МИНИСТЕРСТВО ВЫСЩЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

АНДИЖАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

" Утверждаю"

Проректор по учебной работе АГМИ

_____ Б.Р.Абдуллажонов

<<29>> 08 2022

КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС

по предмету

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

для студентов 2-курса

(1 семестр)

Область знаний: 500000-Здравоохранение и социальное обеспечение

Область образования: 510000-Здравоохранение

Направление подготовки: 60910100-Стоматология

Андижан - 2022/23

Учебно методический комплекс разработан на основе учебной программы, утвержденной протоколом заседания Совета Андижанского государственного медицинский институт № ___ от <<29>> 08 2022 года.

Представитель учебного совета Д.Ш.Туланов

Составитель:

И.Ю.Маматова – зав.кафедрой Андижанского государственного медицинского института, доктор химических наук

И.Р.Асқаров - проф. кафедры Химии Андижанского государственного университета, доктор химических наук.

Г.А. Муминова - доцент кафедры Биологическая химии Андижанского государственного медицинского института, PhD.

М.М.Бокиев - ассистент кафедры биологической химии Андижанского государственного медицинского института

М.М.Мўминжонов - ст.преподаватель кафедры Химии Андижанского государственного университета, DSc.

Рецензент:

Сайдуллев Т.С. – доцент кафедры медицинской биологии, гистологии АГМИ

Исаев Ю.Т – доцент кафедры Химии Андижанского государственного университета, DSc.

Доклад тем была утверждена решением Центрального методического совета по указу № ___ от <<29>> 08 2022 года

<< Согласована>>
учебно – методическим отделом: К.М.Юсупов

ТЕМА: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ.

Белки — это биополимеры сложного строения, макромолекулы (протеины) которых, состоят из остатков аминокислот, соединенных между собой амидной (пептидной) связью.

1. Строительный материал – белки участвуют в образовании оболочки клетки, органоидов и мембран клетки. Из белков построены кровеносные сосуды, сухожилия, волосы.

2. Каталитическая роль – все клеточные катализаторы – белки (активные центры фермента). Структура активного центра фермента и структура субстрата точно соответствуют друг другу, как ключ и замок.

3. Двигательная функция – сократительные белки вызывают всякое движение.

4. Транспортная функция – дыхательная функция крови, в частности перенос кислорода, осуществляется молекулами гемоглобина – белка эритроцитов. В транспорте липидов принимают участие альбумины сыворотки крови. Ряд других сывороточных белков образуют комплексы с жирами, медью, железом, тироксином, витамином А и другими соединениями, обеспечивая их доставку к органам-мишеням.

5. Защитная роль – иммунная система обеспечивает синтез специфических защитных белков-антител в ответ на поступление в организм бактерий, токсинов и вирусов. Защитная функция белков проявляется и в способности ряда белков крови к свертыванию. Свертывание белка плазмы крови фибриногена приводит к образованию сгустка крови, что предохраняет от потери крови при ранениях.

6. Энергетическая функция – 1 г белка эквивалентен 17,6 кДж.

7. Сократительная функция. В акте мышечного сокращения и расслабления участвует множество белковых веществ (актин и миозин – специфические белки мышечной ткани). Сократительная функция присуща не только мышечным белкам, но и белкам цитоскелета, что обеспечивает тончайшие процессы жизнедеятельности клеток (расхождение хромосом в процессе митоза).

8. Гормональная функция. Ряд гормонов представлен белками или полипептидами, например гормоны гипофиза, поджелудочной железы и др. Некоторые гормоны являются производными аминокислот.

Наиболее богаты белковыми веществами ткани и органы животных. Источником белка также являются растения и микроорганизмы. Большинство этих белков хорошо растворимы в воде. Однако некоторые органические вещества, выделенные из хряща, волос, ногтей, рогов, костной такни – нерастворимые в воде – также были отнесены к белкам, поскольку по своему химическому составу оказались близки к белкам мышечной ткани, сыворотки крови, яйца. Количественное содержание белков в различных тканях и органах человека приведено в таблице.

Таблица 1.1. **Содержание белков в органах и тканях человека**

Органы и ткани	Содержание белков, %		Органы и ткани	Содержание белков, %	
	от сухой массы	от общего количества белка тела		от сухой массы	от общего количества белка тела
Кожа	63	11,5	Почки	72	0,5
Кости (твердые ткани)	20	18,7	Поджелудочная железа	47	0,1
Зубы (твердые ткани)	18	0,1			
Поперечнополосатые мышцы	80	34,7	Пищеварительный тракт	63	1,8
Мозг и нервная ткань	45	2,0	Жировая ткань	14	6,4
Печень	57	3,6	Остальные ткани:		
Сердце	60	0,7	жидкие	85	1,4
Легкие	82	3,7	плотные	54	14,6
Селезенка	84	0,2	Все тело	45	100

3. Аминокислотный состав белков

В каждой молекуле аминокислоты есть атом углерода, связанный с четырьмя заместителями. Один из них — атом водорода, второй — карбоксильная группа —COOH. Она легко отпускает ион водорода H^+, благодаря чему в названии аминокислот и присутствует слово «кислота». Третий заместитель — аминогруппа —NH_2 и, наконец, четвёртый заместитель — группа атомов, которую в общем случае обозначают R. У всех аминокислот R-группы разные.

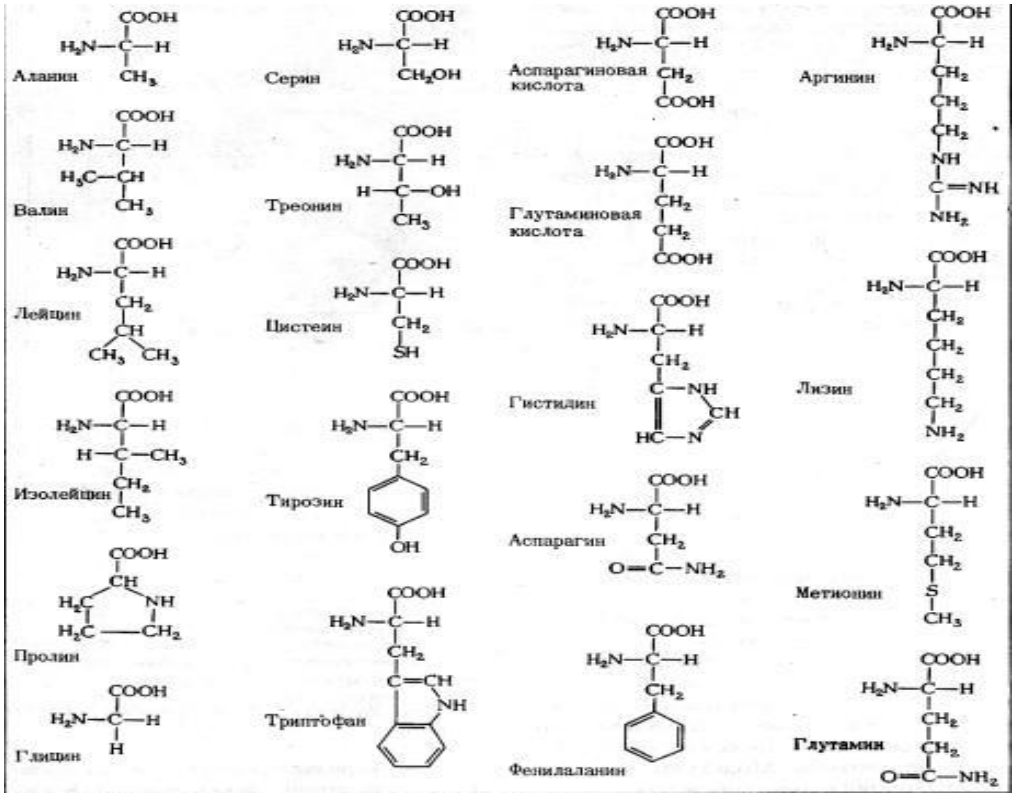
Свойства, отличающие одну аминокислоту от другой, скрыты в R-группах (их ещё называют боковыми цепями). Атом углерода в аминокислотах, который находится ближе всех к карбоксильной группе, т. е. α-атом, связан также с аминогруппой, поэтому природные аминокислоты, входящие в состав белка, называют α-аминокислотами.

Число α-аминокислот, различающихся R-группой, велико. Но чаще других в белках встречается всего 20 разных аминокислот. Условно основные аминокислоты делят на четыре класса.

В первый входят аминокислоты с неполярными боковыми цепями. Во второй — аминокислоты, содержащие полярную группу. Следующие два составляют аминокислоты с боковыми цепями, которые могут заряжаться положительно (они объединяются в третий класс) или отрицательно (четвёртый).

Для нормальной жизнедеятельности организм нуждается в полном наборе из 20 основных a-Z-аминокислот. Но одни из них могут быть синтезированы в клетках самого организма, а другие — должны поступать в готовом виде из пищевых продуктов. В первом случае аминокислоты называют *заменимыми,* а во втором — *незаменимыми.* Для удобства 20 главных аминокислот обозначают символами, используя одну или первые три буквы русского или английского названия аминокислоты, например аланин — Ала или A, глицин — Гли или G.

Структура α-аминокислот, наиболее часто встречающихся в белках



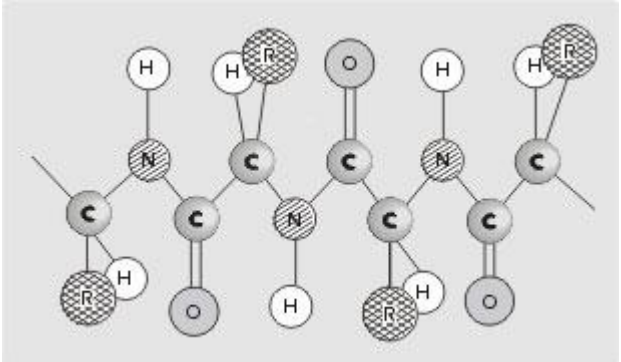
Заменимые и незаменимые аминокислоты

Заменимые	Незаменимые	Заменимые	Незаменимые
Аланин Аспаргин Аспарагиновая кислота Глицин Глутамин	Аргинин Валин Гистидин Изолейцин Лейцин	Глутаминовая кислота Пролин Серин Тирозин Цистеин (цистин)	Лизин Метионин Треонин Триптофан Фенилаланин

Незаменимость указанных аминокислот для роста и развития организма животных и человека связана с отсутствием способности тканей синтезировать углеродные скелеты незаменимых аминокислот.

4. Первичная структура белков. Разнообразие первичной структуры.

Под первичной структурой подразумевают порядок, последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Зная первичную структуру, местоположение каждого остатка аминокислоты, можно точно написать структурную формулу белковой молекулы, если она представлена одной полипептидной цепью. Зная первичную структуру можно точно написать структурную формулу белковой молекулы, если она представлена одной полипептидной цепью. Если в состав белка входит несколько полипептидных цепей, то задача определения первичной структуры несколько сложнее, так как необходимо предварительное разъединение этих цепей.



Первичная структура белка

Все белки различаются по своей первичной структуре. Установление первичной структуры белка служит основой для определения вторичной и третичной структур, выяснения расположения функциональных групп в его активном центре и открывает путь к познанию механизма его функционирования.

Первичную структуру белков можно определять путем непосредственного анализа аминокислотной последовательности или путем расшифровки нуклеотидной последовательности соответствующих генов с помощью генетического кода.

Первичная структура определяется составом аминокислот и последовательностью их соединения в цепи. Изменение в расположении даже одной аминокислоты или замене ее другой ведет к образованию совершенно новой молекулы белка. Число белковых молекул, которое образуется при разном сочетании 20 аминокислот, огромно. Разнообразие первичной структуры белков лежит в основе их видовой специфичности.

5.Взаимосвязь первичной структуры с функцией белков

Изучение первичной структуры белков имеет важное общебиологическое и медицинское значение . Изучая порядок чередования аминокислотных остатков в индивидуальных белках и сопоставляя эти знания с особенностями пространственного расположения молекулы, можно выявить общие фундаментальные закономерности формирования пространственной структуры белков. Кроме того, многие генетические болезни – результат нарушения в аминокислотной последовательности белков. Информация о первичной структуре нормального и мутантного белка может быть полезна для диагностики и прогнозирования развития заболевания.

Взаимосвязь функции белков от их пространственной структуры

Молекулы белков представляют собой линейные полимеры, состоящие из ц-1,-аминокислот (которые являются мономерами) и. в некоторых случаях, из модифицированных основных аминокислот (правда, модификации происходят уже после синтеза белка на рибосоме). Для обозначения аминокислот в научной литературе используются одно- или трёхбуквенные сокращения. Хотя на первый взгляд может показаться, что использование в большинстве белков «всего» 20 видов аминокислот ограничивает разнообразие белковых структур, па самом деле количество вариантов трудно переоценить: для цепочки всего из 5 аминокислот оно составляет уже более 3миллионов, а цепочка из 100 аминокислот (небольшой белок) может быть представлена более чем в 10^{130} вариантах. Белки длиной от 2 до нескольких десятков аминокислотных остатков часто называют **пептидами,** при большей степени полимеризации — **белками,** хотя это деление весьма условно.

При образовании белка в результате взаимодействия а-аминогруппы (-NH_2) одной аминокислоты с а-карбоксильной группой (-COOH) другой аминокислоты образуются пептидные связи. Концы белка называют С- и N- концом (в зависимости от того, какая из групп концевой аминокислоты свободна: -COOH или - NH_2. соответственно). При синтезе белка на рибосоме новые аминокислоты присоединяются к С-концу, поэтому название пептида или белка даётся путём перечисления аминокислотных остатков начиная с N-конца.

Последовательность аминокислот в белке соответствует информации, содержащейся в гене данного белка. Эта информация представлена в виде последовательности нуклеотидов, причём одной аминокислоте соответствует одна или несколько последовательностей из трёх нуклеотидов —так называемых **триплетов** или кодонов. То какая аминокислота соответствует данному ко дону в мРНК определяется генетическим кодом, который может несколько отличаться у разных организмов.

Сравнение аминокислотных последовательностей белков (в данном случае гемоглобинов) из разных организмов позволяет определять участки, важные для функционирования белков, а также эволюционную историю сравниваемых видов

Уровни структуры белка

Кроме последовательности аминокислот полипептида (первичной структуры), крайне важна трёхмерная структура белка, которая формируется в процессе фолдинга (от англ. *folding),* «сворачивание»). Трёхмерная структура формируется в результате взаимодействия структур более низких уровней. Выделяют четыре уровня структуры белка[12]:

• **Первичная структура** - последовательность аминокислот в полипептидной цени. Важными особенностями первичной структуры являются консервативные

мотивы -сочетания аминокислот, важных для функции белка. Консервативные

мотивы сохраняются в процессе эволюции видов, по ним можно предсказать функцию неизвестного белка.

• **Вторичная структура** — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями. Ниже приведены некоторые распространённые типы вторичной структуры белков:

• а-спирали — плотные витки вокруг длинной оси молекулы, один виток составляют 3.6 аминокислотных остатка, спираль стабилизирована водородными связями между Н и О пептидных групп, отстоящих друг от друга на 4 звена. Спираль построена исключительно из одного типа стереоизомеров аминокислот (L), хотя она может быть как левозакрученной так и правозакрученной. в белках преобладает правозакрученная. Спираль нарушают 'электростатические взаимодействия глутаминовой кислоты. лизина, аргинина, близкорасположенные аспарагин. серин, треонин и лейцин могут стерически мешать образованию спирали, пролин вызываем изгиб цепи и также нарушает а-спирали.

• В-листы (складчатые слои)- несколько зигзагообразных полипептидиых цепей, в которых водородные связи образуются между относительно удалёнными друг от друга в первичной структуре аминокислотами или разными цепями белка, а не близко расположенными, как имеет место в а-спирали. Эти цепи обычно направлены **N**-концами в противоположные стороны (антипараллельная ориентация). Для образования В-листов важны небольшие размеры R-групп аминокислот, преобладают обычно глицин и аланин.

• **п**-спирали:

• 3_{10}-спирали;

• неупорядоченные фрагменты.

Разные способы изображения трёхмерной структуры белка на примере фермента триозофосфатизомеразы. Слева - «палочковая» модель, с изображением всех атомов и связей между ними; цветами показаны элементы. В середине изображены структурные мотивы, а-спирали и В-листы. Справа изображена контактная поверхность белка, па основании Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов: цветами показаны особенности активности участков Третичная структура

— пространственное строение полипептидной пени — взаимное расположение элементов вторичной структуры, стабилизированное взаимодействием между боковыми цепями аминокислотных остатков. В стабилизации третичной структуры принимают участие:

• ковалентные связи (между двумя цистеинами дисульфидные мостики):

• ионные (электростатические) взаимодействия (между противоположно заряженными аминокислотными остатками):

• водородные связи;

• гидрофобные взаимодействия.

Белки разделяют на группы согласно их трёхмерной структуре. Например, изображённый на картинке справа белок, триозофосфатизомераза, состоит из восьми а-спиралей, расположенных на внешней поверхности структуры и восьми параллельных В-слоёв внутри структуры. Белки с подобным трёхмерным строением называются ав-баррелы (от англ. barrel — бочка) [1].

Четверичная структура

— субъединичная структура белка. Взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса.

Также выделяют:

• **Трёхмерную структуру белка** - набор пространственных координат.

составляющих белок атомов.

• **Субъединичную (доменную) структуру белка** - последовательность участков белка, имеющих известную функцию или определённую трёхмерную структуру.

• **Гидрофобное ядро,** обеспечивающее сворачивание белка.

