 292
- Соматостатин II: 171, 172, 174, 175
- Соматомаммотропин хорионический (ХС) II: 172, 177
- — человека (ХСЧ) II: 240
- Соматомедин С II: 171, 174
- Соматостатин II: 159, 161, 171, 174, 175, 190, 247, 250, 265, 268
- Соматотрофы II: 173
- Сорбитол, метаболизм I: 207—208
- Сорбитолдегидрогеназа I: 208
- Спектрин I: 132
- Сперматогенез, регуляция II: 232
- роль тестостерона II: 233
- Сперматогонии II: 228
- Сперматозоиды II: 228
- Спермидин I: 346, 347, 348, 349
- Спермин I: 346, 347, 348, 349
- α -Спираль I: 45—46; II: 336
- Спирты в составе липидов I: 154—155
- полиатомные I: 140
- Сплайсинг II: 52, 70
- альтернативный II: 125
- Стереои́зомерия II: 206
- Стереои́зомеры I: 141, 159
- Стероидные гормоны надпочечников, метаболизм и экскреция II: 210—211
- — — регуляция синтеза II: 211—213
- — — транспорт в крови II: 210
- Стероидогенез II: 231—232
- Стероиды I: 151, 158—160
- классификация II: 217
- неактивные II: 216, 217
- нейтральные I: 281
- номенклатура и химия II: 206—207
- стереохимические аспекты I: 159
- Стеролы II: 129
- Стрептокиназа II: 330
- Стрептомицин I: 144, 146
- Субстраты, концентрация I: 84—85
- Сукцинат I: 88, 89, 175, 343, 344, 355
- Сукцинат-глициновый цикл I: 343, 344
- Сукцинатдегидрогеназа I: 123, 136, 175, 176, 221
- Сукцинаттнотикиназа I: 174, 175
- Сукцинил-СoA I: 115, 175, 176, 178, 179, 180, 197, 198, 291, 296, 318, 335
- Сукцинил-СoA-ацетат-СoA-трансфераза I: 176, 291
- Сукцинил-СoA-синтетаза I: 174
- Сульфаниламиды I: 204
- Сульфатаза(ы), недостаточность I: 255; II: 316
- «Сульфат активный» (ФАФС) I: 253
- Сульфатиды I: 158, 253
- Сульфитурия I: 326
- Сульфогалактозилцерамид I: 253, 254
- Сульфолипиды I: 151
- Сульфонилмочевина II: 254
- Сульфоцистеинурия I: 326
- Супероксиддисмутаза I: 125, 126
- Супероксид-радикал I: 125

- Сурфактант I: 250
 Сфингенин I: 252
 Сфингозин I: 157, 252, 253
 Сфинголипиды I: 254, 255
 Сфинголипиды I: 237, 252, 254
 — метаболизм I: 247, 252
 Сфингомиелиназа I: 254
 Сфингомиелины I: 157, 252, 257; II: 129
 Сфингофосфолипиды I: 151
- Талассемия I: 62, 74
 α - и β -Талассемия II: 48
 Таурин I: 28, 282
 Таурохенодесоксихолевая кислота I: 282
 Таурохолевая кислота I: 282
 Таутомерия II: 6
 Теобромин II: 6, 7
 Теофиллин I: 270; II: 6, 7
 Термогенез I: 272
 Термогенин I: 272
 Термогенный эффект II: 276
 Тестостерон II: 149, 178, 207, 210, 230, 231, 232, 236, 245
 — биосинтез II: 228—229, 245—246
 — метаболиты II: 231
 — стимуляция сперматогенеза II: 148, 178
 Тестостерон/ДГТ-рецептор II: 234
 Тестостерон-эстроген-связывающий глобулин II: 230
 Тетрагидробиоптерин I: 304, 353
 Тетраеновые кислоты I: 153
 Тетраидтиронин (тироксин, T_4) II: 186, 187, 190, 191
 Тетрозы I: 140, 143
 Тиамин (витамин B_1) I: 66, 177, 186, 200, 204; II: 275, 279, 282
 Тиаминдифосфат I: 186, 200
 Тиглил-КоА I: 338, 340
 Тимидилат (TMP) II: 25, 26, 53
 Тимидилатсинтаза II: 25, 26
 Тимидиловая кислота (TMP) II: 9
 Тимидин II: 15, 27, 53
 Тимидинкиназа II: 27
 Тимидинмонофосфат (TMP) II: 25, 26
 Тимин II: 5, 6, 7, 27, 28, 35, 55, 56, 73
 Тимин-тиминовый димер II: 80
 6-Тиогуанин II: 12, 13
 Тиолаза I: 228, 275, 277, 291
 Тиомочевина II: 189
 Тиоредоксин II: 20
 Тиоредоксинредуктаза II: 20
 Тиоурацил II: 189
 Тиофараза I: 176
 Тиозстераза I: 232, 233, 234
 Тиреоглобулин II: 149
 — метаболизм II: 187
 Тиреоидные гормоны, биосинтез II: 187
 — — механизм действия II: 191—192
 Тиреоид-стимулирующий гормон (ТСГ) II: 149, 156, 159, 162
 — иммуноглобулин (IgG) II: 192
 Тиреокарцинома медулярная II: 204
 Тиреопероксидаза II: 189
 Тиреотоксикоз II: 192
 Тиреотропин II: 187, 189
 Тиреотропин-релизинг-гормон (тиролиберин, ТРГ) I: 35; II: 159, 170, 171, 179—180
 Тирозин I: 25, 26, 296, 299, 327, 328, 352, 353—354; II: 222, 298
 — биосинтез I: 303, 304
 — иодинирование II: 189
 — катаболизм I: 327—328
 — переаминирование I: 328
 Тирозиназа I: 120, 328, 352
 Тирозин-гидроксилаза II: 222
- Тирозингидролаза I: 353
 Тирозинемия I: 328—329
 Тирозинил-тРНК, структура II: 107
 Тирозин- α -кетоглутарат-трансаминаза I: 328
 Тирозинкиназа II: 261
 Тирозиноз I: 328—329
 Тирозинтрансаминаза I: 328
 Тироксин (тетраидтиронин, T_4) I: 27, 223; II: 149, 170, 171, 179, 186, 187, 190, 192, 378—379
 Тироксин-связывающий глобулин (ТСГ) II: 190, 379
 — преальбумин (ТСПА) II: 190
 Токоферолы I: 161—162; II: 281
 Топоизомеразы II: 57, 77, 78
 Трансальдолаза I: 201, 202, 203
 Трансаминаза(ы) I: 307, 308, 319, 321, 323, 324, 325; II: 32
 Трансацетилаза I: 232, 233, 234
 Трансгидрогеназа энергонезависимая I: 132
 Транскетолаза I: 200, 201, 203, 204
 Транскетолазные реакции I: 177
 Транскортин II: 210
 Транскрипт первичный II: 83
 Транскриптаза обратная II: 60, 78
 — — ретровирусов II: 357, 359
 Транскрипция II: 52, 113, 114, 115, 118—120, 123
 — аттенуация II: 118—120
 — влияние гормонов II: 159—160
 — сигналы термации II: 85, 95
 — стартовая точка II: 83
 Транслокация реципрокная II: 360, 361
 Трансляция генетическая II: 52, 94, 95, 96, 101, 102, 119
 — мРНК, дифференциация II: 126
 Трансмембранная передача сигнала II: 364
 Трансмембранное перемещение макромолекул II: 143—145
 — — малых молекул II: 138—139
 Трансмембранные каналы II: 138
 Трансметилирование, синтез холина I: 267
 Транспозоны (прыгающие гены) II: 359
 Транспорт активный в мембранах II: 139, 141—142
 Трансфекция (перенос генов) II: 359
 Трансфераза(ы) I: 64; II: 52, 354
 — А-специфическая II: 310
 — В-специфическая II: 310
 Трансферрин II: 382
 Трансформация злокачественная II: 356, 357, 358
 — плейотропный эффект II: 357
 Трегалаза II: 291, 294
 Трегалола I: 147; II: 291, 294
 Треонин I: 25, 296, 299, 305, 308, 325, 326, 346; II: 277
 Треонинальдолаза I: 325, 326
 Треониндегидраза I: 100
 Триацилглицерол(ы) I: 155, 244, 248, 249, 256, 260, 261, 262, 265, 266, 267, 268, 270, 271, 285, 291, 292, 293, 295; II: 290, 291, 296
 — гидролиз I: 263, 285; II: 290
 — и фосфолипиды, биосинтез I: 248
 — катаболизм I: 247
 — липолиз I: 270, 271, 292
 — синтез I: 265—267, 293
 Триацилглицероллипаза гормон-чувствительная I: 270, 271
 Триглицериды I: 155, 379
 Триеновые кислоты I: 153
 Триидтиронин (T_3) I: 27; II: 149, 170, 171, 179, 186, 187, 189, 190, 191, 192, 379
 — — биосинтез II: 179, 190
 — — механизм действия II: 191
 Триозофосфат I: 182
 Триозы I: 140, 143
 Триокиназа I: 207, 208
 Трипептид(ы) I: 33
 Трипсин I: 39, 82; II: 289, 292, 335, 336
 Трипсиноген, активация II: 289, 292

- Триптофан I: 26, 296, 299, 327, 333—335, 349—350; II: 298
 — метаболизм I: 349—351
 L-Триптофандиоксигеназа I: 124
 Триптофаноксигеназа I: 102, 333
 Триптофанпирролаза (L-триптофандиоксигеназа) I: 100, 102, 124, 333, 334, 357
 Трихохромы I: 351, 352
 Тромбин I: 82; II: 326—327
 Тромбоксаны (ТО) I: 153, 154, 238, 242, 243, 244
 Тромбоцит-активирующий фактор (ТАФ) I: 250
 Тромбоциты II: 326, 327
 Тропомииозин II: 333, 334, 337, 338, 344
 Тропонин II: 333, 334, 335, 337
 — C I: 193
 Тропониновая система II: 335, 337
 α -Тубулин II: 345, 346
 β -Тубулин II: 345, 346
 Туникамицин II: 309
- Уабаин I: 142, 144, 146; II: 294
 Убихинон I: 127, 133, 160, 276, 278
 — биосинтез I: 276
 Углеводы I: 140—150
 — всасывание II: 291, 294, 295
 — и аминокислоты, транспорт I: 169
 — клеточных мембран I: 150
 — метаболизм I: 166—167, 171
 — — регуляция I: 212—224
 — пищевая потребность II: 277—278
 — сложные II: 299
 — энергетика окисления I: 186—188
 Угольная кислота, образование и диссоциация I: 57, 59
 Ультрафиолетовое излучение, образование пиримидин-пиримидиновых димеров II: 80
 Ультрацентрифугирование, определение молекулярной массы белка I: 50
 — разделение липопротеинов I: 256
 Ураты II: 25, 29, 30
 Урацил II: 5, 7, 9, 11, 27, 28, 32
 Урацил-ДНК-гликозилаза II: 80
 β -Уреидонзобутират II: 28
 Уреотелические организмы I: 307; II: 17
 Уридилат (уридинмонофосфат, UMP) II: 25
 Уридин II: 7, 8, 32
 Уридиндифосфат (UDP) I: 189, 209
 UDP-N-Ацетилгалактозамин I: 210, 211
 UDP-N-Ацетилглюкозамин I: 210, 211
 Уридиндифосфатгалактоза (UDPGal) I: 189, 209, 210—211, 253; II: 301, 302, 304
 Уридиндифосфатгалактозоэпимераза I: 253
 UDP-галактозо-4-эпимераза I: 209; II: 302
 Уридиндифосфатглюкоза (UDP-глюкоза, UDPGlc) I: 114, 189, 190, 205, 206, 209, 253; II: 11, 301
 UDP-глюкозодегидрогеназа I: 205, 206
 UDP-глюкозопирофосфорилаза (UDPGlc-пирофосфорилаза) I: 189, 190, 205, 206, 209; II: 302
 UDP-глюкуронилтрансфераза I: 367, 368, 370
 Уридиндифосфатглюкуроновая кислота II: 11
 Уридиндифосфатсахара II: 11
 Уридинмонофосфат (UMP, уридиловая кислота) II: 9, 25, 26, 33
 Уридинтрифосфат (UTP) I: 117, 189, 190, 205; II: 12
 Уридин-цитидинкиназа II: 27
 Уриказа I: 119, 120; II: 24
 Урикотелические организмы I: 307; II: 17
 Уробилиноген(ы) I: 368, 369, 371, 372; II: 384
 Урокиназа I: 321; II: 330
 Уроновая кислота I: 205; II: 311, 312, 314
 — — путь I: 205—207
 Уропорфириноген-декарбоксилаза I: 359, 363, 365
 Уропорфириноген-III-косинтаза I: 359, 360, 363
- Уропорфириноген-I-синтаза I: 359, 363
 Уропорфириногены I: 358, 359, 360, 362
 Уропорфирины I: 357, 362
- Фаги как векторы для клонирования II: 40, 41
 Фаголизосомы II: 187
 Фагосомы II: 187
 Фагоцитоз II: 144
 Фактор адгезии тромбоцитов (фактор Виллебранда) II: 329
 — внутренний II: 280
 — ингибирования мюллеровых протоков II: 245
 — роста трансформирующий (ТФР- β) II: 363, 364, 365
 — — тромбоцитарный (ТФР) II: 257, 258, 358, 363, 364
 — — фибробластов (ФРФ) II: 257, 258
 — — эпидермиса (ФРЭ) II: 257, 358, 363, 364, 365
 Факторы высвобождения (R-факторы) II: 105
 — инициации белкового синтеза II: 102
 — роста, действие, биохимические механизмы II: 364
 — — — путь аутокринный II: 364, 365
 — — — — паракринный II: 364
 — — — — эндокринный II: 364
 — — инсулиноподобные (ИФР) II: 170, 174, 175, 258, 263—264
 — — и онкогены II: 364—365
 — — полипептидные II: 363—365
 — — рецепторы II: 364
 — свертывания крови II: 325, 329
 — — — IX и XI II: 317
 — элонгации II: 102, 104
 Фарнезилпирофосфат I: 275, 276, 278
 Фенилаланин I: 26, 296, 299, 303, 304, 327, 329, 330—332; II: 277
 Фенилаланин-гидроксилаза I: 330, 350
 Фенилаланингидроксилазный комплекс I: 303, 304
 Фенилацетилглутамин I: 331
 Фенилацетат I: 331
 Фенилизотиоцианат (реагент Эдмана) I: 39, 40
 Фенилкетонурия I: 74, 330, 350—351
 Фениллактат I: 331
 Фенилпируват I: 331
 Фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза II: 223
 Фенолаза I: 120
 Феомеланины I: 351, 352
 Феохромоцитомы II: 222, 227
 Фермент ветвящий I: 190, 191, 195
 — конденсирующий I: 234
 — «яблочный» I: 215, 233, 236
 Ферментативные реакции, метаболический контроль I: 213—214
 — — механизмы регуляции I: 213
 Ферментные маркеры мембран II: 131
 Фермент-субстратный комплекс I: 84, 96
 — — константа диссоциации I: 87
 Ферменты, адаптация I: 289
 — адаптивные I: 215
 — активность, влияние глюкагона II: 265
 — — — инсулина II: 261, 265
 — аллостерические I: 107, 214
 — — кооперативность связывания субстратов I: 107—108
 — — модели I: 108
 — биотинзависимые I: 198, 199
 — в клинической диагностике I: 72—74
 — внутриклеточное распределение I: 71
 — выделение I: 69—71
 — гликолитические II: 357
 — группоспецифичность I: 67—68
 — и коферменты в окислительно-восстановительных процессах I: 119—126
 — ингибирование активности I: 88—90
 — — конкурентное I: 88—89
 — — неконкурентное I: 89—90