Образование и поддержание структуры белков в живых организмах

Способность белков восстанавливать правильную трёхмерную структуру после денатурации позволила выдвинуть гипотезу о том. что вся информация о конечной структуре белка содержится в его аминокислотной последовательности. В настоящее время общепризнана теория о том, что в результате эволюции стабильная конформация белка обладает минимальной свободной энергией по сравнению с другими возможными конформациями этого полипептида [13].

Тем не менее, в клетках существует группа белков, функция которых обеспечение восстановления структуры белков после повреждения, а также создание и диссоциация белковых комплексов. Эти белки называются шаперопами. Концентрация многих шаперонов в клетке возрастает при резком повышении температуры окружающей срезы поэтому они относятся к группе lisp (англ. heat shock proteins - белки теплового шока)[14] Важность нормальной работы шаперонов для функционирования организма может быть проиллюстрирована на примере шаперона. а-кристаллина. входящею в состав хрусталика глаза человека. Мутации в этом белке приводят к помутнению хрусталика из-за анкетирования белков и. как результат, к катаракте[15].

Зависимость биологических функции от структурной организации.

Биологическая активность и функции белков зависят от структуры белка (первичной, вторичной и третичной), т.к. информация о структуре белка заложена в его первичной структуре, порядке последовательности аминокислот в полипептидной цепи. Активный центр белка формируется в третичной структуре, что обеспечивает его активность. При денатурации белка его активность теряется. Если под действием различных факторов изменяется конформация белка (третичная и четвертичная структура) изменяется и форма активного центра вследствие чего белок или становится активнее или ингибируется.

Изофункциональные белки

В живых организмах белки, выполняющие определенную функцию могут иметь различное строение, эти белки носят название изофункциональных или изобелков. Например, гемоглобин эритроцитов может иметь несколько форм; у взрослого человека превалирует HbA (90% всего гемоглобина). Имеется HbF и HbAa. Гемоглобин состоит из четырех субъединиц, является сложным белком, в состав которого входит гем и белковая часть, которая представлена четырьмя белками: α, β, γ, δ. Гемоглобин HbA содержит 2α и 2β цепи; HbF – 2α, 2γ цепи, HbA_2 – 2α и 2δ цепи. Все формы гемоглобина отличаются по первичной структуре, но выполняют одинаковые функции, присоединяют кислород и транспортируют его в органы и ткани. Они обладают различной активностью к кислороду и

HbF может отнимать кислород у HbA. Различные молекулярные формы одного и того же белка в организме человека называют изобелками, однако гемоглобин, например кролика, хотя и выполняет ту же функцию, не является изобелком, они являются гомологическими белками.

Взаимосвязь белков с лигандами.

Белки – это высокоспецифические белки, т.е. они не могут вступать в реакции с различными веществами из-за специфического строения их активного центра. Вещество (субстрат) специфичный для данного белка (его активного центра) называются лигандами. Лигандами могут и низкомолекулярные, и высокомолекулярные вещества.

Классификация белков.

Белки делятся на два больших класса: простые и сложные. Простые белки состоят только из остатков аминокислот. К ним относятся гистоны, протамины, глютины, альбумины, тропные гормоны.

Сложные белки кроме белковой части, содержат небелковую часть: гемм, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты. Соответственно они называются: гемоглоби, липопротеиды, гликопротеиды, нуклеопротеиды и т.п.

По форме белковой молекулы (в третичной стркуктуре) белки подразделяются на: глобулярные – хорошо растворимые в воде и фибриллярные – не растворимые в воде.

Изменение белкового состава организма при онтогенезе и болезнях.

Белковый состав каждого органа зависит от выполняемых его функции. Например: молекулы содержат белки, которые могут сокращаться. Печень выполняет функции: синтез кетоновых тел, нуклеиновых кислот, иммуноглобулинов, белков свертывания крови, обезвреживание ядовитых и лекарственных веществ. При росте и развитии организма (онтогенез) изменяется и белковый состав органов и тканей. Например, в эмбриогенезе в печени отсутствуют многие ферменты и они начинают образовываться после рождения ребенка.

Образование новых ферментов начинается при употреблении ребенком материнского молоко. Другие ферменты образуются при переходе от материнского молока к обычным продуктам. При онтогенезе изменяется эзоферментный спектр ферментов. Например: в период эмбриогенеза в организме встречаются только 2 изофермента из 5 фосфофруктокиназы. Таким образом, при индивидуальном развитие (онтогенезе) свойственно изменение форм ферментов.

При болезнях также наблюдается изменение форм ферментов. Примером тому служат белки плазмы крови, которые имеют значение

Физико-химические свойства белков

Молекулярная масса белков

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков, объединенных в макромолекулярную структуру. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 (нижний предел) до 1000000 и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Такие полипептидные цепи получили название субъединиц. Их мол. масса варьирует в широких пределах – от 6000 до 100000 и более.

Аминокислотный состав и последовательность аминокислот выяснены для многих тысяч белков. В связи с этим стало возможным вычисление их молекулярной массы

химическим путем с высокой точностью. Однако для огромного количества встречающихся в природе белков химическое строение не выяснено, поэтому основными методами определения молекулярной массы все еще остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.).

На практике наиболее часто используются методы седиментационного анализа, гель-хроматография и гель-электрофорез. Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа проводят в ультрацентрифугах , в которых удается создать центробежные ускорения (g), превышающие в 200000 и более раз ускорение земного притяжения. Обычно вычисляют молекулярную массу по скорости седиментации молекул белка или седиментационному равновесию. По мере перемещения молекул от центра к периферии образуется резкая граница растворитель-белок (регистрируется автоматически). Оптические свойства растворителя и белка используются при определении скорости седиментации; последнюю выражают через константу седиментации s, которая зависит как от массы, так и от формы белковой частицы:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r},$$

где v – скорость перемещения границы растворитель-белок, см/с; ω – угловая скорость ротора, рад/с; r – расстояние от центра ротора до середины ячейки с раствором белка, см. Константа седиментации имеет размерность времени (ее выражают в секундах). Величина константы седиментации, равная 1•10–13 с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S). Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.

Для вычисления молекулярной массы (M), помимо константы седиментации, необходимы дополнительные сведения о плотности растворителя и белка и другие согласно уравнению Сведберга:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s}{D\,(1 - \bar{v}\rho)},$$

где R – газовая постоянная, эрг/(моль•град); T – абсолютная температура (по шкале Кельвина); s – константа седиментации; ρ – плотность растворителя; v – парциальный удельный объем молекулы белка; D - коэффициент диффузии.

Определение молекулярной массы белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и сложной и дорогостоящей аппаратуры. Поэтому в последние годы разработаны два более простых метода (гель-хроматография и электрофорез).

Форма белковых молекул

О величине и форме белковых молекул раньше судили по данным ультрацентрифугирования, двойного лучепреломления и диффузии. Эти данные указывали на существование в природе глобулярных (шарообразных) и фибриллярных (нитевидных) белков. В настоящее время общие представления о форме белковых молекул в основном подтвердились, однако только современные методы исследования позволили установить детали пространственной конфигурации (трехмерной структуры) белковых молекул. Благодаря применению сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа (высокое разрешение, порядка 0,2–0,3 нм) удалось в деталях расшифровать не только полную пространственную структуру, форму, но и степень асимметрии белковых молекул во всех трех измерениях. Оказалось, что даже глобулярные белки крови (гемоглобин, альбумины и глобулины) являются асимметричными в указанных измерениях. Следует отметить, что не только физико-химические, но и биологические свойства белков (в свободном или в связанном друг с другом или с другими биополимерами состоянии) определяются их пространственной структурой.

Коллоидные свойства белков

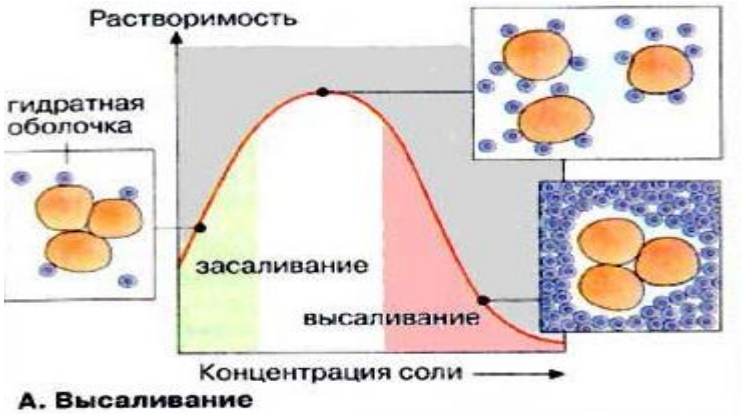
Белки обладают явно выраженными гидрофильными свойствами. Растворы белков имеют очень низкое осмотическое давление, высокую вязкость и незначительную способность к диффузии. Белки способны к набуханию в очень больших пределах. С коллоидным состоянием белков связан ряд характерных свойств, в частности явление светорассеяния, лежащее в основе количественного определения белков методом нефелометрии. Этот эффект используется, кроме того, в современных методах микроскопии биологических объектов. Молекулы белка не способны проникать через полупроницаемые искусственные мембраны (целлофан, пергамент, коллодий), а также биомембраны растительных и животных тканей, хотя при органических поражениях, например, почек капсула почечного клубочка (Шумлянского-Боумена) становится проницаемой для альбуминов сыворотки крови и последние появляются в моче.

Растворимость и осаждаемость белков

Растворимость белка в воде зависит от количества гидрофильных групп, от размеров и формы молекул, от величине суммарного заряда. В изоэлектрическом состоянии растворимость белков обычно снижена, поскольку отсутствует электростатическое отталкивание между молекулами, и они склонны образовывать крупные многомолекулярные агрегаты, не способные удерживаться в растворе. Растворимость белков зависит также от наличия других растворенных веществ. Например, некоторые белки не растворяются в дистиллированной воде, но растворяются в присутствии небольших концентраций нейтральных солей. При высоких концентрациях нейтральных солей белки выпадают в осадок, при чем для осаждения (высаливания) разных белков требуются разные концентрации соли. Следовательно, этим способом можно фракционировать белки. Чаще всего для разделения белков методом высаливания используют сульфат аммония. После удаления соли (например, путем диализа) осажденный белок вновь растворяется: при этом сохраняются его нативные свойства.

Высаливание, гельфильтрация, диализ белков

1. Высаливание. Растворимость белков сильно зависит от концентрации солей (от ионной силы). В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются плохо, однако их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы. При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов (светло-синие кружочки) связывается с поверхностью белка и тем самым уменьшается степень его агрегации (засаливание). При высокой ионной силе молекулы белков лишаются гидратирующих оболочек, что приводит к агрегации и выпадению белка в осадок (высаливание). Используя различие в растворимости, можно с помощью обычных солей, например (NH4)2SO4, разделить (фракционировать) смесь белков

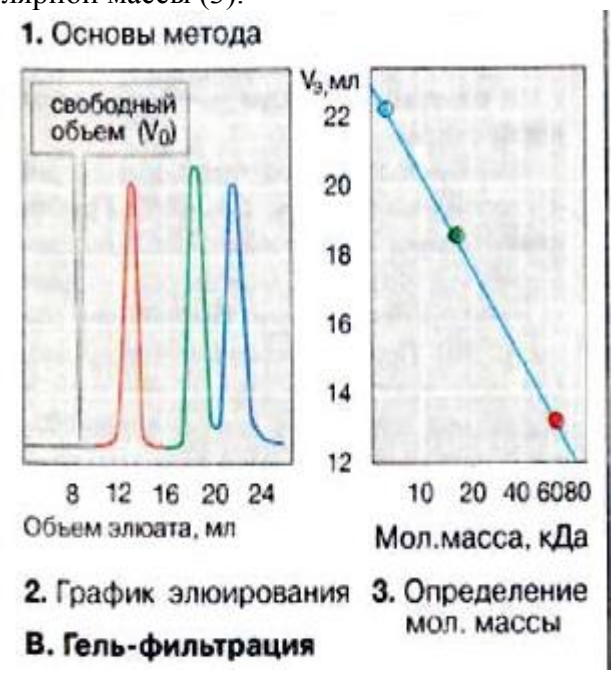


А. Высаливание

2. Диализ. Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют диализ. Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через полупроницаемые мембраны, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина pH и др.) будет тот же, что и в окружающем растворе.

Б. Диализ

3. Гельфильтрация. Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация) позволяет разделять белки по величине и форме молекул. Разделение проводят в хроматографических колонках, заполненных сферическими частицами набухшего геля (размером 10-500 мкм) из полимерных материалов (1а). Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. Смесь белков (1б) вносят в колонку с гелем и элюируют буферным раствором. Белковые молекулы, не способные проникать в гранулы геля (помечены красным цветом), будут перемещаться с высокой скоростью. Средние (зеленого цвета) и небольшие белки (синего цвета) будут в той или иной степени удерживаться гранулами геля (1в). На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций (2). Объем выхода того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы (3).



В. Гель-фильтрация

Хроматография и ее виды

Хроматография - физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами — неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную.

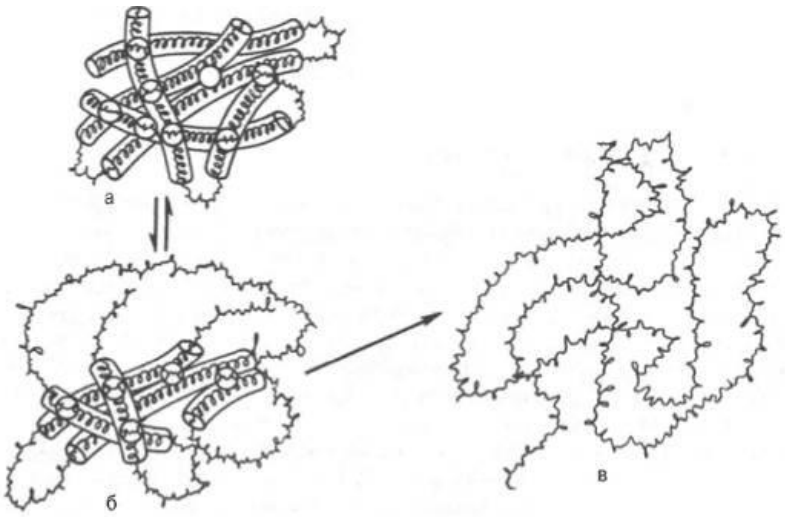
Виды хроматографии: адсорбционная, распределительная, ионообменная, эксклюзионная (молекулярно-ситовая) и осадочная. Адсорбционная хроматография основана на различии сорбируемости разделяемых веществ адсорбентом (твёрдое тело с развитой поверхностью); распределительная хроматография — на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе (высококипящая жидкость, нанесённая на твёрдый макропористый носитель) и элюенте (следует иметь в виду, что при распределительном механизме разделения на перемещение зон компонентов частичное влияние оказывает и адсорбционное взаимодействие анализируемых компонентов с твёрдым сорбентом); ионообменная хроматография — на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси; эксклюзионная (молекулярно-ситовая) хроматография — на разной проницаемости молекул компонентов в неподвижную фазу (высокопористый неионогенный гель); эксклюзионная хроматография подразделяется на гель-проникающую (ГПХ), в которой элюент — неводный растворитель, и гель-фильтрацию, где элюент — вода; осадочная хроматография, основана на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе.

Хроматография широко применяется в лабораториях и в промышленности для качественного и количественного анализа многокомпонентных систем, контроля производства, особенно в связи с автоматизацией многих процессов, а также для препаративного (в т. ч. промышленного) выделения индивидуальных веществ (например, благородных металлов), разделения редких и рассеянных элементов.

Денатурация и ренативация белков

Под денатурацией следует понимать нарушение общего плана уникальной структуры нативной молекулы белка, преимущественно ее третичной структуры, приводящее к потере характерных для нее свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность и т.д.). Большинство белков денатурирует при нагревании их растворов выше 50–60°С.

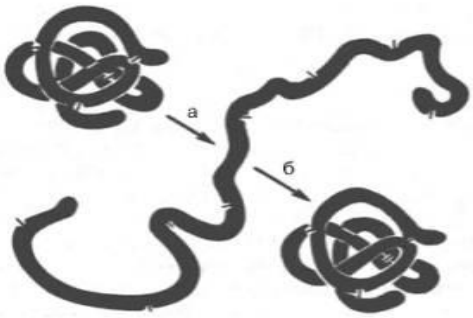
Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в изоэлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является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



Денатурация белковой молекулы (схема).

а - исходное состояние; б - начинающееся обратимое нарушение молекулярной структуры; в - необратимое развертывание полипептидной цепи.

Долгое время считалось, что процесс денатурации белков необратим. Однако, оказалось, что некоторые очищенные и денатурированные белки способны в опытных условиях восстанавливать конформацию при удалении денатурирующих агентов. Это открытие было сделано при изучении денатурации рибонуклеазы. Обработка рибонуклеазы β-меркаптоэтанолом ($HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SH$) приводит к разрыву дисульфидных связей и восстановлению SH-групп цистеиновых остатков, что нарушает компактную структуру белка. Добавление 8М раствора мочевины или 6М раствора гуанидинхлорида, вызывающих разрыв слабых связей в белке и образование новых водородных связей с денатурирующими агентами, приводит к образованию случайным образом свернутых полипептидных цепей рибонуклеазы, т.е. к денатурации фермента. Денатурирующие агенты не разрушают первичную структуру белка. Однао если путем диализа очистить рибонуклеазу от денатурирующих агентов и β-меркаптоэтанола, ыерментативная активность белка постепенно восстанавливается. Этот процесс носит название ренативации белка.



Денатурация и ренативация рибонуклеазы (по Анфинсену).

а - развертывание (мочевина + меркаптоэтанол); б - повторное свертывание.