- индукция II: 355
- индуцируемые I: 100
- ионы металлов I: 95—97, 104
- как белковые катализаторы I: 63
- — катализаторы общего кислотного и общего основного типа I: 94—95
- каталитический центр I: 79—81
- кинетика I: 76—90
- классификация I: 63—65
- ковалентная модификация I: 108—110, 214, 217—218
- количественное определение активности I: 68—69
- компартментация I: 103
- конститутивные I: 100
- концентрация I: 84
- координированная индукция I: 100
- — репрессия I: 101
- механизм действия I: 91—97
- множественные формы (изозимы) I: 105
- модификация аллостерическая и ковалентная I: 288
- модуляторы активности I: 90
- обновление I: 101—102
- обратимо модифицируемые I: 109
- общие свойства I: 63—75
- β -окисления жирных кислот в митохондриях I: 136
- оптическая специфичность I: 67
- первичная структура I: 100
- полимеризации ДНК II: 76—78
- разрыв и образование ковалентных связей I: 78—79
- регуляторные I: 104, 214, 215
- — аллостерические центры I: 106—107
- регуляция активности I: 98—110, 102—104
- — аллостерическая I: 104—108
- — количества I: 99—102
- — способы I: 99
- рестрикции II: 36—39
- связывание субстратов I: 94
- синтез I: 100—102
- — индукция и репрессия I: 214, 217
- специфичность I: 67—68
- «трехточечная фиксация» субстратов I: 66—67
- цикла лимонной кислоты в митохондриях I: 136
- четвертичная структура I: 50
- Феррохелатаза I: 360, 364, 365
- Фибриллы стрессовые II: 342
- Фибрин II: 325, 326
- Фибриновый сгусток II: 326
- Фибриноген II: 320, 325—326
- Фибринолиз II: 330
- Фиброз кистозный I: 242
- Фибронектин II: 349
- Филаменты, механизм скольжения Хаксли II: 343
- промежуточные II: 342, 345—346
- Филамин II: 344
- Филлохинон, основные свойства II: 281
- Фитиновая кислота I: 229
- Фитостеролы II: 296
- Флавинадениндинуклеотид (FAD) I: 120, 121, 125, 177, 227
- Флаavin-зависимые дегидрогеназы I: 123
- Флавиномононуклеотид (FMN) I: 120, 123
- Флавопротеин(ы) I: 118, 123, 125, 128, 176, 186, 227, 228, 229, 252
- автоокисляемые I: 308
- электронпереносный I: 123, 129, 227
- Флуорескамин I: 28
- Фолацин, основные свойства II: 280
- Фолиевая кислота II: 275, 280, 282, 383
- Формилглицинамидин-рибозилфосфатсинтетаза II: 17
- Формилглицинамидрибозил-5-фосфат II: 17, 18
- N-Формилкинуренин I: 333, 334
- N-Формилметионил-tРНК II: 102
- N-Формиминоглутамат I: 321
- Форболовые эфиры, стимулирующие рост опухолей II: 258
- Фосфагены I: 114, 115; II: 340
- Фосфат неорганический (Pi) I: 113, 184, 215
- Фосфатаза(ы) II: 15, 166, 291, 294, 339, 376, 383
- Фосфатидатфосфогидролаза I: 248, 249, 293
- Фосфатидилглицеролы I: 156
- Фосфатидилинозитол I: 156, 248, 249; II: 357
- Фосфатидилсерин I: 157, 248, 249
- Фосфатидилхолин I: 156, 248, 249
- Фосфатидилэтаноламин I: 156, 157, 248, 249
- Фосфатидная кислота I: 156
- Фосфатные циклы I: 116—117
- Фосфаты высокоэнергетические I: 113, 114, 115, 173, 176, 184
- 3-Фосфоаденозин-5-фосфосульфат (ФАФС) I: 253
- Фосфогексоизомераза I: 182, 183, 203
- Фосфогидролаза I: 250
- 2-Фосфоглицерат I: 183, 185, 197, 208
- 3-Фосфоглицерат I: 116, 183, 185, 197
- Фосфоглицераткиназа I: 183, 184
- Фосфоглицератмутаза I: 183, 185
- Фосфоглицерид(ы) мембран II: 128
- Фосфоглицеролы I: 249
- Фосфоглюкомутаза I: 189, 190, 191, 206, 209, 210
- 6-Фосфоглюконат I: 200, 201, 203
- 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа I: 200, 201, 202, 203, 215
- 6-Фосфоглюконолактон I: 200, 201
- Фосфодиэстераза(ы) I: 193, 194, 270, 271; II: 10, 165, 261, 307
- Фосфоенолпируват I: 114, 115, 178, 179, 183, 185, 196, 197, 210
- Фосфоенолпируват—карбоксикиназа (ФЕПКС) I: 178, 196, 197, 215; II: 214, 262, 264, 265
- Фосфоинозитиды, действие гормонов II: 166, 168
- Фосфолипаза(ы) I: 136, 251; II: 289, 290, 291, 293, 295
- A I: 242, 251
- C II: 357, 364
- Фосфолипиды I: 151, 156—157, 238, 241, 244, 248, 251, 252, 254, 256, 263, 265; II: 128—129, 289, 293, 295
- Фосфомевалонаткиназа I: 276
- 4'-Фосфопантетеин I: 232, 234
- Фосфопротеинфосфатазы II: 166
- Фосфопротеины II: 164—165
- Фосфор I: 267; II: 283, 376, 383
- 5'-Фосфорибозиламин II: 17, 18
- 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) II: 17, 18, 20, 21, 22, 23, 28, 30
- Фосфорибозил-пирофосфат-амидотрансфераза II: 17
- Фосфорилаза(ы) I: 191, 192, 193, 209, 214, 216; II: 261, 341
- мышечная I: 192—193
- печени I: 207, 214, 219
- Фосфорилирование—дефосфорилирование I: 109—110
- Фосфорилирование мышечных белков II: 340
- «на субстратном уровне» I: 184
- окислительное I: 114, 127—136, 166, 172, 173, 175, 186; II: 340, 341
- — барбитураты I: 131
- — ингибиторы I: 131
- — механизм I: 132
- — хемосмотическая теория I: 132—136
- — химическая гипотеза I: 132
- Фосфоролиз I: 184
- O-Фосфосерин I: 346
- Фосфосфинголипиды I: 247, 252
- GlcNAc-Фосфотрансфераза II: 307, 308, 309
- Фосфотриозоизомераза I: 183, 184, 178
- Фосфофруктокиназа I: 182, 183, 185, 197, 207, 215, 216, 218, 219
- Фосфохолин I: 248, 249
- Фосфохолин-диацилглицерол-трансфераза I: 248, 250
- Фосфохолин-цитидилтрансфераза I: 248
- Фосфоэстеразы II: 15
- Фосфэтаноламин I: 248, 249
- Фотореактивация тиминовых димеров II: 80, 81

- Фруктоза I: 140, 142, 144, 205, 207, 208, 215, 221, 265; II: 291, 294
 — метаболизм I: 207, 208
 Фруктозан I: 149
 Фруктозо-1,6-бисфосфат I: 182, 183, 197, 208, 215
 Фруктозо-1,6-бисфосфатаза I: 197, 198, 202, 203, 208, 215
 Фруктозо-2,6-бисфосфатаза I: 218—219
 Фруктозо-6-фосфат I: 114, 182, 183
 Фруктозурия идиопатическая I: 205, 207
 Фруктокиназа I: 207, 208
 D-Фруктопираноза I: 142
 D-Фруктофураноза I: 142
 Фторацетат I: 174, 175
 Фторид, основные свойства II: 286
 5-Фторурацил II: 12
 Фторцитрат I: 174
 Фукоза I: 144, 150, 259
 α -Фукозидаза, недостаточность I: 254
 Фукозидоз I: 254
 Фукозилтрансфераза II: 310
 Фумараза I: 175, 176
 Фумарат I: 88, 175, 197, 296, 314, 318, 328; II: 19
 Фумаратгидратаза I: 176
 Фумарилацетоацетатгидролаза I: 328

 Хемиосмотическая теория I: 132—136, 272
 Хиломикроны I: 170, 171, 256, 257, 258, 259, 260—264, 281, 285, 286, 295; II: 280, 290, 296
 — катаболизм I: 262—264
 — метаболизм I: 261
 — образование и секреция I: 260, 261
 Хилоторакс II: 296
 Хилурия II: 296
 Хилус I: 260
 Химические реакции, теория столкновений I: 77—79
 — — энергетический барьер I: 77
 Химозин II: 287
 Химотрипсин I: 64, 67, 92; II: 289, 292
 — A I: 82
 — B I: 82
 α -Химотрисин I: 93
 π -Химотрисин I: 93
 Химотрипсиноген II: 289, 292
 Химус II: 287, 288, 292
 Хитин I: 149
 Хлорид(ы) II: 284, 372, 383
m-Хлоркарбонилцианидфенилгидразон (CCCP) I: 132
 Хлорофилл I: 356, 357
 Холевая кислота I: 281, 282
 Холекальциферол II: 281
 Холестаз I: 286
 Холестерол I: 151, 159—160, 238, 242, 244, 251, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 274—286; II: 129, 132, 134, 207, 208, 229, 278, 288, 290
 — биосинтез I: 274—279
 — — регуляция I: 278—279
 — в сыворотке и плазме, нормальное содержание II: 372, 383
 — выведение I: 281
 — растворимость в желчи II: 288
 — транспорт I: 279—281
 — эфиры I: 151, 251, 252, 255, 262, 263, 264, 284; II: 383
 Холестерол-десмолаза, недостаточность II: 220
 Холестеролэстераза II: 290
 Холецистокинин (ХКЦ) II: 267, 268, 269, 270, 272, 293
 Холин I: 156, 157, 251, 252, 267, 301, 302; II: 297
 — как липотропный фактор I: 267
 Хондроитинсульфаты I: 150; II: 311, 312—313, 314, 317
 Хондроитины I: 210
 Хорея Гентингтона II: 50
 Хориокарцинома II: 244