Тема: Строение нуклеиновых кислот

1. Нуклеиновые кислоты: ДНК, РНК. Основные нуклеотиды клетки

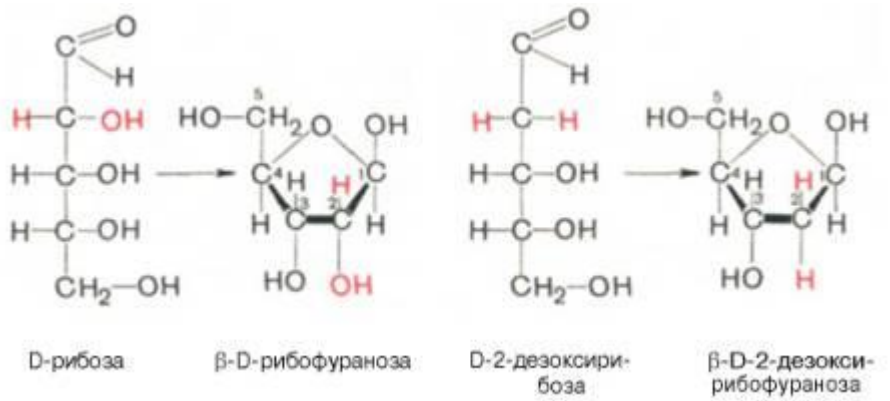
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) относятся к сложным высокомолекулярным соединениям, состоят из небольшого числа индивидуальных химических компонентов более простого строения. Так, при полном гидролизе нуклеиновых кислот (нагревание в

присутствии хлорной кислоты) в гидролизате обнаруживают пуриновые и пиримидиновые основания, углеводы (рибоза и дезоксирибоза) и фосфорную кислоту :

ДНК	РНК
H_3PO_4	H_3PO_4
Дезоксирибоза	Рибоза
Аденин	Аденин
Гуанин	Гуанин
Цитозин	Цитозин
Тимин	Урацил

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

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



D-рибоза β-D-рибофураноза D-2-дезоксири-боза β-D-2-дезокси-рибофураноза

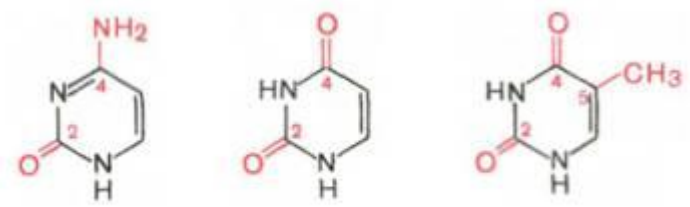
В составе некоторых фаговых ДНК обнаружена молекула глюкозы, которая соединяется гликозидной связью с 5-оксиметилцитозином.

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

Пиримидин Пурин

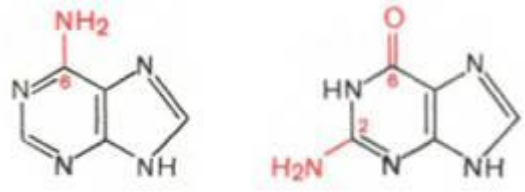
Молекула пурина состоит из двух конденсированных колец: пиримидина и имидазола.

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



Цитозин Урацил Тимин

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



Аденин Гуанин

О локализации и количественном содержании нуклеиновых кислот в клетках получены определенные данные. Доказано, что количественное содержание ДНК в клетках одного и того же организма отличается удивительным постоянством и исчисляется несколькими пикограммами, однако в клетках разных видов живых организмов имеются существенные количественные различия в содержании ДНК. Хорошо известно также, что ДНК преимущественно сосредоточена в ядре, а в митохондриях и хлоро-пластах содержится только небольшой процент клеточной ДНК. О количестве РНК нет точных данных, поскольку содержание ее в разных клетках в значительной степени определяется интенсивностью синтеза белка. На долю РНК приходится около 5–10% от общей массы клетки. Современная классификация различных типов клеточной РНК основывается на данных топографии, функции и молекулярной массы.

2. Первичная, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот

Первичная структура. Под первичной структурой нуклеиновых кислот понимают порядок, последовательность расположения мононуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК и РНК. Такая цепь стабилизируется 3',5'-фосфодиэфирными связями. Поскольку молекулярная масса нуклеиновых кислот колеблется в широких пределах (от 2•104 до 1010–1011), установить первичную структуру всех известных РНК и особенно ДНК весьма сложно. Тем не менее во всех нуклеиновых кислотах (точнее, в одноцепочечной нуклеиновой кислоте) имеется один и тот же тип связи – 3',5'-фосфодиэфирная связь между соседними нуклеотидами. Эту общую основу структуры можно представить следующим образом:

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

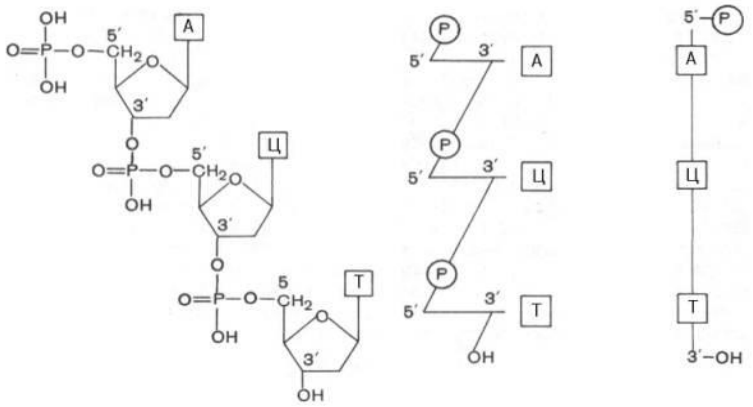
К настоящему времени удалось определить первичную структуру почти всех тРНК, ряда молекул 5S рРНК, 16S рРНК E.coli, вирусных РНК, в состав которых входят сотни и тысячи нуклеотидных остатков. Ниже приводится примерная схема последовательности нуклеотидов в молекуле РНК. Все клеточные РНК в основном состоят из одноцепочечной по-линуклеотидной цепи:

5'-Г–У–Г–Ц–А–А–...–У–Ц–Г–Ц–Ц–А–3'

Полинуклеотидная цепь молекулы РНК имеет на одном конце почти всегда свободный монофосфорный эфир, который принято обозначать как 5'-конец; на противоположном конце цепи такой фосфат отсутствует, а содержится нуклеотид со свободными 2'- и 3'-гидроксильными группами.

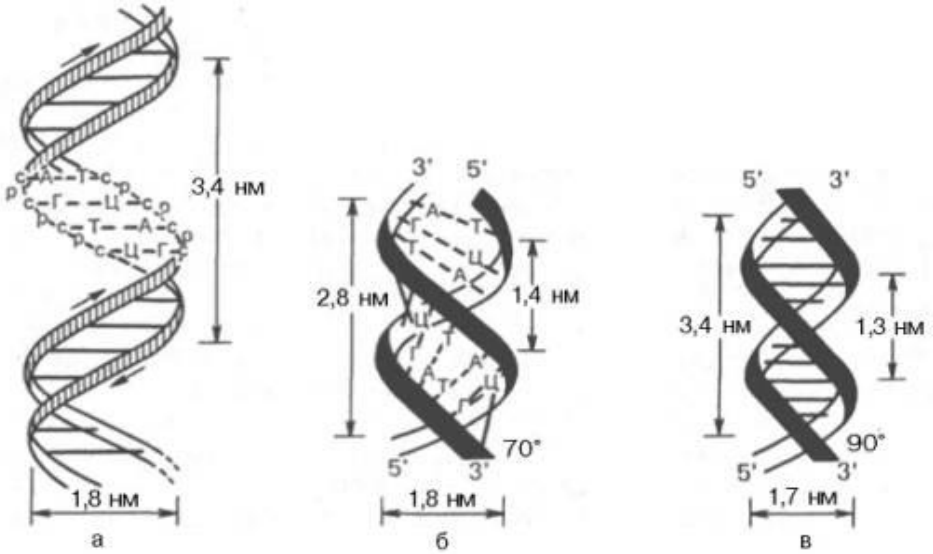
Следует особо указать на две существенные особенности первичной структуры всех тРНК. Первая из них заключается в том, что 5'-концом всегда является гуаниловая (редко цитидиловая) кислота, несущая свободный остаток фосфата у С-5'. Вторая особенность – наличие на противоположном конце молекулы остатков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

Ниже представлены три варианта схемы нуклеотидной последовательности ДНК:



В последнее время о первичной структуре ДНК (точнее, отдельных ее фрагментов) судят по ряду косвенных данных, например, по степени сплоченности нуклеотидных звеньев в молекуле ДНК (определение сводится в конечном счете к выяснению числа и структуры отдельных фракций нуклеотидов, так называемых изоплитов), также по кинетике реассоциации ДНК (метод позволяет выяснить наличие в молекуле повторяющихся последовательностей нуклеотидов). О первичной структуре ДНК судят, кроме того, по распределению минорных оснований (имеются данные о существовании подобной закономерности).

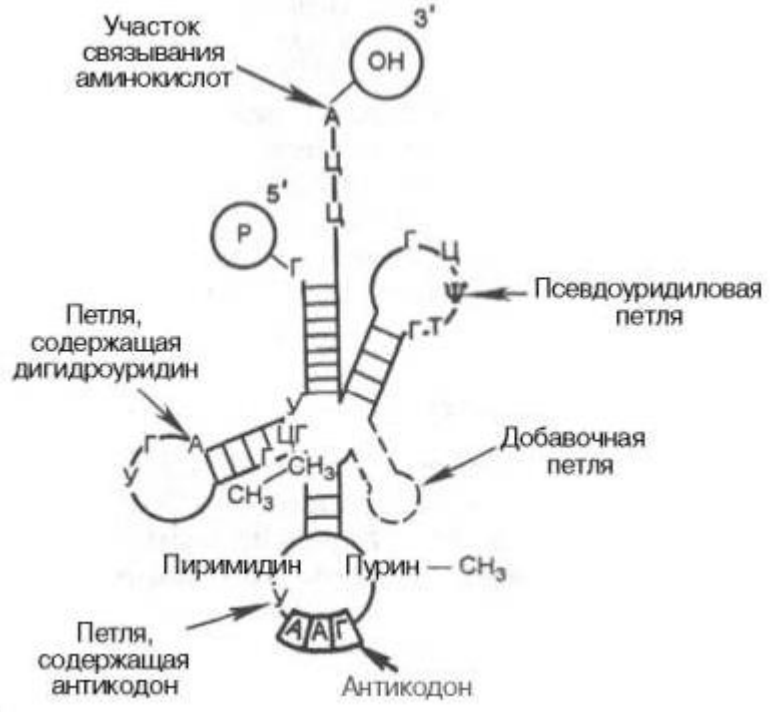
Вторичная структура. В соответствии с моделью Дж. Уотсона и Ф. Крика, предложенной в 1953 г. на основании ряда аналитических данных, а также рентгеноструктурного анализа молекула ДНК состоит из двух цепей, образуя правовращающую спираль, в которую обе полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной и той же оси. Удерживаются цепи благодаря водородным связям, образующимся между их азотистыми основаниями. Обе цепи поли-нуклеотидов в биспиральной молекуле ДНК имеют строго определенное пространственное расположение, при котором азотистые основания находятся внутри, а фосфорильные и углеводные компоненты – снаружи.



Схематическое изображение двойной спирали ДНК. а - по Уотсону и Крику : с - остаток дезоксирибозы, р - остаток фосфорной кислоты; б - А-фор-ма ДНК; в - В-форма ДНК.

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

Менее охарактеризована вторичная структура матричных и рибосомных РНК. Относительно вторичной структуры тРНК наиболее вероятной представляется модель, предложенная Р. Холли, плоское изображение которой напоминает клеверный лист:

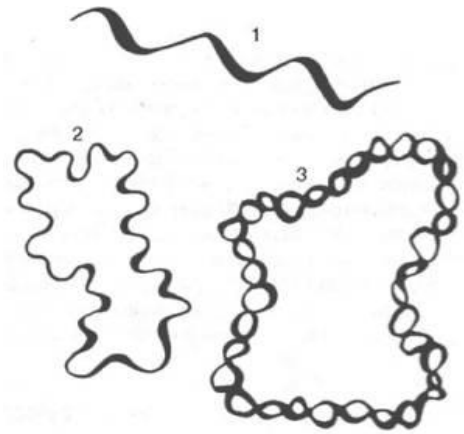


В настоящее время, когда известна первичная структура большинства тРНК, последовательность всех или почти всех природных тРНК как будто бы укладывается в эту схему «клеверного листа». При сравнении этих структур выявляется ряд закономерностей, несомненно, имеющих определенный биологический смысл. Во всех тРНК есть участки, взаимодействующие с рибосомами, места для связывания с аминокислотами и ферментами, а также специфическая последовательность трех нуклеотидов (триплет), называемая антикодоном, которая оказывается комплементарной тринуклеотидной последовательности мРНК (кодону), кодирующей включение в белковую молекулу определенной аминокислоты.

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

Третичная структура. Образование кольцевой формы молекулы ДНК у бактерий или в митохондриях клеток животных часто вызвано ковалентным соединением их открытых концов. Известно, что суперспиральная (суперскрученная) структура обеспечивает экономную упаковку огромной молекулы ДНК в хромосоме: вместо 8 см длины, которую она могла бы иметь в вытянутой форме, в хромосоме человека молекула ДНК настолько плотно упакована, что ее длина составляет 5 нм. Обычно в ДНК встречаются положительные и отрицательные супервитки, образованные за счет скручивания по часовой (правосторонней) или против часовой стрелки двойной спирали. Образование подобных супервитков катализируется специфическими ферментами, получившими название топоизомераз. Подобные суперспирали соединяются с белками (гистонами), упакованными в бороздках, обеспечивая тем самым стабильность третичной структуры ДНК. Степень суперспираль-ности (наличие супервитков) молекулы ДНК обычно устанавливают по изменению константы седиментации в определенных условиях. Суперспи-рализация ДНК может быть нарушена разрывом в одной из цепей или в обеих цепях двойной спирали под

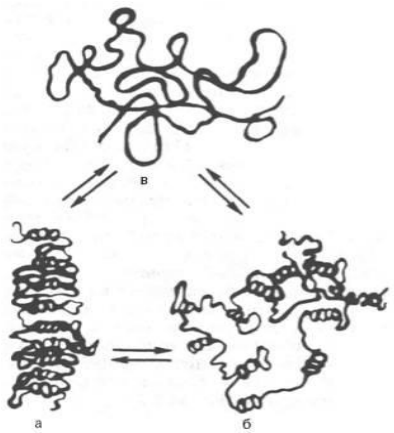
действием ДНКазы или при обработке интеркалирующими соединениями. Под интеркаляцией подразумевают встраивание плоских ароматических колец между стопками пар азотистых оснований ДНК. Интеркаляция может быть вызвана антибиотиками и красителями; в интактных клетках она может быть обусловлена ароматическими кольцами амнокислот, что имеет, очевидно, определенный биологический смысл в проблеме белково-нуклеинового узнавания.



Третичная структура ДНК (схема).

1 - линейная одноцепочечная ДНК - бактериофаг φX174 и другие вирусы; 2 - кольцевая одноцепочечная ДНК вирусов и митохондрий; 3 - кольцевая двойная спираль ДНК.

Данные о структуре тРНК свидетельствуют о том, что нативные молекулы тРНК имеют примерно одинаковую третичную структуру, которая отличается от плоской структуры «клеверного листа» большой компактностью за счет складывания различных частей молекулы. При физиологических значениях pH среды, ионной силы и температуры создаются условия для образования в одно-цепочечных матричных и рибосомных РНК множества участков с двойной спиралью («шпильки») и дальнейшего формирования комплементарных участков, определяющих в известной степени жесткость их третичной структуры



Третичная структура РНК в растворе в зависимости от ионной силы, температуры и pH среды (схема) (по А.С. Спирину и Л.П. Гаври-ловой). а - компактная палочка, б - компактный клубок; в - развернутая цепь.

3. Коэффициент специфичности нуклеиновых кислот

Исследуя нуклеотидный состав нативных ДНК различного происхождения, Чаргафф обнаружил следующие закономерности.

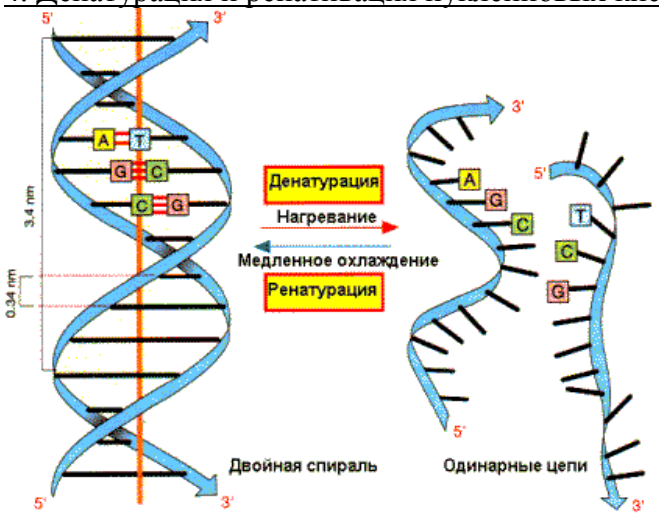
1. Все ДНК независимо от их происхождения содержат одинаковое число пуриновых и пиримидиновых оснований. Следовательно, в любой ДНК на каждый пуриновый нуклеотид приходится один пиримидиновый.

2. Любая ДНК всегда содержит в равных количествах попарно аденин и тимин, гуанин и цитозин, что обычно обозначают как A=T и G=C. Из этих закономерностей вытекает третья.

3. Количество оснований, содержащих аминогруппы в положении 4 пиримидинового ядра и 6 пуринового (цитозин и аденин), равно количеству оснований, содержащих оксо-группу в тех же положениях (гуанин и тимин), т. е. A+C=G+T. Эти закономерности получили название правил Чаргаффа. Наряду с этим было установлено, что для каждого типа ДНК суммарное содержание гуанина и цитозина не равно суммарному содержанию аденина и тимина, т. е. что (G+C)/(A+T), как правило, отличается от единицы (может быть как больше, так и меньше ее). По этому признаку различают два основных типа ДНК: A-T-тип с преимущественным содержанием аденина и тимина и G-C-тип с преимущественным содержанием гуанина и цитозина.

Величину отношения содержания суммы гуанина и цитозина к сумме содержания аденина и тимина, характеризующую нуклеотидный состав данного вида ДНК, принято называть коэффициентом специфичности. Каждая ДНК имеет характерный коэффициент специфичности, который может изменяться в пределах от 0,3 до 2,8. При подсчете коэффициента специфичности учитывается содержание минорных Оснований, а также замены основных оснований их производными. Например, при подсчете коэффициента специфичности для ЭДНК зародышей пшеницы, в которой содержится 6% 5-метилцитозина, Последний входит в сумму содержания гуанина (22,7%) и цитозина (16,8%). Смысл правил Чаргаффа для ДНК стал понятным после установления ее пространственной структуры.

4. Денатурация и ренативация нуклеиновых кислот



Денатурация и ренативация нуклеиновых кислот

5. ДНК-ДНК, ДНК-РНК гибридизация - соединение in vitro комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

Тема: Биосинтез нуклеиновых кислот

1. Виды переноса генетической информации

Можно отметить три варианта переноса генетической информации, обнаруженные в различных организмах.

1. Перенос генетической информации в пределах одного .класса нуклеиновых кислот, т. е. от ДНК к ДНК или у некоторых вйрусов от РНК к РНК, называется *репликацией* или самоудвоением. Иногда такой вид переноса наследственной информации образно называют- «переносом из хранилища в хранилище», подразумевая под этим, что ДНК (или РНК у некоторых вирусов) выполняет функцию хранилища генетической информации. Репликация происходит во время деления клеток (в 5-фазу митотического цикла) и размножения вирусов, когда необходимо целиком передать информацию от одного организма к другому. Возможна репликация отдельных участков ДНК, называемая амплификацией. •"

2. Перенос информации между разными классами нуклеиновых кислот: ДНК—РНК, называется *транскрипцией* или переписыванием. В отличие от репликации при транскрипции происходит копирование не целиком всей информации, заложенной в молекуле ДНК, .а только ее отдельных участков. В ходе транскрипции образуются все типы РНК: главные (мРНК, тРНК, рРНК) и минорные.

Из этого следует, что цистроны ДНК содержат информацию не только о структуре полипептидной цепи, но и о структуре тРНК, рРНК и минорных типов РНК.

, Транскрипция бывает прямая (от ДНК к РНК) и обратная (от РНК к ДНК). Впервые обратная транскрипция была выявлена у РНКовых опухоле-родных вирусов (называемых онкорнавирусами), которые встраиваются в ДНК клетки-хозяина путем обратной транскрипции. Чужеродный участок ДНК — копия вирусной РНК — вызывает опухолевую трансформацию клетки. Возможно, обратная транскрипция имеет значение не только при опухолевой трансформации клеток, но и при их нормальной жизнедеятельности или в ходе их дифференцировки. В принципе обратная транскрипция возможна при использовании любого типа РНК, а не только мРНК-

3. Перенос генетической информации от 'мРНК к белку, т. е. в пределах разных классов макромолекул, называется *трансляцией* или переводом. При трансляции происходит как бы перевод информации с «языка» нуклеиновых кислот, имеющего нуклеотидный алфавит, на «язык» полипептидной цепи, в котором использован аминокислотный алфавит. Транслируется только мРНК. Остальные типы РНК являются готовыми продуктами генов, образующимися при транскрипции. рРНК и тРНК играют вспомогательную роль при трансляции. Трансляция, по термодинамическим и биологическим соображениям, может быть только прямой — от мРНК к белку. Обратная трансляция запрещена.

Подобное направление переноса генетической информации от ДНК через РНК к белку называется *центральным постулатом_молекулярной* генетики, который был сформулирован Криком. Согласно ему не может быть переноса информации от белка к РНК, но допускается перенос от РНК к ДНК. Если вдруг обнаружится перенос информации от белка к РНК, то придется пересмотреть весь фундамент молекулярной генетики.

Итак, первичными продуктами действия генов являются два типа макромолекул. Это прежде всего белок и некоторые типы РНК: рРНК, тРНК и минорные РНК.

Все виды передачи генетической информации основаны на матричном механизме. Это означает, что для каждого из них необходима матрица. При репликации матрицей служит одна из цепей ДИК (или РНК у вирусов), при транскрипции—участок ДНК (прямая транскрипция) или РНК (обратная транскрипция), а при трансляции - мРНК, т. е. матрицей может быть только нуклеиновая кислота. Матрица позволяет е большой точностью (что очень важно, поскольку речь идет о наследственных свойствах) и экономичностью (что не менее важно) воспроизводить имеющуюся в клетке генетическую информацию. Точность копирования соответствующей нуклеиновой матрицы обеспечивает *привило комплементарное* азотистых оснований нуклеотидов, согласно которому происходит спаривание А с Т (или с У в РНК) и Г с Ц> Благодаря этому порядок чередования нуклеотидов в каждой новой полинуклеотидной цепи комплементарен матрице.

Представим себе, что не было бы матричного механизма переноса информации. В этом случае даже для сборки, например, одной цепи специфической ДНК бактерии, содержащей около миллиона нуклеотидов, нужно иметь полмиллиона высоко специфичных молекул ферментов (ибо каждая фосфодиэфирная связь между рядом стоящими нуклеотидами в полинуклеотидной цепи должна образовываться строго специфично). Следовательно, клетка должна иметь невероятно большой избыток ферментов только для репликации, а сам процесс был бы труден и длителен, к тому же высокая точность его вряд ли была бы возможна.

2. Молекулярные основы репликации

Теоретически возможны несколько вариантов репликации ДНК: *консервативная,,* когда дочерняя двойная спираль ДНК образуется без разделенниятцепей родительской ДНК; *полуконсервативная.* при которой цепи родительской ДНК расходятся, и на каждой из родительских цепей образуются комплементарные цепи дочерней ДНК, и *дисперсивная,* которая предусматривает расщепление в нескольких местах цепей родительской ДНК и образование на ней новых цепей ДНК

В 1957г Меселсон и Сталь установили, что в живых организмах репликация ДНК происходит по полуконсервативному механизму. Сначала он представлялся просто: на расплетающихся цепях ДНК, которые являются матрицами образуются комплементарные новые цепи ДНК. Нуклеотиды при этом выстраиваются по матрице соответственно правилу комплементарности, а «сшиваются», друг с другом фосфодиэфирнымй связями с помощью специального фермента *ДНК-полимеразы.* Впоследствии оказалось, что ДНК-полимераза не способна начать синтез новой ДНК из свободных нуклеотидов; она лишь способна удлинять полинуклеотидную цепь, т. е. для нее нужна затравка В настоящее время репликация ДНК представляется сложным, многоступенчатым процессом, который имеет отличительные признаки у прокариотов и эукариотов.

Для репликации ДНК необходим ряд условии:

1) наличие дезокснрибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ) как структурного материала для сборки новых пеней ДНК;
2) расплетение двойной спирали ДНК;
3) образование затравки;
4) наличие ферментов, участвующих в образовании затравки и синтезе новых полинуклеотидных цепей ДНК.

Механизм **репликации ДНК у прокариотов.** Каждая стадия процесса репликации протекает с участием соответствующих ферментов *Расплетающие белки* разрывают водородные связи между комплементарными и основаниями двойной спирали ДНК. В результате двойная спираль расплетается и расходится на отдельные цепи. (Внешне это напоминает расстегивание застежки «молния».) Расплетенный участок ДНК называется *репликативной вилкой.* В его образовании участвует сразу до 200 молекул расплетающего'белка, поэтому каждая ветвь репликативнои вилки, на которой происходит начало синтеза новой ДНК, имеет протяженность до 2000 неспаренных оснований. Механизм действия расплетающих белков детально не изучен Возможно, для расплетения ДНК используется энергия АТФ.

2 *«Затравочная» ДНК-зависимая РНК-полимераза* - особый вариант РНК-полимеразы (обычно эти ферменты участвуют в транскрипции), которая образует небольшую РНК-затравку («праймер»), комплементарную участку репликативной вилке. Синтез РНК-затравки идёт от конца 5 к концу 3. Порядок чередования нуклеотидоввРНК задаётся РНКматрицей, а сшивка их 5—3-фосфодиэфирными связями осуществляется РНК-полимеразой.

3.ДНК-Полимеразы. Известны три формы ДНК-полимераз у прокариотов: I, II и III. Все они обладают двумя видами активности: полимеразной и нуклеазной. Полимеразная состоит в образовании фосфодиэфирных связей 5'--3' между дезоксирибонуклеотидами, нуклеазная—в гидролизе фосфодиэфирных связей.

ДНК-полимераза I расщепляет РНК-затравку при репликации (действует как РНКаза) и на ее месте синтезирует комплементарный фрагмент ДНК.

ДНК-полимераза II имеет очень низкую полимеразную активность. Функция ее в репликации неизвестна.

ДНК-Полимераза III является основным ферментом репликации, синтезируя па разошедшихся цепях ДНК комплементарные участки новой'ДНК в направлении 5'--3'.

4. *Рибонуклеаза* Н. Участвует в гидролизе РНК-затравки в ходе репликации наряду с ДНК-полимеразой I.

5. *ДНК-Лигазы* (соединяющие ферменты). Обнаружено несколько ферментов, функция которых состоит в соединении друг с другом новосинтезированных фрагментов ДНК. ДНК-Лигазы образуют фосфодиэфирные связи 3'-->-5', используя $НАД^+$ в качестве источника аденилила.

Общая схема репликации представляется следующим образом (рис. 65). Под действием расплетающих белков образуются сразу в несколькихГ&естах молекулы ДНК (как правило, на внутренних участках) репликативные вилки. ^.Начинается репликация (инициация) с образования РНК-затравки с помощью РНК-полимеразы в направлении 5'-*-3'. После завершения синтеза короткой цепи РНК на матрице ДНК фермент отделяется от ДНК. Далее происходит присоединение к РНК-затГравке дезоксирибонуклеотидов с по-молсыа ДН К - ч ол и мера зы__111 в (^равлений^ТТ^^ЗТ^ОбТтуется гибридная цепь: РНК —ДНК- Причем" ДНК-полимераза III синтезирует короткие фрагменты ДНК (фрагменты Оказаки) на другой "родительской цепи репликатив-пой вилки. Интересно, что по ходу синтеза ДНК-полимераза III может исправлять ошибки при неправильном спаривании нуклеотидов. Если произошла ошибка, то этот нуклеотид тут же отщепляется ферментом благодаря нуклеазной активности, а при правильном спаривании нового нуклеотида присоединяет его к уже имеющемуся фрагменту ДНК.

РНК-Затравка после действия ДНК-полимеразы III полностью удаляется или специфической рибонуклеазой Н, или ДНК-полимеразой I. На месте бывшей РНК-затравки наращивается цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы 1. Соединение синтезированных фрагментов ДНК (фрагментов Оказаки) к направлении 3'-^б' происходит с помощью ДНК-лигазы.

Точность репликации очень высока. Частота спонтанных ошибок при репликации составляет около $10\sim'^6$—$10\sim^9$. Это означает, что возможно ошибочное включение только одного нуклеотида на каждый новосинтезированный фрагмент ДНК, содержащий 10^6—10^9 нуклеотидов.

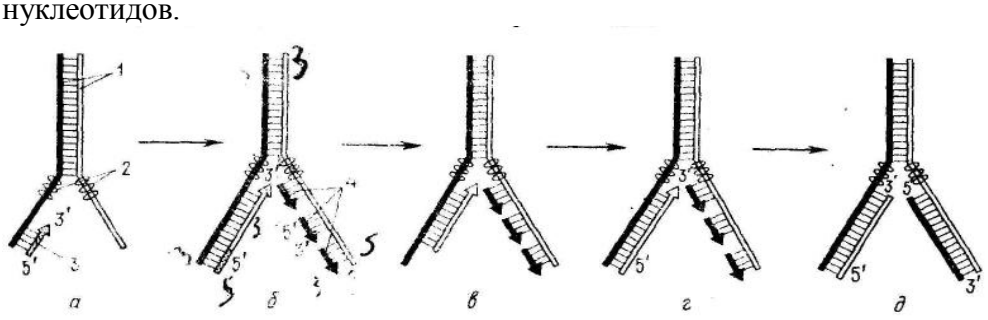


Рис. 05. Схема репликации ДНК:

Репликация ДНК у эукариот. Репликация ДНК в хромосомах и митохондриях эукариотов происходит тоже полуконсервативным способом. Имеют ся некоторые особенности репликации ДНК ядер и митохондрий (или хлоропластов) эукариот. В клетках млекопитающих обнаружены те же ферменты репликации ДНК (расплетающие белки,. РНК-полимераза, ДНК-полимеразы, рибонуклеаза Н, ДНК-лигазы). Однако эти ферменты отличаются по молекулярной структуре и свойствам от ферментов прокариотов. Так, ДНК-полимеразы ядер (а их тоже обнаружено три — а, в и у) и митохондрий (у-типа) клеток млекопитающих не обладают нуклеазной активностью. Наиболее активна у них ДНК-полимераза а. Она, видимо, выполняет ту же функцию при репликации, что и ДНК-полимераза III прокариотов.

Репарация ДНК. Репарацию, или исправление поврежденных участков одной из цепей ДНК, можно рассматривать как ограниченную репликацию. Наиболее изучен процесс репарации при повреждении цепи ДНК ультрафиолетовым излучением, например, эпителиальных клеток кожи. При УФ облучении образуются «сшивки» между соседними остатками тимина в ДНК. Эти димеры тимина уже не могут выполнять функцию матрицы при репликации.

3. Молекулярные основы транскрипции

В процессе жизнедеятельности зрелой клетки только часть генетической информации, записанной в ДНК хроматина, реализуется при транскрипции в виде копий РНК- Участки неактивной, или репрессированной, ДНК входят в состав глобулярных нуклеосом хроматина, а активной — в состав межнуклеосомных фрагментов или «развернутых» линейных нуклеосом.

Элементарную единицу транскрипции у прокариотов и эукариотов, т. с. отрезок ДНК, подвергающийся транскрипции, принято называть *транскриптоном.* Иногда транскриптоны прокариотов называют также *оперонами.* Длина транскриптонов колеблется от 300 до 10^8 нуклеотидов (последняя цифра характерна для высших эукариотов, у которых, как правило, размеры транскриптонов намного больше, чем у прокариотов).

Отдельные участки транскриптонов несут разную функцию. Одна группа участков относится к информативным, а другая — к неинформативным. К информативным относятся структурные цистроны или гены, несущие информацию о структуре полипептидной цепи или нематричных РНК (рРНК, тРНК, других низкомолекулярных стабильных РНК); неинформативные выполняют другие функции и не содержат генетической информации. Особенно велика неинформативная часть транскриптона у высших эукариотов. Совершенно неожиданно оказалось, что структурные гены в транскриптоне могут быть двух типов: непрерывными и «разорванными», или прерывистыми. Неприрывность генов считалась абсолютным признаком. Действительно, трудно было представить, что, например, полипептидная цепь записана в соответствующем цистроне не вся, а кусками. Тем не менее во многих структурных генах, особенно эукариотов, генетическая информация записана с перерывами. Участки в структурных генах, несущие информацию, называются *экзонами.* а неинформативные — *интронами.* Возможно, интроны играют дополнительную регуляторную функцию для экзонов.

В ДНК хромосом обнаружены подвижные фрагменты, которые названы *мобильными генами* или *транспозонами.* Выявлено несколько разновидностей таких генов, отличающихся нуклеотидным составом и длиной полинуклеотидной цепи. Миграцию транспозонов объясняют механизмом обратной транскрипции, т. е. сначала образуется транскрипт мобильного гена, а затем он используется как матрица для встраивания ДНК-копии в другом участке хромосом. Функция «прыгающих» генов еще не ясна. Известно, однако, что они могут вызывать перестройки в геноме, изменять функцию тех участков ДНК, рядом с которыми они встраиваются. В частности, вклиниваясь рядом с онкогеном (участком ДНК, вызывающим перестройку нормальной клетки в опухолевую), мобильные гены активируют их функцию,-что может привести к опухолевому перерождению ткани. Вместе с тем мобильные гены, участвуя в перестройке отдельных фрагментов хромосом, влияют на изменчивость организмов и их эволюцию.

Схема функциональной организации транскриптона у прокариотов и эукариотов представлена на рис. 66. Начальный участок транскриптона, с которого начинается транскрипция, называется *промотор.* К нему присоединяются белки, облегчающие начало транскрипции, и фермент транскрипции РНК-полимераза. *Оператор* — участок ДНК, связывающий белки-регуляторы транскрипции. Таким белком-регулятором транскрипции у прокариотов является *репрессор.*

У эукариотов после промотора находится участок транскриптона, который называют *акцепторной* или *управляющей* зоной. С ней взаимодействуют различные регуляторы, влияющие на транскрипцию. В акцепторной зоне имеется фрагмент ДНК (его называют усилитель или «энхансер»), который облегчает транскрипцию с участием РНК-полимеразы.