 Хром, основные свойства II: 285
 Хроматиды сестринские II: 67, 68, 73
 Хроматин II: 64, 66, 67
 — активный II: 67, 173
 — — гиперчувствительные сайты II: 67
 — ADP-рибозилирование белков II: 80
 — фибриллы II: 66
 Хроматиновые волокна, домены II: 66, 68
 Хроматография I: 29—31
 — аффинная I: 70
 — газожидкостная I: 162—163; II: 300
 — гель-фильтрация I: 35—36
 — ионообменная I: 31
 — на бумаге I: 29—30
 — тонкослойная I: 30—31, 163—164
 Хромаффинные гранулы II: 223
 X-Хромосома, X-сцепленные болезни II: 50
 Хромосомная интеграция II: 71—72
 Хромосомные транслокации II: 360, 362
 Хромосомы гомологичные II: 70, 71
 — интерфазные, хроматиновые волокна II: 66
 — кинетохоры II: 345
 — метафазные II: 67, 68
 — политенные II: 67
 — рекомбинация II: 70—71

 Цвиттерион I: 23
 Целлюлоза I: 149
 Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы I: 50
 Центромера II: 67
 Церамид I: 157, 252, 253, 254, 255
 Церамидаза, недостаточность I: 254
 Цереброзиды I: 209, 253; II: 129
 Цереброновая кислота I: 252
 Церулоплазмин в сыворотке, нормальное содержание II: 371, 383
 Цетиловый спирт I: 155
 Цианид I: 120, 132
 Цианогенбромид (CNBr) I: 38
 Цикл ATP/ADP I: 114, 115
 — клеток млекопитающих, фаза синтеза ДНК II: 78, 79
 — Кори I: 221
 — Кребса I: 172
 — лимонной кислоты I: 114, 130, 166, 172—180, 187, 197, 227, 228, 235, 269, 290, 291, 293, 295, 296, 297, 318
 — — — амфиболическая роль I: 177—180
 — — — высокоэнергетические фосфатные связи I: 176
 — — — глюконеогенез I: 178, 179
 — — — катаболическая роль I: 172—174
 — — — переаминирование и дезаминирование I: 178, 179
 — — — реакции I: 174—176
 — — — регуляция I: 221
 — — — роль витаминов I: 177
 — — — синтез жирных кислот I: 179, 180
 — — — энергетика I: 176
 — молочной кислоты I: 221
 — мочевины I: 306, 313—315
 — — метаболические нарушения I: 315—316
 — пуриновых нуклеотидов II: 11
 — трикарбоновых кислот I: 172
 Циклогексимид II: 107
 Цикло-3',5'-нуклеотидфосфодиэстераза I: 270
 Циклооксигеназа I: 242, 245
 Циклооксигеназный путь I: 242, 243
 Циклопентанпергидрофенантрен II: 206
 Циклы субстратные «холостые» I: 220
 — фосфатные I: 116—117
 Цинк I: 121; II: 383
 — основные свойства II: 286
 Циркуляция кишечно-печеночная желчных кислот I: 281, 283

- Цирроз печени I: 242, 266, 267, 306, 309
 Цистатионин I: 304, 335, 336
 Цистатионинурия I: 326; II: 282
 Цистеин I: 25, 296, 303, 324—325, 346; II: 298
 — биосинтез I: 303, 304
 — катаболизм I: 324—325
 — пищевая потребность II: 277
 — превращение I: 346
 Цистеиндесульфгидраза I: 324
 5-S-Цистеинил-дофахинон I: 352
 Цистеинсульфиновая кислота I: 27
 Цистин I: 323
 Цистин-лизинурия I: 325
 Цистиноз I: 325, 326
 Цистинредуктаза I: 323, 324
 Цистинурия I: 325
 Цистрон II: 110
 Цитарабин II: 13
 Цитидин II: 7, 8, 12
 Цитидиндифосфат (CDP) II: 12
 Цитидиндифосфатхолин (CDP-холин) I: 248, 249
 Цитидинтрифосфат (CTP) I: 106, 117, 249; II: 12
 Цитозин II: 5, 6, 7, 27, 28, 35, 73
 Цитозоль I: 171
 Цитоскелет II: 342—346
 Цитохалазин II: 344
 Цитохром(ы) I: 120, 123, 124, 128, 129, 133, 134, 229, 240, 357, 358
 — с I: 123, 130
 — P-450 I: 361, 363; II: 207
 — в микросомах I: 124
 Цитохромоксидаза I: 120, 123, 129
 Цитрат I: 172, 179, 180, 215, 296, 318
 Цитратсинтаза I: 174, 175, 221
 Цитруллин I: 27, 313, 315
 — синтез I: 314
 Цитруллинемия I: 315

 Щавелевоуксусная кислота см. Оксалоацетат
 Щелевые контакты II: 146
 Щелочная фосфатаза сыворотки, нормальное содержание II: 376, 383
 Щитовидная железа I: 223; II: 186, 187, 189, 192
 — — гормоны II: 186—192
 — — патофизиология II: 192

 Эйкозановые жирные кислоты I: 238
 Эйкозаноиды I: 152—153, 238, 242, 243
 5, 8, 11, 14, 17-Эйкозапентаеноат I: 243
 Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) I: 239, 242
 5, 8, 11, 14-Эйкозатетраеноат I: 243
 Эйкозатриеноат (догомо- γ -линоленат) I: 240
 8, 11, 14-Эйкозатриеноат I: 243
 Экзергонические реакции I: 112—113, 177
 Экзогликозидазы II: 302, 316
 Экзон(ы) II: 36, 37, 52, 70, 88, 94
 Экзонуклеаза(ы) II: 36, 52, 93
 Экзопептидаза II: 287
 Экзоцитоз II: 144—145
 Экзоцитозные везикулы II: 344
 Экспрессия генов, дерепрессия II: 109
 — — координированная II: 111
 — — нерасходуемый индуктор II: 113
 — — ответы на регуляторный сигнал II: 109—110
 — — регулятор негативный II: 113
 — — позитивный II: 113
 — — регуляция II: 109—126
 — — негативная II: 109
 — — позитивная II: 109
 — — у эукариот II: 120—126