К оператору, или акцепторной зоне, примыкают структурные цистроны, или гены, содержащие перемещающиеся участки нитронов и экзонов. В одном трайскриптоне может быть один, структурный цистрон (моноцистронный транскриптон) или несколько (полицистронный транскриптон). В конце транскриптона имеется последовательность нуклеотидов, которая является своего рода сигналом об окончании транскрипции, — *терминатор.* РНК; образующаяся при транскрипции, называется *транскриптом.* Транскрипт — комплементарная копия транскриптона от промотора до терминатора.

Для транскрипции необходимы определенные условия:

1) участок ДНК, подлежащий транскрипции, должен быть расплетен для образовании одноцепочечной матрицы (только одна цепь ДНК служит матрицей при синтезе» РНК; если бы обе цепи ДНК одновременно использовались в качестве' матрицы, то на одном транскриптоне синтезировались бы две комплементарные РНК, несущие информацию для двух разных белков);

2) наличие рибонуклсозидтрнфосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ, Ц'ГФ) для синтеза РНК;

3) наличие специальных ферментов транскрипции ДНК-зависимых „„-РНК-полимераз, синтезирующих РНК по матрице ДНК.

Механизм транскрипции ДНК. Транскрипция имеет три фазы: инициацию, элонгацию и терминацию, т. е. начало, продолжение и окончание синтеза РНК.

Инициации транскрипции происходит вследствие присоединения ДНК-зависимой РНК-полимеразы к промотору, обладающему высоким сродством к этому ферменту. Промотор — стартовая точка транскрипции. РНК-полимераза ирокариотов состоит из пяти разных субъединиц. Четыре из них образуют агрегат, называемый *кор-ферментом* (от лат. сог — сердце, сердцевина), катализирующий образование фосфодиэфирных связей между нуклеотидами в РНК. Пятая субъединица, называемая а-фактором или о-субъединицей, легко отделяется от кор-фермента. Эта о-субъединица как бы выбирает стартовую точку транскрипции, связываясь с промотором. Затем .к о-фактору, выбравшему место транскрипции, присоединяется кор-фермент и начинает транскрипцию. Неясно, что вызывает разъединение двойной спирали ДНК в месте транскрипции. Возможно, эту функцию тоже выполняет РНК-полимераза, а может быть, есть специальный белок (типа расплетающего, как при репликации).

У эукариотон имеется три РНК-полимеразы: I, II и III. Это белки, состоящие из нескольких субъединиц и отличающиеся друг от друга по специфичности транскрипции. РНК-Полимераза I ответственна за транскрипцию генов рРНК, РНК-полимераза II - за тРНК и 55 рРНК, а РНК-полимераза III участвует в синтезе предшественника мРНК. Очевидно, структура трех разных типов РНК-полимераз эукариотов предусматривает специфический выбор транскриптонов, содержащих информацию о структуре рРНК, тРНК и полипептидной цепи.

РНК-Полимеразы наращивают цепь всегда только в направлении 5'-»-3'. поэтому 5'-конец содержит всегда трифосфат (ф~ф~ф—), а 3' — свободный ОН. Начинается синтез всех цепей РНК либо о фффА, либо с фффГ, которые специфически спариваются со стартовыми основаниями разных транскрип тонов.

Элонгация транскрипции происходит при скольжении РНК полимеразы вдоль матрицы ДНК. Каждый следующий нуклеотид спаривается с комплементарным основанием в ДНК-матрице, а РНК-полимераза «скрепляет» его с растущей цепью РНК фосфодиэфирными связями. Скорость элонгации составляет примерно 40—50 нуклеотидов в секунду.

Терминация транскрипции происходит после достижении РНК-полимеразой нуклеотидных последовательностей ДНК, являющихся стоп-сигналами. Считают, что такими стоп-сигналами в транскриптоне могут быть поли(А) последовательности, поскольку в транскриптах на З'-конце обнаруживаются комплементарные им поли (У) последовательности. Выделен и специальный фактор терминации — р-фактор, который является белком. Он обрывает транскрипцию, каким-то образом взаимодействуя с термини-

рующими последовательностями транскриптона. Благодаря терминаторам цепи РНК образуются только определенной длины.

По мере того как транскрипция подходит к концу, синтезированная РНК отделяется от ДНК. Первичные продукты транскрипции, т. е. РНК, являются полными копиями (в комплементарном изображении) транскриптонов ДНК. А значит, в новосинтезированной РНК имеются информативные и неинформативные участки. Причем неинформативные участки, несущие определенные функции в транскриптоне ДНК, очевидно, не нужны в РНК и являются своеобразными издержками транскрипции. Да и перенесены они в РНК потому, что процесс транскрипции непрерывен, а «выборочное» копирование только информативных (структурных) участков транскриптонов вряд ли возможно. Первичные транскрипты нужно освободить от неинформативного груза и оставить только информативную часть молекул РНК

Процессинг включает три операции:

1) вырезание неинформативных участков из пре-РНК;
2) сращивание информативных участков «разорванных» генов — *сплайсинг;* .
3) модификация 5'- и 3'-концевых участков РНК.

Процессинг пре-мРНК- Вырезание неинформативных участков пре-мРНК осуществляется с помощью рибонуклеаз (экзо- и эндонуклеаз) . Они гидро-лизуют фосфодиэфирные связи, начиная с 5'-конца, и оставляют от пре-мРНК •необходимую часть готовой мРНК. Если пре-мРНК получена с транскриптона, содержащего разорванные гены, то происходит вырезание нитронов (участков, не несущих информации), находящихся во внутренней части пре-мРНК. Оставшиеся экзоны сращиваются в единую цепь с помощью специальных РНК-лигаз. В результате восстанавливается, уже после транскрипции, непрерывность генов, кодирующих полипептидные цепи. Далее здесь же в ядре происходит модификация 5'- и 3'-концов образовавшейся мРНК. К 5'-концу мРНК присоединяется олигонуклеотид, который называется «колпачком» или «кэпом». Этот «колпачок» состоит, как правило, из двух или трех метилированных нуклеотидов; концевым нуклеотидом является 7-метил-гуанозин, который соединен с остальной мРНК не 3'-^3', а 5'->-5' фосфо-диэфирной связью. Этот метилированный «колпачок» защищает мРНК от. разрушения 3'-экзонуклеазами.

К 3'-концу мРНК у эукариот присоединяется полиадениловый фрагмент-поли (А), состоящий примерно из 200 нуклеотидов. Присоединение осуществляется с помощью *поли(А)-полимеразы.* Этот поли (А) -фрагмент, очевидно, необходим для транспорта мРНК из ядра в цитоплазму.

Процессинг пре-рРНК- Пре-рРНК образуется в ядрышке, где находятся транскриптоны рРНК. В ДНК ядрышка гены 183 и 285 рРНК входят в один транскриптон, где расположены тандемами, т. е. попарно друг за другом. В пре-рРНК их расположение такое же. Размеры пре-рРНК достигают 455 (молекулярная масса порядка 4 — 5- 10^6). В ходе нроцеесинга остается чуть больше половины пре-рРНК и освобождаются зрелые 185 и 285 рРНК. Часть нуклеотидов рРНК, подвергается модификации, которая состоит в метилировании оснований. Реакция осуществляется *метилгранс феразами.* В роли донора метильных групп выступает 5-аденозилметионин. Зрелые рРНК соединяются в ядре с белками рибосом, поступающих сюда из цитоплазмы, и образуют малую и большую субчастицы рибосом.

Процессинг пре-тРНК- Пре-тРНК образуется в разных местах ДНК хромосом и содержит излишки примерно в 40 нуклеотидов по сравнению со зрелой тРНК. При процессинге рибонуклеазами удаляются излишки нуклеотидов, а затем происходит метилирование оснований тРНК. Этот процесс аналогичен метилированию рРНК. Метилирование препятствует разрушению тРНК нуклеазами. Окончательно зрелая тРНК образуется путем присоединения специфической тройки нуклеотидов (акцепторного конца) — ЦЦА, кото-рос осуществляется специальной РНК-полимеразой.

Транспорт зрелых РНК из ядра в цитоплазму. В отличие от прокариот у эукариотов имеется ядерная мембрана, через которую необходимо доставить готовые РНК в цитоплазму, где происходит синтез белка. Все зрелые РНК транспортируются из ядра в цитоплазму в

комплексе с белком, который дополнительно защищает их от разрушения и способствует переносу.

Биосинтез белка

1. Генетический код и его биологические свойства

Необходимость кодирования структуры белков в линейной последовательности нуклеотидов мРНК и ДНК продиктована тем, что в ходе трансляции:

•нет соответствия между числом мономеров в матрице мРНК и продукте - синтезируемом белке;

•отсутствует структурное сходство между мономерами РНК и белка.

Это исключает комплементарное взаимодействие между матрицей и продуктом - принцип, по которому осуществляется построение новых молекул ДНК и РНК в ходе репликации и транскрипции.

Отсюда становится ясным, что должен существовать «словарь», позволяющий выяснить, какая последовательность нуклеотидов мРНК обеспечивает включение в белок аминокислот в заданной последовательности. Этот «словарь» получил название генетического, биологического, нуклеотидного, или аминокислотного кода. Он позволяет шифровать аминокислоты, входящие в состав белков, с помощью определённой последовательности нуклеотидов в ДНК и мРНК. Для него характерны определённые свойства.

Триплепюсть. Одним из основных вопросов при выяснении свойств кода был вопрос о числе нуклеотидов, которое должно определять включение в белок одной аминокислоты. Сразу было понятно, что это число не может быть равным 1 иди 2, так как в этом случае количество кодирующих элементов будет недостаточным для шифрования 20 аминокислот в белках. Число кодирующих последовательностей из четырёх нуклеотидов по три равно 4^3=64, что более чем в 3 раза превышает минимальное количество, которое необходимо для кодирования 20 аминокислот. В дальнейшем было установлено, что кодирующими элементами в шифровании аминокислотной последовательности действительно являются тройки нуклеотидов, или триплеты, которые получили название «кодоны».

Смысл кодонов. Из 64 кодонов, включение аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь шифрует 61 триплет, а 3 остальных — UAA, UAG, UGA не кодируют включение в белок аминокислот и первоначально были названы бессмысленными, или нонсенс-кодонами. Однако в дальнейшем было показано, что эти триплеты сигнализируют о завершении трансляции, и поэтому их стали называть терминирующими, или стоп-кодонами.

Кодоны мРНК и триплеты нуклеотидов в кодирующей нити ДНК с направлением от 5' к 3'-концу имеют одинаковую последовательность азотистых оснований, за исключением того, что в ДНК вместо урацила (U), характерного для мРНК. стоит тимин (Т).

Специфичность. Каждому кодону соответствует только одна определённая аминокислота. В этом смысле генетический код строго однозначен.

Вырожденность. В мРНК и ДНК имеет смысл 61 триплет, каждый из которых кодирует включение в белок одной из 20 аминокислот. Из этого следует, что в информационных молекулах включение в белок одной и той же аминокислоты определяют несколько кодонов. Это свойство биологического кода получило название вырожденности.

У человека одним кодоном зашифрованы только 2 аминокислоты — Мет и Три, тогда как Лей, Сер и Арг — шестью кодонами, а Ала, Вал, Гли, Про, Тре — четырьмя кодонами (табл. 4-4).

Избыточность кодирующих последовательностей — ценнейшее свойство кода, так как она повышает устойчивость информационного потока к неблагоприятным

воздействиям внешней и внутренней среды. При определении природы аминокислоты, которая должна быть включена в белок, третий нуклеотид в кодоне не имеет столь важного значения, как первые два. Как видно из табл. 4-4, для многих аминокислот замена нуклеотида в третьей позиции ко-дона не сказывается на его смысле.

Линейность записи информации. В ходе трансляции кодоны мРНК «читаются» с фиксированной стартовой точки последовательно и не перекрываются. В записи информации отсутствуют сигналы, указывающие на конец одного кодона и начало следующего.

Универсальность. До недавнего времени считалось, что код абсолютно универсален, т.е. смысл кодовых слов одинаков для всех изученных организмов: вирусов, бактерий, растений, земноводных, млекопитающих, включая человека. Однако позднее стало известно одно исключение, оказалось, что митохондриальная мРНК содержит 4 триплета, имеющих другое значение, чем в мРНК ядерного происхождения. Так, в мРНК митохондрий триплет UGA кодирует Три, AUA — Мет. а AGA и AGG прочитываются как дополнительные стоп-кодоны.

Колинеарность гена и продукта. У прокариотов обнаружено линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте, или, как говорят, существует колинеарность гена и продукта. У эукариотов последовательности оснований в гене, колинеарные аминокислотной последовательности в белке, прерываются интронами. Поэтому в эукариотических клетках аминокислотная последовательность белка колинеарна последовательности экзонов в гене или зрелой мРНК после посттранскрипционного удаления интронов.

Пер	Второе основание			
	U	**C**	**A**	**G**
U	UUU Фен UUC Фен UUA Лей UUGЛей	UCU Сер UCC Сер UCA Сер UCG Сер	UAU Тир UAC Тир UAA* UAG*	UGU Цис UGC Цис UGA* UGG Три
C	CUU Лей CUC Лей CUA Лей CUG Лей	CCU Про CCC Про CCA Про CCG Про	CAU Гис CAC Гис CAA Гли CAG Гли	CGU Арг CGC Арг CGA Арг CGG Арг
A	AUU Иле AUC Иле AUA Мет AUG Мет	ACU Тре ACC Тре ACA Тре ACG Тре	AAU Асн AAC Асн AAA Лиз AAG Лиз	AGU Сер AGC Сер AGA Арг AGG Арг
G	GUU Вал GUC Вал GUA Вал GUG Вал	GCU Ала GCC Ала GCA Ала GCG Ала	GAU Асп GAC Асп GAA Глу GAG Глу	GGU Гли GGC Гли GGA Гли GGG Гли

2. Стадии биосинтеза белка

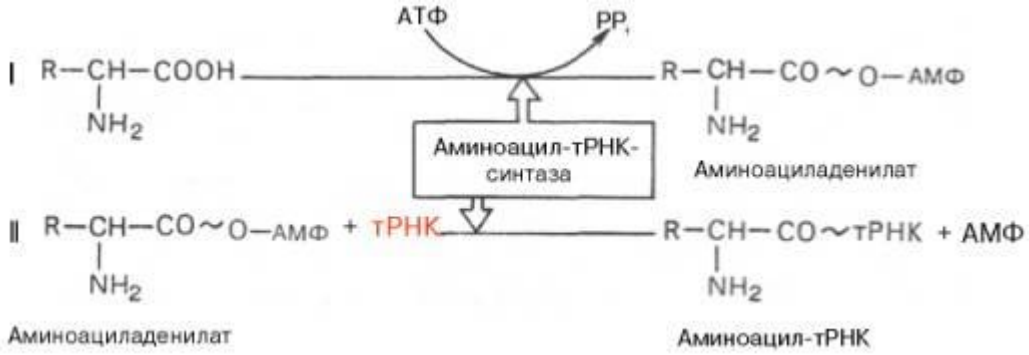
Синтез белка представляет собой циклический многоступенчатый энергозависимый процесс, в котором свободные аминокислоты полимеризуется в генетически детерминированную последовательность с образованием полипептидов. Система белкового синтеза, точнее система трансляции, которая использует генетическую информацию, транскрибированную в мРНК, для синтеза полипептидной цепи с определенной первичной структурой, включает около 200 типов макромолекул – белков и нуклеиновых кислот. Среди них около 100 макромолекул, участвующих в активировании аминокислот и их переносе на рибосомы, более 60 макромолекул, входящих в состав 70S или 80S рибосом, и около 10S

макромолекул, принимающих непосредственное участие в системе трансляции. Не разбирая природу других важных для синтеза факторов, рассмотрим подробно механизм индивидуальных путей синтеза белковой молекулы в искусственной синтезирующей системе. Прежде всего при помощи изотопного метода было выяснено, что синтез белка начинается с N-конца и завершается С-концом.

Белковый синтез, или процесс трансляции, может быть условно разделен на 2 стадии: активирование аминокислот и собственно процесс трансляции.

Второй этап матричного синтеза белка, собственно трансляцию, протекающей в рибосоме, условно делят на три этапа: инициации, элонгации и терминации.

Необходимым условием синтеза белка, который в конечном счете сводится к полимеризации аминокислот, является наличием в системе не свободных, а так называемых активированных аминокислот, располагающих своим внутренним запасом энергии. Активация свободных аминоксилот осуществляется при помощи специфических ферментов аминоацил - тРНК-синтетаз в присутствии АТФ. Этот процесс протекает в 2 стадии:



Обе стадии катализируются одним и тем же ферментом. На I стадии аминокислота вступает в реакцию с АТФ, при этом освобождается пиро-фосфат и образуется промежуточный продукт, который на II стадии реагирует с соответствующей 3'-ОН-тРНК, в результате чего образуется аминоацил-тРНК (аа-тРНК) и освобождается АМФ.

3. Адапторная функция т-РНК

Тщательный анализ нуклеотидной последовательности разных тРНК показал, что все они содержат одинаковый 5'-концевой нуклеотид – ГМФ – со свободной 5'-фосфатной группой. Адапторная функция молекул тРНК заключается в связывании каждой молекулы тРНК со своей специфической аминокислотой. Однако, поскольку между нуклеиновой кислотой и специфической функциональной группой аминокислот нет соответствия и сродства, эту функцию узнавания, точнее, посредника между тРНК и аминокислотой, должна выполнять белковая молекула фермента. Взаимодействие между аминоацил-тРНК-синтетазой и тРНК принято обозначать как «вторичный генетический код», подчеркивая тем самым его ключевую роль в обеспечении точности синтеза белка, причем правила кодирования являются, вероятнее всего, более сложными, чем правила «первичного» генетического кода.

4. Функция р-РНК

Несколько молекул РНК, составляющих основу рибосомы. Основной функцией рРНК является осуществление процесса трансляции - считывания информации с мРНК при помощи адапторных молекул тРНК и катализ образования пептидных связей между присоединёнными к тРНК аминокислотами.

Рибосомная РНК составляет большую долю (до 80%) всей клеточной РНК, такое количество рРНК требует интенсивной транскрипции кодирующих её генов. Такая интенсивность обеспечивается большим количеством копий кодирующих рРНК генов: у эукариот насчитывается от нескольких сотен (~200 у дрожжей) до десятков тысяч (для

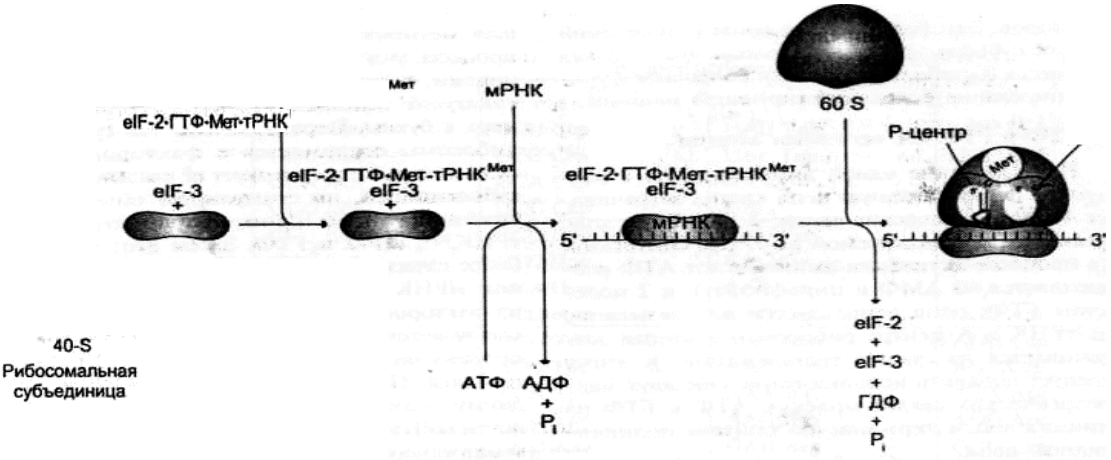
различных линий хлопка сообщалось о 50 - 120 тыс. копий) генов, организованных в массивы тандемных повторов.

5. Этапы биосинтеза белка (инициация, элонгация, терминация)

1. Инициация трансляции представляет собой событие, в ходе которого происходит образование комплекса, включающего Мет-тРНК$_i^{Мет}$, мРНК и рибосому, где тРНК$_i^{Мет}$ - инициирующая метиониновая тРНК. В этом процессе участвуют не менее 10 факторов инициации, которые обозначают как elF (от англ. eukaryotic initiation factors) с указанием номера и буквы. Первоначально 40S субъединица рибосомы соединяется с фактором инициации, который препятствует её связыванию с 60S субъединицей, но стимулирует объединение с тройным комплексом, включающим тРНК$_i^{Мет}$, eIF-2 и ГТФ. Затем этот теперь уже более сложный комплекс связывается с 5'-кон-цом мРНК при участии нескольких elF. Один из факторов инициации (eIF-4F) узнаёт и присоединяется к участку «кэп» на молекуле мРНК, поэтому он получил название кэпсвязывающего белка. Прикрепившись к мРНК, 40S субъединица начинает скользить по некодирующей части мРНК до тех пор, пока не достигнет инициирующего кодона AUG кодирующей нуклеотидной последовательности. Скольжение 40S субъединицы по мРНК сопровождается гидролизом АТФ, энергия которого затрачивается на преодоление участков спирализации в нетранслируемой части мРНК. В эукариотических клетках некодирующие участки мРНК имеют разную длину, но обычно от 40 до 80 нуклеотидов, хотя встречаются области с протяжённостью более 700 нуклеотидов.

Достигнув начала кодирующей последовательности мРНК, 40S субъединица останавливается и связывается с другими факторами инициации, ускоряющими присоединение 60S субъединицы и образование 80S рибосомы за счёт гидролиза ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата. При этом формируются А- и Р-центры рибосомы, причём в Р-центре оказывается AUG-кодон мРНК с присоединённой к нему тРНК$_i^{Мет}$.

В клетках есть 2 различающиеся по структуре тРНК, узнающие кодон AUG. Инициирующий кодон узнаёт тРНК$_i^{Мет}$, а триплеты мРНК, кодирующие включение метионина во внутренние участки белка, прочитываются другой тРНК$_i^{Мет}$.



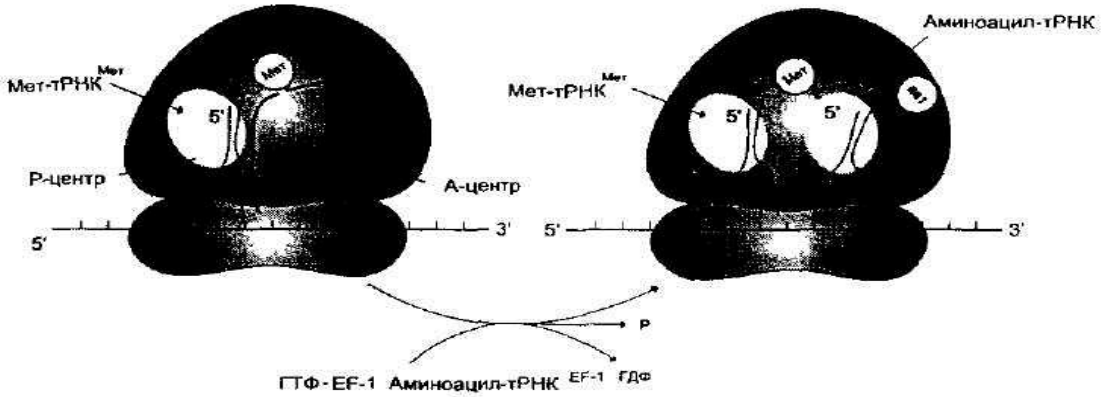
Образование инициирующего комплекса в ходе синтеза белка у эукариотов. Мет-тРНК$_i^{Мет}$ обьединяется с малой субъединицей рибосомы в форме тройного комплекса: Мет-тРНК$_i^{Мет}$, elF-2 и ГТФ. Образовавшийся более сложный четырехкомпонентный комплекс присоединяется к 5'-кокцу мРНК с помощыо нескольких дололннтепьных факторов, и малая субъединица начинает скользить по мРНК до тех пор, пока антикодон Мет-тРНК$_i^{Мет}$ не свяжется с инициирующим кодоном AUG. При этом в комплексе происходит изменение состава инициирующих факторов, и ускоряется присоединение 60S субъединицы рибосомы, сопровождающееся гидролизом ГТФ. Мет- тРНК$_i^{Мет}$ занимает на рибосоме Р-центр.

Элонгация. По завершении инициации рибосома располагается на мРНК таким образом, что в Р-центре находится инициирующий кодон AUG с присоединенной к нему Мет- $тРНК_i^{Мет}$, а в А-центре – триплет, кодирующий включение первой аминокислоты синтезируемого белка. Далее начинается самый продолжительный этап белкового синтеза — элонгация, в ходе которого рибосома с помощью аа-тРНК последовательно «читает» мРНК в виде триплетов нуклеотидов, следующих за инициирующим кодоном в направлении от 5' к 3'-концу, наращивая полипептидную цепочку за счет последовательного присоединения аминокислот.

Включение каждой аминокислоты в белок происходит в 3 стадии, в ходе которых:

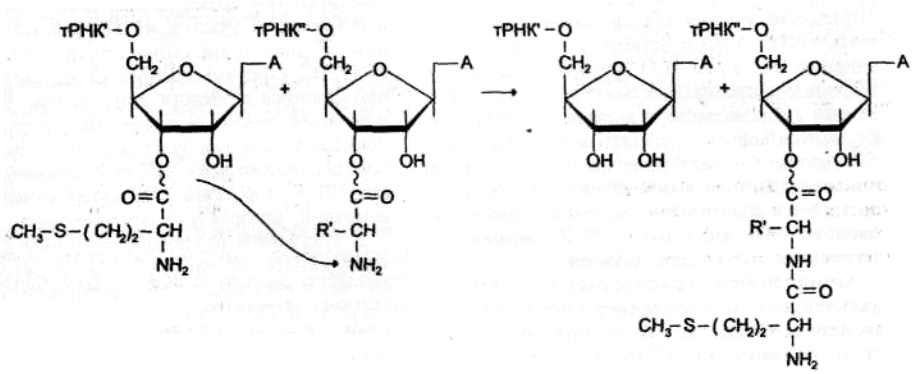
- аа-тРНК каждой входящей в белок аминокислоты связывается с А-центром рибосомы;
- пептид от пептидил-тРНК, находящейся в Р-центре, присоединяется к α-NH_2-группе аминоацильного остатка аа-тРНК А-центра с образованием новой пептидной связи;
- удлинённая на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК перемещается из А-центра в Р-центр в результате транслокации рибосомы.

Первая стадия элонгации:



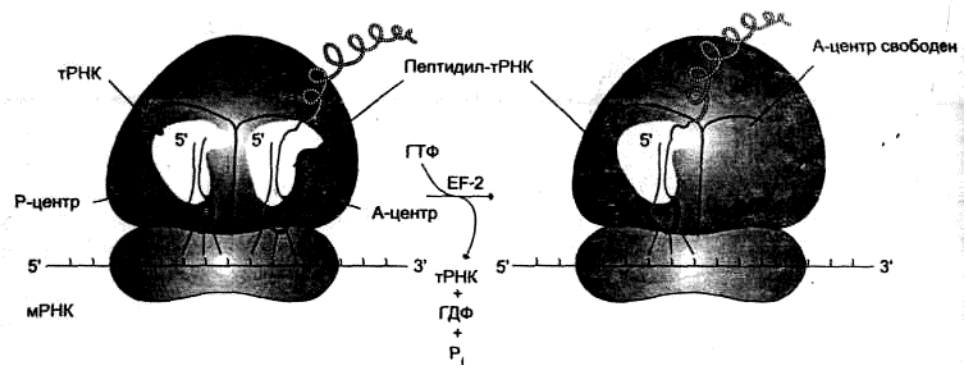
Включение $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ в рибосому. $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ - взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из фактора элонгации EF-1, $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ и ГТФ. Антикодон $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ комплементарен и антипараллелен кодону мРНК в А-центре. Связывание $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ происходит за счёт энергии гидролиза ГТФ до ГДФ и Р.

Образование пептидной связи происходит сразу же после отщепления комплекса EF-1 и ГДФ от рибосомы. Эта стадия процесса получила название реакции транспептидации.



Реакция транспептидации. Метионин от $Мет\text{-}тРНК_1^{Мет}$, находящегося в Р-центре, присоединяется к α-NH_2-группе аминоацильного остатка $аа_1$-$тРНК^{аа1}$ А-центра с образованием новой пептидной связи.

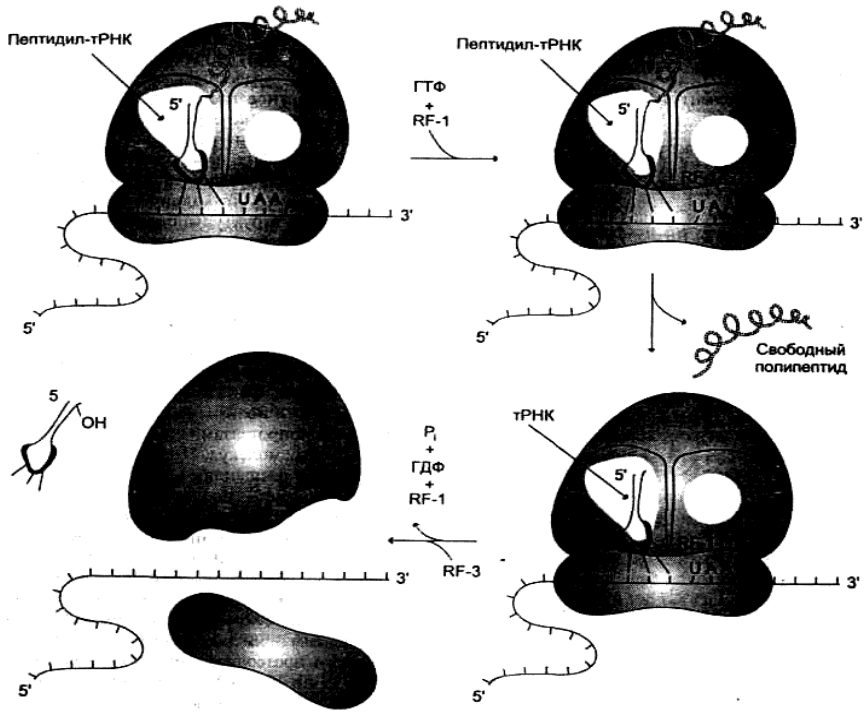
Транслокация – третья стадия элонгации.



Стадия транслокации. К рибосоме присоединяется фактор элонгации EF-2, и за счёт энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к 3'-концу. Пептидип-тРНК. не меняя своего положения относительно мРНК из А-центра перемещается в Р-центр. Свободная от метионина $тРНК_1^{Мет}$ покидает рибосому, а в область А-центра попадает следующий кодон.

По завершении третьей стадии элонгации рибосома в Р-центре имеет дипептидил-тРНК, а в А-центр попадает триплет, кодирующий включение в полипептидную цепь второй аминокислоты. Начинается следующий цикл стадии элонгации, в ходе которого на рибосоме снова проходят вышеописанные события. Повторение таких циклов по числу смысловых кодонов мРНК завершает весь этап элонгации.

Терминация. Терминация трансляции наступает в том случае, когда в А-центр рибосомы попадает один из стоп-кодонов: UAG, UAA или UGA. Для стоп-кодонов нет соответствующих тРНК. Вместо этого к рибосоме присоединяются 2 белковых высвобождающих фактора RF (от англ. Releasing factor) или фактора терминации. Один из них с помощью пептидилтрансферазного центра катализирует гидролитическое отщепление синтезированного пептида от тРНК. Другой за счёт энергии гидролиза ГТФ вызывает диссоциацию рибосомы на субъединицы.



6. Посттрансляционные изменения белков

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи ещё связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные и структурные изменения полипептидных цепей получили название посттрансляционных изменений. Они включают удаление части полипептидной цепи, ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов, приобретение белком нативной конформации.

Многие модификации осуществляются в ЭР. Здесь происходят фолдинг полипептидных цепей и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков. Причём для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное формирование дисульфидных связей.

Частичный протеолиз. Многие белки, секретируемые из клеток, первоначально синтезируются в виде молекул-предшественников, функционально неактивных. Удаление части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами приводит к образованию активных молекул. Некоторые белки предшественники расщепляются в ЭР или аппарате Гольджи, другие - после секреции. Так, неактивные предшественники секретируемых ферментов - зимогены - образуют активный фермент после расщепления по определённым участкам молекулы: зимоген панкреатической железы трипсиноген превращается в активный трипсин после секреции в тонкий кишечник Наглядным примером последовательного двухстадийного протеолиза служит образование активных форм пептидных гормонов (например, инсулина или глюкагона) из препрогормонов. Первоначально N-концевой сигнальный пептид молекулы-предшественника удаляется в ЭР в процессе синтеза белка и образуется неактивный прогормон. Затем прогормон в секреторных гранулах, формирующихся в аппарате Гольджи, подвергается действию эндо- и/или экзопротеаз и превращается в активный гормон.

Ковалентные модификации. Структурные белки и ферменты могут активироваться или инактивироваться в результате присоединения различных химических групп: фосфатных, ацильных, метальных, олигосахаридных и некоторых других.

Фосфорилирование белков осуществляется по гидроксильным группам серина, треонина и, реже, тирозина ферментами из группы протеинкиназ, тогда как дефосфорилирование катализируют гидролитические ферменты фосфопротеинфосфотазы.

Гликознлирование. Белки, входящие в состав плазматических мембран или секретирующиеся из клеток, подвергаются гликозилированию. Углеводные цепи присоединяются по гидроксильным группам серина или треонина (О-гликозилирование) либо аспарагина (N-гликозилирование). Последовательное наращивание углеводного фрагмента происходит в ЭР и аппарате Гольджи. Многочисленным модификациям подвергаются боковые радикалы некоторых аминокислот: в тиреоглобулине йодируются остатки тирозина; в факторах свёртывания крови карбоксилируются остатки глутамата; в ЭР фибробластов гидроксилируются остатки пролина и лизина в цепях тропоколлагена.

7. Регуляция биосинтеза белков, ингибиторы синтеза белков

Сущность общей теории регуляции синтеза белка сводится к «выключению» или «включению» генов как функционирующих единиц в процесс передачи закодированной в структурных генах ДНК генетической информации для синтеза специфических белков.

Согласно этой теории в биосинтезе белка у бактерий участвуют по крайней мере три типа генов: структурные гены, ген-регулятор и ген-оператор. Структурные гены определяют первичную структуру синтезируемого белка. Именно эти гены в цепи ДНК являются основой для биосинтеза мРНК, которая затем поступает в рибосому и, как было указано выше, служит матрицей для биосинтеза белка.