 Эластаза II: 289, 292
 Эластин II: 317
 Электронная микроскопия, определение структуры белков I: 51
 Электростатические связи I: 44
 Электрофорез в полиакриламидном геле (ПЭГ, ПААГ) I: 36, 51, 70—71
 — — — с ДСН II: 300
 — высоковольтный I: 32
 — зональный в ацетате целлюлозы II: 321
 — разделение липопротеинов плазмы I: 258
 Элонгаза I: 237, 240
 Элонгация I: 240
 — факторы II: 102, 104
 Эмульсии, образование I: 163, 164
 Эндергонические реакции I: 111—113
 Эндогликозидазы II: 302, 305, 316
 Эндокринная система, взаимосвязь с нервной системой II: 147
 — — характеристика II: 147—157
 Эндокринные железы, тканевое происхождение и локализация II: 148
 Эндонуклеаза II: 36, 52, 92
 Эндонуклеазы рестрикции I: 73—74; II: 413
 — — полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) I: 74; II: 50
 Эндопептидаза(ы) II: 287, 289
 Эндоплазматический ретикулум I: 171, 260, 275; II: 95, 187
 β -Эндорфин II: 180, 182
 Эндорфины II: 182—183
 Эндоцитоз II: 143—144, 364
 Эндоцитозные везикулы II: 344
 Энергетические потребности II: 274—276
 Энергетический барьер, химические реакции I: 77
 Энергетическое равновесие II: 275
 Энергия радиационная, канцерогенный эффект II: 353
 — свободная и законы термодинамики I: 111—116
 — — изменения I: 76—77
 — улавливание I: 113, 114
 Энкефалины II: 268, 269, 273
 Энтальпия I: 111
 Энтероглюкагон II: 268, 269
 Энтерокиназа II: 289
 Энтропия I: 111
 Энхансер(ы) II: 36, 87
 — активация протоонкогена II: 359—360
 — эффективность транскрипции II: 123—124
 Энхансерные элементы II: 160
 Эпидермальный фактор роста (ЭФР) II: 154
 Эпимераза I: 209, 210
 Эпимеры I: 142
 Эргокальциферон, основные свойства II: 281
 Эргостерол I: 160
 — основные свойства II: 281
 Эрготионеин I: 345, 347
 Эритроза I: 140, 145
 Эритрокруорины I: 356
 Эритромицин I: 146
 Эритроциты, гликолиз I: 185, 200
 Эстерификация жирных кислот I: 268
 Эстрадиол II: 148, 149, 207
 17 β -Эстрадиол (E_2) II: 229, 235, 236
 Эстрогены II: 235—237, 238
 — биосинтез II: 235—236
 — метаболизм и выведение II: 237
 — рецепторы II: 243
 Этанол, путь превращения I: 267
 Этаноламин I: 248, 249
 Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) I: 161
 Этиохоланолон II: 207, 231

- Эуглобулины I: 43
Эукариоты, регуляция процессинга РНК II: 120
Эумеланины I: 351, 352
Эухроматин II: 67
Эффект Бора I: 59, 60
— Пастера I: 218
Эффекторы аллостерические I: 104, 107
- «Яблочный» фермент I: 215, 233, 235, 236
Ядра клеток млекопитающих II: 62, 64
Яичники, гормоны II: 235—244
Яйцеклетки II: 235
Ямайская рвотная болезнь I: 229
ЯМР-спектметрия II: 300

Оглавление

РАЗДЕЛ IV. СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Глава 34. Нуклеотиды. Виктор Родуэлл	5
Введение	5
Биомедицинское значение	5
Структура пуриновых и пиримидиновых оснований	5
Физико-химические свойства пуриновых и пиримидиновых оснований	6
Нуклеозиды и нуклеотиды	7
Природные нуклеотиды	10
Синтетические аналоги нуклеотидов	12
Литература	14
Глава 35. Метаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Виктор Родуэлл	15
Введение	15
Биомедицинское значение	15
Усвоение	15
Пурины	17
Пиримидины	25
Клинические нарушения метаболизма пуринов	29
Заболевания, связанные с нарушением метаболизма пиримидинов	31
Литература	34
Глава 36. Технология рекомбинантных ДНК. Дарил Греннер	35
Введение	35
Биомедицинское значение	35
Основные свойства ДНК	35
Классификация гликопротеинов	303
I-клеточная болезнь	309
Антигены групп крови	310
Н-локус	310
Секреторный локус	310
Локус ABO	310
Протеогликаны и гликозаминогликаны	311
Деградация полисахаридных компонентов гликопротеинов и протеогли-	
канов	314
Функция гликозаминогликанов и протеогликанов	317
Литература	318
Основные понятия генной инженерии	36
Некоторые практические приложения технологии рекомбинантной ДНК	44
Генная инженерия и анализ молекулярной природы заболеваний	47
Словарь-справочник	51
Литература	52
Глава 37. Структура и функция нуклеиновых кислот. Дарил Греннер	53
Введение	53
Биомедицинское значение	53
ДНК	53

РНК	58
Литература	63
Глава 38. Организация и репликация ДНК. Дарил Греннер	64
Введение	64
Биомедицинское значение	64
Хроматин	64
Гистоны и нуклеосомы	64
Генетическая организация генома млекопитающих	68
Изменения и перестройки генетического материала	70
Синтез и репликация ДНК	73
Литература	81
Глава 39. Синтез и процессинг РНК. Дарил Греннер	82
Введение в проблему и ее биомедицинское значение	82
Синтез РНК	82
Процессинг молекул РНК	88
Нуклеазы	92
Литература	93
Глава 40. Синтез белка и генетический код. Дарил Греннер	94
Введение	94
Биомедицинское значение	94
Информационный поток	94
Кодоны и синтез белка	94
Транспортные РНК в синтезе белка	96
Мутации	98
Процесс синтеза белка	101
Литература	107
Глава 41. Регуляция экспрессии генов. Дарил Греннер	109
Введение	109
Биомедицинское значение	109
Регуляция экспрессии генов у прокариот	111
Регуляция экспрессии генов у эукариот	120
Литература	126