Синтез мРНК на структурных генах молекулы ДНК непосредственно контролируется определенным участком, называемым геном-оператором. Он служит как бы пусковым механизмом для функционирования структурных генов. Ген-оператор локализован на

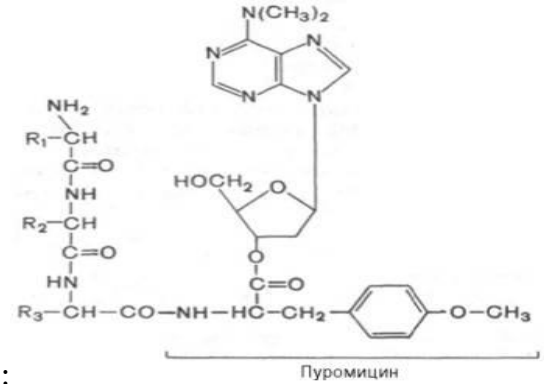
крайнем отрезке структурного гена или структурных генов, регулируемых им. «Считывание» генетического кода, т. е. формирование мРНК, начинается с промотора— участка ДНК, являющегося точкой инициации для синтеза мРНК, и далее распространяется последовательно вдоль оператора и структурных генов. Координированный одним оператором одиночный ген или группа структурных генов образует оперон.

В свою очередь деятельность оперона находится под контролирующим влиянием другого участка цепи ДНК, получившего название гена-регулятора. Поскольку структурные гены и ген-регулятор находятся в разных участках цепи ДНК, связь между ними, осуществляется при помощи вещества-посредника, оказавшегося белком и названного репрессором. Образование репрессора происходит в рибосомах ядра на матрице специфической мРНК, синтезированной на гене-регуляторе. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо соединяется с ним в комплекс. Образование такого комплекса приводит к блокированию синтеза мРНК и, следовательно, синтеза белка, т.е. функция гена-регулятора состоит, в том, чтобы через белок-репрессор прекращать деятельность структурных генов, синтезирующих мРНК. Репрессор, кроме того, обладает способностью строго специфически связываться с определенными низкомолекулярными веществами, называемыми индукторами, или эффекторами. Когда такой индуктор соединяется с репрессором, последний теряет способность связываться с геном-оператором, который таким образом выходит из-под контроля гена-регулятора, и начинается синтез мРНК.

Это типичный пример отрицательной формы контроля, когда индуктор, соединяясь с белком-репрессором, вызывает изменения его третичной структуры настолько, что репрессор теряет способность связываться с геном-оператором. Этот процесс аналогичен взаимоотношениям аллостерического центра фермента с эффектором, под влиянием которого изменяется третичная структура фермента и он теряет способность связываться со своим субстратом.

В регуляции экспрессии структурных генов специфическое участие принимает особый белок, получивший название катаболитный ген-активирующий белок (CAP); этот белок взаимодействует с цАМФ, образуя комплекс, способствующий прикреплению РНК-полимеразы к промоторному участку генома. В присутствии комплекса CAP-цАМФ фермент может начать транскрипцию оперона, включая структурные гены, т. е. в клетках имеется еще один, дополнительный CAP-цАМФ регулятор, действующий скорее всего в качестве положительного регулятора, поскольку его присутствие необходимо для начала экспрессии гена.

Один из мощных ингибиторов белкового синтеза – пуромицин. Он представляет собой аналог концевого участка аминоацил-тРНК адениловой кислоты и поэтому легко взаимодействует с А-центром пептидил-тРНК с образованием пептидил-пуромицина



:

Пептидил-пуромицин не несет на себе триплета антикодона и поэтому тормозит элонгацию пептидной цепи, вызывая обрыв реакции, т.е. преждевременную терминацию синтеза белка.

Белковый синтез тормозится актиномицином D, обладающим противоопухолевым эффектом, однако вследствие высокой токсичности препарат применяется редко. Он тормозит синтез всех типов клеточной РНК, особенно мРНК. Данное свойство объясняется тормозящим влиянием актиномицина D на ДНК-зависимую РНК-полимеразу, поскольку он связывается с остатками дезоксигуанозина цепи ДНК, выключая матричную функцию последней; это дает основание считать, что актиномицин D ин-гибирует транскрипцию ДНК.

Другим антибиотиком, также тормозящим синтез клеточной РНК, является используемый при лечении туберкулеза рифамицин. Этот препарат тормозит ДНК-зависимую РНК-полимеразу, связываясь с ферментом.

Выяснены некоторые детали механизма действия ряда других антибиотиков, используемых при лечении тифозных инфекций. Так, хлорам-феникол оказывает ингибирующее влияние на пептидилтрансферазную реакцию (на стадии элонгации) синтеза белка в 70S рибосоме бактерий; на этот процесс в 80S рибосоме он не действует. Тормозит синтез белка в 80S рибосоме (без поражения процесса в 70S рибосоме) циклогексимид – специфический ингибитор транслоказы.

Весьма интересен молекулярный механизм действия дифтерийного токсина. Он оказался наделенным способностью катализировать реакцию АДФ-рибозилирования фактора элонгации эукариот (eEF-2), выключая тем самым его из участия в синтезе белка. Резистентность многих животных к дифтерийному токсину, вероятнее всего, обусловлена трудностью или полным отсутствием проникновения (транспорта) токсина через мембрану клеток.

Следует отметить, однако, что организм располагает мощными механизмами защиты. Подобные изменения генетического аппарата быстро распознаются специфическими ферментами – рестриктазами, измененные последовательности вырезаются и вновь замещаются соответствующими нуклеотидами при участии полимераз и лигаз.

ТЕМА: ФЕРМЕНТЫ, ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ

Механизм действия ферментов

Механизм действия ферментов может быть рассмотрен с двух позиций: с точки зрения изменения энергетики химических реакций и с точки зрения событий в активном центре

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Любые химические реакции протекают, подчиняясь двум основным законам термодинамики: закону сохранения энергии и закону энтропии. Согласно этим законам, общая энергия химической системы и её окружения остаётся постоянной, при этом химическая система стремится к снижению упорядоченности (увеличению энтропии). Для понимания энергетики химической реакции недостаточно знать энергетический баланс входящих и выходящих из реакции реагентов, необходимо учитывать изменения энергии в процессе данной химической реакции и роль ферментов в динамике этого процесса. Рассмотрим реакцию разложение угольной кислоты:

H2CO3 →H20 + C02.

Угольная кислота слабая; реакция её разложения пойдёт при обычных условиях, если молекулы угольной кислоты имеют энергию, превышающую определённый уровень, называемый энергией активации Еа.

Энергией активации называют дополнительное количество кинетической энергии, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.

При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей образование новых соединений. Говорят, что молекулы, обладающие Еа, находятся в переходном состоянии. Разницу энергий'между исходным реагентом H2CO3 и конечными соединениями H20 и C02 называют изменением свободной энергии реакции **DG. Молекулы H20 и C02 - более** стабильные вещества, чем **H2CO3,** т.е. обладают меньшей энергией и при обычных условиях практически не реагируют. Выделившаяся энергия в результате этой реакции рассеивается в виде тепла в окружающую среду.

Чем больше молекул обладает энергией, превышающей уровень Еа, тем выше скорость химической реакции. Повысить скорость химической реакции можно нагреванием. При этом увеличивается энергия реагирующих молекул. Однако для живых организмов высокие температуры губительны, поэтому в клетке для ускорения химических реакций используются ферменты. Ферменты обеспечивают высокую скорость реакций при оптимальных условиях.

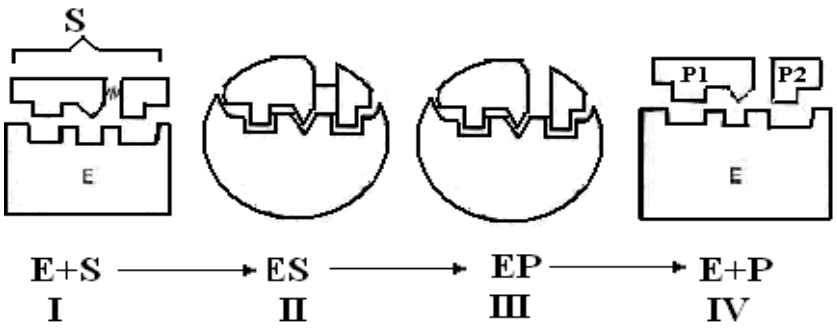
Этапы ферментативного катализа.

В 1959г. был предложен другой вариант гипотезы «ключ-замок», объясняющий события в активном центре фермента. По этой гипотезе активный центр является гибкой структурой по отношению к субстрату. Субстрат, взаимодействуя с активным центром фермента, вызывает изменение его конформации, приводя к формированию

фермент - субстратного комплекса, благоприятного для химических модификаций субстрата. При этом молекула субстрата также изменяет свою конформацию, что *IJ* обеспечивает более высокую эффективность ферментативной реакции.

Процесс ферментативного катализа условно можно разделить на следующие этапы. Первый, второй и четвертый этапы катализа непродолжительны и зависят от концентрации субстрата (для первого этапа) и констант связывания лигандов в активном центре фермента (для первого и третьего этапов). Изменения энергетики химической реакции на этих стадиях незначительны.

Третий этап наиболее медленный; длительность его зависит от энергии активации химической реакции. На этой стадии происходят разрыв связей в молекуле субстрата, образование новых связей и формирование молекулы продукта.



Этапы ферментативного катализа. I - этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента; II - образование фермент-субстратного комплекса (ES) в результате индуцированного соответствия - деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP); IV - распад комплекса (EP)с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента.

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Под термином «ингибирование ферментативной активности» понимают снижение каталитической активности в присутствии определённых веществ — ингибиторов. К ингибиторам следует относить вещества, вызывающие снижение активности фермента. Следует отметить, что все денатурирующие агенты также вызывают уменьшение скорости любой ферментативной реакции, вследствие неспецифической денатурации белковой молекулы, поэтому денатурирующие агенты к ингибиторам не относят.

Ингибиторы вызывают большой интерес для выяснения механизмов ферментативного катализа, помогают установить роль отдельных ферментов в метаболических путях организма. В основе действия многих лекарственных препаратов и ядов лежит ингибирование активности ферментов, поэтому знание механизмов этого процесса крайне важно для молекулярной фармакологии и токсикологии.

Ингибиторы способны взаимодействовать с ферментами с разной степенью прочности. На основании этого различают обратимое и необратимое ингибирование. По механизму действия ингибиторы подразделяют на конкурентные и неконкурентные.

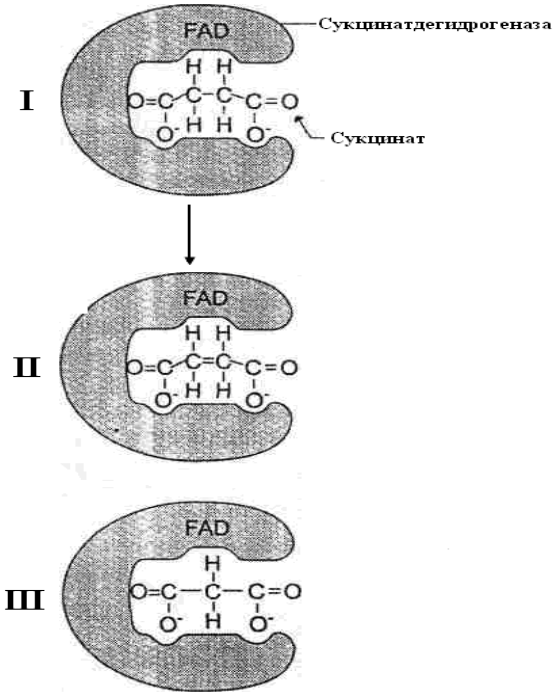
ОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Обратимые ингибиторы связываются с ферментом слабыми нековалентными связями и при определённых условиях легко отделяются от фермента. Обратимые ингибиторы бывают конкурентными и неконкурентными.

1. *Конкурентное ингибирование* К конкурентному ингибированию относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса. Такой тип ингибирования наблюдают, когда ингибитор — структурный аналог субстрата, в результате возникает конкуренция молекул субстрата и ингибитора за место в активном центре фермента. В этом случае с ферментом взаимодействует либо субстрат, либо ингибитор, образуя комплексы фермент-субстрат (ES) или фермент-ингибитор (EI). При формировании комплекса фермента и ингибитора (EI) продукт реакции не образуется.

Для конкурентного типа ингибирования справедливы следующие уравнения:
E + S ↔ ES → E + P, E +I → EI.

Кассический пример конкурентного ингибирования — ингибирование сукцинатдегидрогеназной реакции малоновой кислотой. Малоновая кислота — структурный аналог сукцината (наличие двух карбоксильных групп) и может также взаимодействовать с



активным центром сукцинат дегидрогеназы. Однако отщепление двух атомов водорода от малоновой кислоты невозможно; следовательно, скорость реакции снижается.**Кинетические зависимости**Конкурентные ингибиторы уменьшают скорость химической реакции. Конкурентный ингибитор повышает Km для данного субстрата (уменьшает сродство субстрата к ферменту). Это означает, что в присутствии конкурентного ингибитора необходима большая концентрация субстрата для достижения 1/2 Vmax .Увеличение соотношения концентрации субстрата и ингибитора снижает степень ингибирования. При значительно более высоких концентрациях субстрата ингибирование полностью исчезает, потому что активные центры всех молекул фермента будут находиться преимущественно в комплексе с субстратом.

Пример конкурентного ингибирования сукцинатдегидрогиназы малоновой кислотой. I - сукцинат связывается с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы; II - в ходе ферментативной реакции происходит отщепление двух атомов водорода от сукцината присоединение их к коферменту FAD. В результате образуется фумарат, который высвобождается из активного центра сукцинатдегидрогеназы; III - малоновая кислота - структурный аналог сукцината, она также связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы. При этом химическая реакция не идет.

Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы

Многие лекарственные препараты оказывают своё терапевтическое действие по механизму конкурентного ингибирования. Например, четвертичные аммониевые основания ингибируют ацетилхолинэстеразу, катализирующую реакцию гидролиза ацетилхолина на холин и уксусную кислоту .

При добавлении ингибиторов активность ацетилхолинэстеразы уменьшается, концентрация ацетилхолина (субстрата) увеличивается, что сопровождается усилением проведения нервного импульса. Ингибиторы холинэстеразы используют при лечении мышечных дистрофий. Эффективные антихолинэстеразные препараты — прозерин, эндрофоний и др.

Антиметаболиты как лекарственные препараты

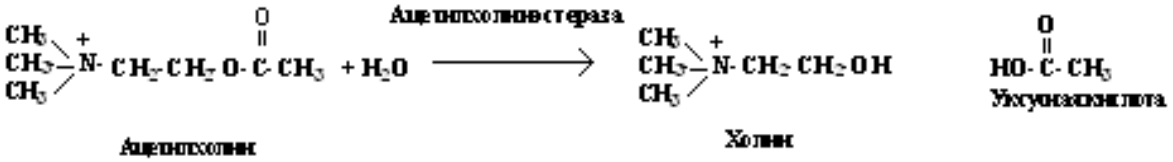
В качестве ингибиторов ферментов по конкурентному механизму в медицинской

практике;

используют вещества, называемые антиметаболитами. Эти соединения, будучи

структурными аналогами природных субстратов, вызывают конкурентное ингибирование ферментов, с одной, стороны, и, с другой — могут использоваться этими же ферментами в качестве псевдосубстратов, что приводит к синтезу аномальных продуктов. Аномальные продукты не обладают функциональной активностью; в результате наблюдают снижение скорости определённых метаболических путей.

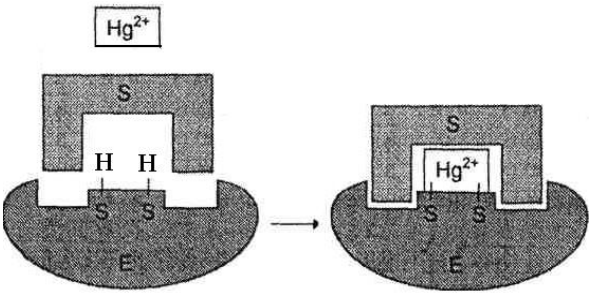
В качестве лекарственных препаратов используют следующие антиметаболиты: сульфаниламидные препараты (аналоги пара-аминобензойной кислоты), применяемые для лечения инфекционных заболеваний, аналоги нуклеотидов для лечения онкологических заболеваний.



Неконкурентное ингибирование

Неконкурентным называют такое ингибирование ферментативной реакции, при котором ингибитор взаимодействует с ферментом в участке, отличном от активного центра. Неконкурентные ингибиторы не являются структурными аналогами субстрата. Неконкурентный ингибитор может связываться либо с ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом, образуя неактивный комплекс. Присоединение неконкурентного ингибитора вызывает изменение конформации молекулы фермента таким образом, что нарушается взаимодействие субстрата с активным центром фермента, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

Необратимое ингибирование



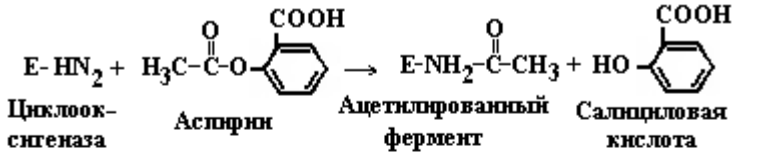
Необратимое ингибирование наблюдают в случае образования ковалентных стабильных связей между молекулой ингибитора и фермента. Чаще всего модификации подвергается активный центр фермента. В результате фермент не может выполнять каталитическую функцию.

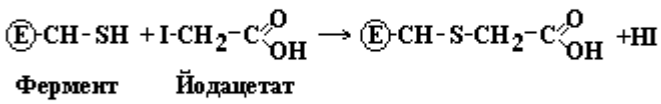
К необратимым ингибиторам относят ионы тяжёлых металлов, например ртути (Hg^{2+}), серебра (Ag^{+}) и мышьяка (As^{+}), которые в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра. Субстрат при этом не может подвергаться химическому превращению, . При наличии реактиваторов ферментативная функция восстанавливается. В больших концентрациях ионы тяжёлых металлов вызывают денатурацию белковой молекулы фермента, т.е. приводят к полной инактивации фермента.