РАЗДЕЛ V. БИОХИМИЯ ВНУТРИ- И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОММУНИКАЦИЙ

Глава 42. Мембраны: структура, сборка и функции. Дарил Греннер	127
Введение	127
Биомедицинское значение	127
Поддержание нормального состава среды	127
Структура мембран	128
Липидный состав	128
Организация мембранных липидов	130
Мембранные белки	131
Искусственные мембраны	132
Жидкостно-мозаичная модель мембран	133
Сборка мембраны	135
Специализированные функции мембран	137
Трансмембранный перенос малых молекул	138
Трансмембранное перемещение макромолекул	143
Передача информации в клетку	145
Межклеточные контакты и коммуникации	146
Литература	146
Глава 43. Характеристика эндокринной системы. Дарил Греннер	147
Введение	147
Биомедицинское значение	147
Общие свойства	147
Разнообразие эндокринной системы	147
Концепция железы-мишени	149
Концепция регуляторного механизма обратной связи	149
Рецепторы гормонов	150
Литература	157

Глава 44. Действие гормонов. Дарил Греннер	158
Введение	158
Биомедицинское значение	158
Классификация гормонов	158
Механизм действия гормонов I группы	159
Механизм действия гормонов II группы (пептидных гормонов)	161
1. сАМР как второй посредник	161
2. Действие гормонов, опосредованное кальцием и фосфоинозидами	166
3. Гормоны с неизвестным внутриклеточным посредником	168
Литература	169
Глава 45. Гормоны гипофиза и гипоталамуса. Дарил Греннер	170
Введение	170
Биомедицинское значение	170
Гормоны гипоталамуса	170
Гормоны передней доли гипофиза	172
1. Группа гормон роста—пролактин—хорионический соматомаммотропин	172
2. Группа гликопротеиновых гормонов	177
3. Семейство пептидов проопиомеланокортина (ПОМК)	180
Гормоны задней доли гипофиза	183
1. Окситоцин	184
2. Антидиуретический гормон (АДГ; вазопрессин)	184
Литература	185
Глава 46. Гормоны щитовидной железы. Дарил Греннер	186
Введение	186
Биомедицинское значение	186
Биосинтез тиреоидных гормонов	187
1. Метаболизм тиреоглобулина	187
2. Метаболизм иодида	187
Транспорт и метаболизм гормонов щитовидной железы	190
Регуляция синтеза и высвобождения гормонов щитовидной железы	190
Механизм действия тиреоидных гормонов	191
Патофизиология	192
Литература	192
Глава 47. Гормоны, регулирующие метаболизм кальция. Дарил Греннер	193
Введение	193
Биомедицинское значение	193
Общие характеристики	193
Гомеостаз кальция	194
Гормоны, участвующие в гомеостазе кальция	194
1. Паратиреоидный гормон (ПТГ)	194
2. Кальцитриол $[1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3]$	199
3. Кальцитонин (КТ)	203
Литература	204
Глава 48. Гормоны коры надпочечников. Дарил Греннер	205
Введение	205
Биомедицинское значение	205
Зоны коры надпочечников	205
Гормоны	205
Номенклатура и химия стероидов	206
Биосинтез стероидных гормонов надпочечников	207
Секреция, транспорт и метаболизм стероидных гормонов надпочечников	210
Регуляция синтеза стероидных гормонов надпочечников	211
Воздействие стероидных гормонов надпочечников на метаболизм	213
Классификация и механизм действия стероидных гормонов	216
Патофизиология коры надпочечников	219
Литература	220
Глава 49. Гормоны мозгового вещества надпочечников. Дарил Греннер	221
Введение	221
Биомедицинское значение	221
Биосинтез катехоламинов	222
Запасание и секреция катехоламинов	223
Метаболизм катехоламинов	223

Регуляция синтеза катехоламинов	224
Классификация и механизм действия катехоламинов	225
Патофизиология мозгового слоя надпочечников	227
Литература	227
Глава 50. Гормоны половых желез. Дарил Греннер	228
Введение	228
Биомедицинское значение	228
Гормоны семенников	228
Биосинтез и метаболизм гормонов семенников	228
Регуляция функции семенников	231
Физиологические эффекты гормонов семенников	233
Механизм действия гормонов семенников	234
Патофизиология репродуктивной системы у мужчин	234
Гормоны яичников	235
Биосинтез и метаболизм гормонов яичников	235
Регуляция и физиологическое действие гормонов яичников	238
Механизм действия гормонов яичников	243
Патофизиология женской репродуктивной системы	244
Гормоны половых желез и половая дифференцировка	244
Хромосомный пол	244
Гонадный пол	244
Фенотипический пол	245
Литература	246
Глава 51. Гормоны поджелудочной железы. Дарил Греннер	247
Введение	247
Биомедицинское значение	247
Инсулин	247
Инсулиноподобные факторы роста	263
Глюкагон	264
Соматостатин	265
Панкреатический полипептид	265
Литература	265
Глава 52. Гормоны желудочно-кишечного тракта. Дарил Греннер	267
Введение	267
Биомедицинское значение	267
История вопроса	267
Свойства гормонов желудочно-кишечного тракта	267
Семейство секретина	271
Семейство гастрин-холецистокинин	272
Другие пептиды желудочно-кишечного тракта	272
Литература	273

РАЗДЕЛ VI. ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ

Глава 53. Питание, пищеварение и всасывание. Питер Мейес	274
Введение	274
Биомедицинское значение	274
Питание	274
Энергетические потребности	275
Расход энергии	275
Азот аминокислот и потребность в специфических аминокислотах	276
Потребность в углеводах	277
Потребность в пищевых волокнах	278
Потребность в липидах	278
Потребность в витаминах	278
Потребность в минеральных веществах	280
Рекомендации в области диеты	282
Пищеварение	284
Пищеварение в полости рта	284

Пищеварение в желудке	286
Панкреатическое и кишечное пищеварение	287
Всасывание в желудочно-кишечном тракте	291
Всасывание углеводов	291
Всасывание глюкозы	294
Всасывание липидов	295
Всасывание аминокислот и белка	296
Процессы гниения и брожения в кишечнике	297
Литература	298
Глава 54. Гликопротеины и протеоглики. Роберт Марри	299
Введение	299
Биомедицинское значение	299
Гликопротеины	299
Распространение и функции	299
Информация, заключенная в олигосахаридных цепях	299
Определение, очистка и структурный анализ гликопротеинов	300
Сахара, присутствующие в гликопротеинах	301
Нуклеотидсахара	301
Экзогликозидазы и эндогликозидазы	302
Лектины	302
Классификация гликопротеинов	303
I-клеточная болезнь	309
Антигены групп крови	310
Н-локус	310
Секреторный локус	310
Локус ABO	310
Протеоглики и гликозаминогликаны	311
Деградация полисахаридных компонентов гликопротеинов и протеогли- канов	314
Функция гликозаминогликанов и протеогликанов	317
Литература	318
Глава 55. Плазма крови и процесс свертывания. Роберт Марри	319
Введение	319
Биомедицинское значение	319
Функции крови	319
Белки плазмы	319
Свертывание крови	325
Литература	330
Глава 56. Сократительные и структурные белки. Виктор Родуэлл	332
Введение	332
Биомедицинское значение	332
Мышцы	332
Клеточная подвижность и цитоскелет	342
Коллаген	347
Литература	351
Глава 57. Рак, онкогены, факторы роста. Роберт Марри	352
Введение	352
Биомедицинское значение	352
Биохимические лабораторные тесты и рак	352
Причины возникновения опухолей	353
Радикационная энергия	353
Химические канцерогены	353
Онкогенные вирусы	356
Трансформация	357
Онкогены	357
Полипептидные факторы роста	363
Действие факторов роста по эндокринному, паракринному или аутокринно- му типу	364
Биохимические механизмы действия факторов роста	364
Факторы роста и онкогены	365

Прогрессия опухолей	365
Метастазирование	366
Литература	366
Приложение	367
Химический состав крови и жидких сред организма	367
Стандартные клиничко-лабораторные показатели в традиционной системе и системе СИ	369
Нормальные лабораторные показатели	382
Химические компоненты крови, плазмы, сыворотки	382
Гормоны сыворотки и плазмы	383
Другие нормальные показатели	384
Литература	384
Список сокращений	385
Предметный указатель	386

Учебное издание

Роберт Марри, Дарил Греннер, Питер Мейес, Виктор Родуэлл

БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

В 2-х томах

Том 2

Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова

Ведущие редакторы М. Р. Погосбекова

и Н. Н. Шафрановская

Редактор О. В. Шагинян

Художник Б. П. Кузнецов

Художественный редактор А. Я. Мусин

Технические редакторы А. Л. Гулина, Т. А. Максимова

Корректор Н. А. Мистрюкова

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97

Подписано к печати 02.12.98. Формат 84 × 108/16.

Бумага офсетная № 2. Печать офсетная. Гарнитура

таймс. Объем 13,00 бум. л. Усл.-печ. л. 43,68.

Уч.-изд. л. 51,55. Изд. № 4/7134.

Тираж 10 000 экз. Заказ 1594. С 026

Издательство «Мир»

Государственного комитета Российской Федерации по печати,

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Отпечатано в полном соответствии

с качеством предоставленных диапозитивов

в ОАО «Можайский полиграфический комбинат»

143200, г. Можайск, ул. Мира, 93

Байер К., Шейнберг Л. ЗДОРОВЫЙ ОБРАЗ ЖИЗНИ.
Пер. с англ. — М.: Мир, 1997 — 368 с., ил.

Книга американских авторов — универсальное, прекрасно составленное руководство, посвященное разумному образу жизни. Рассматриваются следующие вопросы:

- психическое здоровье, основы формирования личности, контролирование эмоций, оптимальное поведение в стрессовых ситуациях;
- сексуальные отношения, биология пола, способы предупреждения беременности и аборты, беременность и роды;
- правильное питание, проблемы лишнего веса;
- занятия спортом (физиологические основы, оптимальные нагрузки, рекомендуемые условия);
- старение, физиологические и психологические изменения в старости, уход за старыми людьми;
- смерть, умирание (психологическая подготовка и помощь);
- наркомания, курение, алкоголизм (психологические, медицинские и социальные аспекты);
- физиологические основы и профилактика инфекционных болезней (грипп, корь, вирусный гепатит и др.), неинфекционных заболеваний (сердечно-сосудистые, рак, диабет, артрит, астма и др.), болезней, передаваемых половым путем (СПИД, гонорея, сифилис, другие вирусные, микробные и грибковые инфекции);
- воздействие на здоровье неблагоприятных экологических факторов.

Описывая эти, в сущности основные, человеческие проблемы, авторы показывают пути их рационального решения. Изложение подчинено идее, что здоровье и хорошее самочувствие каждого — в его собственных руках.

Книга очень информативна и хорошо иллюстрирована.

Эту и другие книги издательства «Мир» можно приобрести в книжных магазинах, непосредственно в издательстве, а также получить по почте наложенным платежом.

Адрес издательства: 129820, Москва, 1-й Рижский пер., 2
Телефоны коммерческой службы: (095) 286-83-88, 286-84-55;
286-82-33; 286-17-72

Факс: (095) 288-9522, e-mail: victor@mir.msk.su

“Книга задумана как учебник биологической химии для студентов-медиков, однако, я считаю, что ценность ее значительно шире, и она могла бы быть использована в качестве одного из стандартных учебников для университетов. Материал в руководстве изложен очень сжато и с удивительной четкостью. Особенно следует подчеркнуть современность учебника и его информативность (схемы, таблицы и прекрасно подобранная библиография) ...”

А.Д. Виноградов, профессор Московского университета

“В книге “Биохимия человека” изложены основные принципы биохимии и молекулярной биологии на самом современном уровне. Она выдержала в оригинале 21 издание общим тиражом более миллиона экземпляров, причем каждое издание подвергалось переработке с учетом новейших данных без существенного увеличения объема. Переведена на 10 языков (французский, немецкий, японский, итальянский, польский и др.)

Первая особенность этого руководства состоит в том, что оно тесно увязывает биохимические вопросы с физиологическими функциями того или иного органа и ткани, а также с наиболее часто встречаемой патологией. Авторы стараются объяснить не только “что происходит” и “как происходит”, но и “почему это происходит”.

Вторая особенность — исключительная ясность изложения материала, даже сложного. Не удивительно, что книга пользуется успехом не только среди научных работников, но и среди студентов. Первоначально книга собственно и предназначалась для последних, но она переросла лимиты обычного учебника. Достаточно сказать, что общее число иллюстраций, включая формулы, схемы и рисунки, превышает 700...”

А.Н. Климов, академик Академии медицинских наук СССР



9 785030 017747