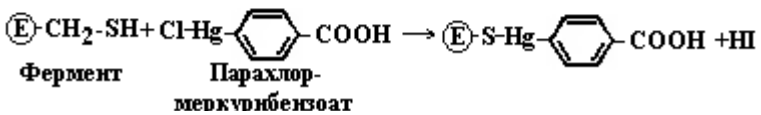
Механизм действия ионов ртути как необратимого ингибитора. Ионы ртути в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты

Пример лекарственного препарата, действие которого основано на необратимом ингибировании ферментов, — широко используемый препарат аспирин. Противовоспалительный нестероидный препарат аспирин обеспечивает фармакологическое действие за счёт ингибирования фермента циклооксигеназы, катализирующего реакцию образования простагландинов из арахидоновой кислоты. В результате химической реакции ацетильный остаток аспирина присоединяется к свободной концевой NH2,-rpynne одной из субъединиц циклооксигеназы. Это вызывает снижение образования продуктов реакции простагландинов, которые обладают широким спектром биологических функций, **в** том числе являются медиаторами воспаления.







Ингибирование активности ферментов вследствие ковалентной модификации остатков цистеина.

Принципы регуляции ферментативных процессов. Компартментализация

Клетка — сложнофункциональная система, регулирующая своё жизнеобеспечение. Многообразие функций клетки обеспечивается пространственной и временной (в первую очередь, в зависимости от ритма питания) регуляцией определённых метаболических путей.

Пространственная регуляция связана со строгой локализацией определённых ферментов в различных органеллах. Так, в ядре находятся ферменты, связанные с синтезом молекул ДНК и РНК, в цитоплазме — ферменты гликолиза, в лизосомах — гидролитические ферменты, в матриксе митохондрий — ферменты ЦТК, во внутренней мембране митохондрий — ферменты цепи переноса электронов и т.д. Такая субклеточная локализация ферментов способствует упорядоченности биохимических процессов и увеличивает скорость обмена веществ. Все химические реакции в клетке протекают при участии ферментов. Поэтому, чтобы воздействовать на скорость протекания метаболического пути, достаточно регулировать количество или активность ферментов. Обычно в метаболических путях есть ключевые ферменты, благодаря которым происходит регуляция скорости всего пути. Эти ферменты (один или несколько в метаболическом пути) называются регуляторными ферментами; они катализируют, как правило, начальные реакции метаболического пути, необратимые реакции, скорость лимитирующие реакции (самые медленные) или реакции в месте переключения метаболического пути (точки ветвления). Регуляция скорости ферментативных реакций осуществляется на 3 независимых уровнях:

— изменением количества молекул фермента;
— доступностью молекул субстрата и кофермента;
— изменением каталитической активности молекулы фермента.

Регуляция каталитической активности ферментов

Важнейшее значение в изменении скорости метаболических путей играет регуляция каталитической **активности** одного или **нескольких** ключевых ферментов **данного метаболического** пути. Это высокоэффективный **и быстрый способ** регуляции **метаболизма.**

Основные способы регуляции активности ферментов:

• аллостерическая **регуляция;**
• регуляция **с помощью белок-белковых** взаимодействий;
• регуляция путём фосфорилирования/дефосфорилирования молекулы фермента;
• регуляция **частичным (ограниченным)** протеолизом. **Аллостерическая регуляция**

Аллостерическими ферментами называют ферменты, активность которых регулируется не только количеством молекул субстрата, но и другими веществами, называемыми эффекторами. Участвующие в аллостерической регуляции эффекторы — клеточные метаболиты часто именно того пути, регуляцию которого они осуществляют.

Роль аллостерических ферментов в метаболизме клетки. Аллостерические ферменты играют важную **роль в** метаболизме, так как они **чрезвычайно** быстро реагируют **на** малейшие **изменения** внутреннего состояния **клетки.** Аллостерическая регуляция **имеет большое значение в следующих** ситуациях:

при анаболических процессах. Ингибирование конечным продуктом метаболического пути и активация начальными метаболитами позволяют осуществлять регуляцию синтеза этих соединений;

• при катаболических процессах. В случае накопления АТФ в клетке происходит ингибирование метаболических путей, обеспечивающих синтез энергии. Субстраты при этом расходуются на реакции запасания резервных питательных веществ;

» для **координации анаболических и** катаболических **путей.** АТФ **и АДФ** — аллостерические **эффекторы, действующие как** антагонисты;

• для координации параллельно протекающих и взаимосвязанных метаболических путей (например, синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, используемых для синтеза нуклеиновых кислот). Таким образом, **конечные** продукты одного метаболического **пути** могут быть аллостерическими эффекторами другого метаболического **пути.**

Аллостерические эффекторы. Эффектор, вызывающий снижение (ингибирование) активности фермента, называют отрицательным эффектором, или ингибитором. Эффектор, вызывающий повышение (активацию) активности ферментов, называют положительным эффектором, или активатором.

Аллостерическими **эффекторами часто служат** различные метаболиты. Конечные продукты **метаболического** пути — **часто ингибиторы аллостерических** ферментов, а исходные вещества — **активаторы. Это** так называемая **гетеротропная регуляция. Такой** вид **аллостерической** регуляции **очень распространён в биологических системах.**

Более редкий **случай аллостерической** регуляции, **когда сам** субстрат может выс тупать **в качестве** положительного эффектора. **Такая регуляция** называется гомотропной (эффектор и субстрат — одно и то же **вещество). Эти** ферменты имеют несколько центров **связывания** для субстрата, **которые** могут выполнять двойную функцию: каталитическую **и регуляторную.** Аллостерические **ферменты такого** типа **используются** в ситуации, **когда субстрат** накапливается в избытке **и должен быстро преобразоваться** в продукт.

Регуляция каталитической активности ферментов путем фосфорилирования и дефосфорилирования. В биологических системах часто встречается механизм регуляции активности ферментов с помощью ковалентнои модификации аминокислотных остатков. Быстрый и широко распространенный способ химической модификации ферментов - фосфорилирование/дефосфорилирование. Модификации подвергаются ОН - группы ферментами протеинкиназами, а дефосфорилирование-фосфопротеинфосфатазами. Присоединение остатка фосфорной кислоты приводит к изменению конформации активного центра и его каталитической активности.

При этом результат может быть двояким: одни ферменты при фосфорилировании активируются, другие, напротив, становятся **менее** активными.

Изменение активности фермента, вызванное фосфорилированием, обратимо. Отщепление остатка фосфорной кислоты осуществляется ферментами фосфорилирования фосфопротеинфосфатазами.

Активность протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз регулируется гормонами, что позволяет быстро изменять активность ключевых ферментов метаболических путей в зависимости от условий внешней среды.

Антагонистичные по функции гормоны противоположным образом влияют на фосфорилирование дефосфорилирование ферментов, вызывая противоположные эффекты изменения метаболизма клетки.

Например, под действием глюкагона (в период между приёмами пищи) в клетках происходит уменьшение синтеза энергетического материала — **жира,** гликогена и усиление его распада (мобилизация), вызванного фосфорилированием ключевых ферментов этих процессов. А под действием инсулина (вовремя пищеварения), наоборот, активируется синтез гликогена и ингибируется его распад, так как взаимодействие инсулина с рецептором активирует сигнальный путь, приводящий к дефосфорилированию **тех же** ключевых ферментов.

Регуляция каталитической активности ферментов частичным (ограниченным) протеолизом

Некоторые ферменты, функционирующие вне клеток (в ЖКТ или в плазме крови), синтезируются в виде неактивных предшественников **и** активируются только в результате гидролиза одной или нескольких определённых **пептидных** связей, что приводит к отщеплению части белковой молекулы предшественника. В результате в оставшейся части белковой молекулы происходит конформационная перестройка и формируется активный центр фермента.

Рассмотрим механизм частичного протеолиза на примере активации протеолитического фермента трипсина. Трипсиноген, синтезируемый в поджелудочной железе, при пищеварении по протокам поджелудочной железы поступает в двенадцатиперстную кишку, где и активируется путём частичного протеолиза под действием фермента кишечника энтеропептидазы.

В результате отщепления гексапептида с N-конца формируется активный центр в оставшейся части молекулы. Следует напомнить, что трипсин относят к семейству «сериновых» протеаз — активный центр фермента содержит функционально важный,

остаток **Сер.** Частичный протеолиз — пример регуляции, когда активность фермента изменяется нео

братимо. Такие ферменты функционируют, как правило, в течение короткого времени, определяемого временем жизни белковой молекулы. Частичный протеолиз лежит в основе активации протеолитических ферментов, белков свёртывающей системы крови и фибринолиза, белков системы комплемента, а также пептидных гормонов.

Изоферменты

Ферменты, катализирующие одну и ту же химическую реакцию, но отличающиеся по первичной структуре белка, называют изоферментами, или изоэнзимами. Они катализируют один и тот же тип реакции с принципиально одинаковым механизмом, но отличаются друг от друга кинетическими параметрами, условиями активации, особенностями связи апофермента и кофермента.

Природа появления изоферментов разнообразна, но чаще всего обусловлена различиями в структуре генов, кодирующих эти изоферменты. Следовательно, изоферменты различаются по первичной структуре белковой молекулы и, соответственно, по физико-химическим свойствам. На различиях в физико-химических свойствах основаны методы определения изоферментов.

По всей структуре изоферменты в основном являются олигомерными белками. Причем та или иная ткань преимущество синтезирует определенные виды протомеров. В результате определенной комбинации этих протомеров формируются ферменты с различной структурой - изомерные формы. Обнаружение определенных изоферментных форм ферментов позволяет использовать их для диагностики заболеваний.

Изоформы лактатдегидрогеназы. Ферменты лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует обратимую реакцию окисления лактата (молочной кислоты) до пирувата (пировиноградной кислоты).

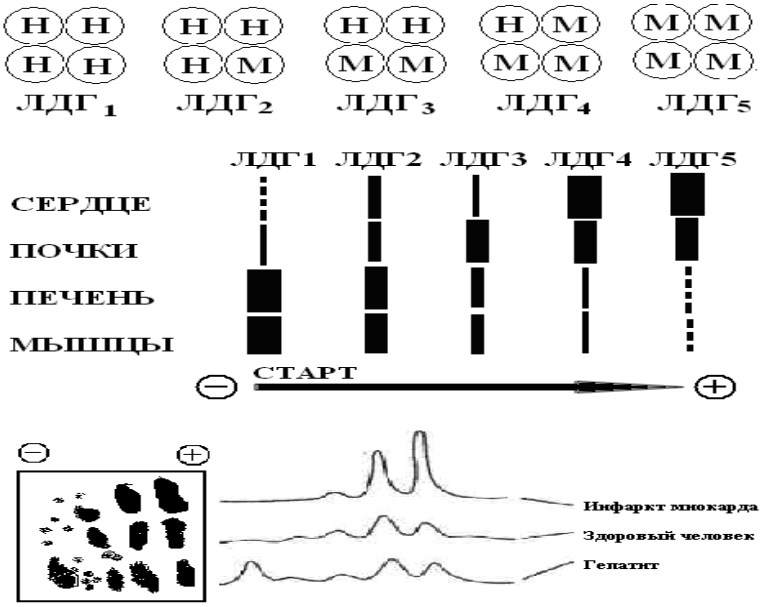
Лактатдегидрогеназа - олигомерный белок с молекулярной массой 134 000Д, состоящий из 4 субъедениц 2 типов: М (от англ. muscle - мышца) и Н (от англ. heart - сердце). Комбинация этих субъедениц лежит в основе формирования 5 изоформ лактатдегидрогеназы. ЛДГ ι и $ЛДГ_2$ наиболее активны в сердечной мышце и почках, $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ - в скелетных мышцах и печени. В остальных тканях имеются различные формы этого фермента.

- Изоформы ЛДГ отличаются электрофоретической подвижностью, что позволяет устанавливать тканевую принадлежность изоформ ЛДГ.

- Появление в эволюции различных изоформ ЛДГ обусловлено особенностями окислительного метаболизма тканей. Изоферменты $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ (М-типы ЛДГ) работают эффективно в анаэробных условиях, ЛДГ ι и $ЛДГ_2$,(Н-типы) - в аэробных, когда пируват быстро окисляется до CO_2 и H_2O, а не восстанавливается до молочной кислоты.

- При ряде заболеваний исследует активность ЛДГ в плазме крови. В норме активность ЛДГ составляет 170-520 ЕД/л. Повышение активности наблюдают при острых поражениях сердца, печени, почек, а также при мегалобластных и гемолитических анемиях. Однако это указывает на повреждение лишь одной из перечисленных тканей.

- Для постановки диагноза необходимо исследование изоформ ЛДГ в плазме крови методом электрофореза.



Изоформы лактатдегидрогеназы. А - строение различных изоформ ЛДГ; Б -распределение на электрофореграмме и относительные количества изоформ ЛДГ в различных органах; В - содержание изоформ ЛДГ в плзме крови в норме и при патологии (электрофореграммы - слева и фотометричекое сканирование - справа)

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Ферментные препараты широко используют в медицине. Ферменты в медицинской практике находят применение **в** качестве диагностических (энзимодиагностика) и терапевтических (энзимотерапия) средств.

Кроме того, ферменты используют в качестве специфических реактивов для определения ряда веществ. Так, глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови. Фермент среазу используют для определения содержания количества мочевины **в** крови и моче. С помощью различных дегидрогеназ обнаруживают соответствующие субстраты, например пируват, лактат, этиловый спирт и др.

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

Энзимодиагностика заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека. Принципы энзимодиагностики основаны на следующих позициях:

• при повреждении клеток **в крови или** других биологических жидкостях (например, в моче) увеличивается концентрация внутриклеточных ферментов повреждённых клеток;

• количество высвобождаемого фермента достаточно для его обнаружения;

• активность ферментов в биологических жидкостях, обнаруживаемых при повреждении клеток, стабильна **в** течение достаточно длительного времени и отличается от нормальных значений;

• ряд ферментов имеет преимущественную или абсолютную локализацию в определённых органах (органоспецифичность);

• существуют различия во внутриклеточной локализации ряда ферментов.

Причины, приводящие к увеличению количества ферментов в крови

Ферменты плазмы крови можно разделить на 2 группы. Первая, относительно небольшая группа ферментов активно секретируется в плазму крови определёнными органами так называемые секреторные ферменты. Например, печень синтезирует неактивные

предшественники ферментов свёртывающей системы крови. Ко второй относят большую группу ферментов, высвобождающихся из клеток во время их нормального функционирования Обычно эти ферменты выполняют свою функцию внутри клетки и не имеют физиологического значения в плазме крови. У здорового человека активность этих ферментов в плазме низкая и достаточно постоянная, так как постоянно соотношение скоростей высвобождения их из клеток и скоростей разрушения.

При многих заболеваниях происходит повреждение клеток, и их содержимое, в том числе и ферменты, высвобождаются **в** кровь. К причинам, вызывающим высвобождение внутриклеточного содержимого в кровь, относят нарушение проницаемости мембраны клеток (при воспалительных процессах) или нарушение целостности клеток (при некрозе). Определение в крови активности ряда ферментов хорошо налажено в биохимических лабораториях, что используют для диагностики заболеваний сердца, печени, скелетной мускулатуры и других тканей. Уровень активности ферментов в плазме коррелирует со степенью повреждения клеток.

Для энзимодиагностики имеют большое значение знания о субклеточной локализации ферментов. Так, появление в плазме крови ферментов, имеющих только цитозольную локализацию, свидетельствует о воспалительном процессе; при обнаружении митохондриальных или ядерных ферментов можно говорить о более глубоких повреждениях клетки, например о некрозе.

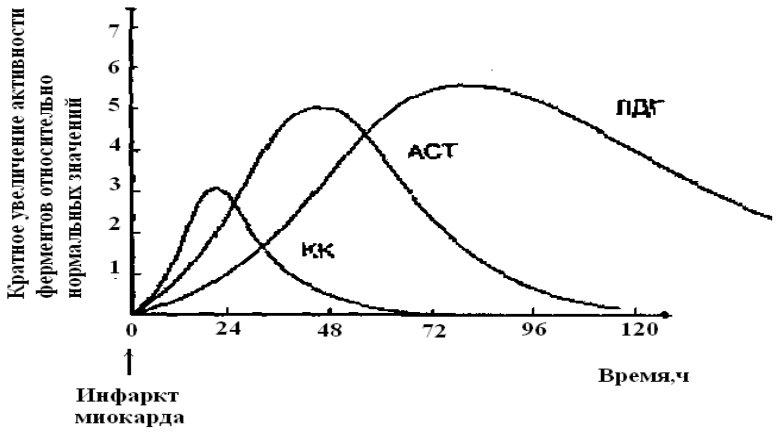
Однако повышение концентрации ферментов не всегда связано с повреждением тканей. При избыточной клеточной пролиферации, например при онкопролиферативных процессах, при повышенной скорости синтеза некоторых ферментов **в** клетках или при нарушенном клиренсе (способности выводиться почками) наблюдают повышение концентрации в крови определённых ферментов. Врачам следует учитывать, что нормальные значения активности ферментов **в** крови детей и беременных женщин отличаются от показателей, характерных для взрослых здоровых людей.

Энзимодиагностики при инфаркте миокарда

Примерно 30% больных инфарктом миокарда имеют атипичную клиническую картину **этого** заболевания. Поэтому необходимо проводить дополнительные методы исследования для подтверждения повреждения сердечной мышцы.

При инфаркте миокарда наблюдают достоверные изменения в крови активности ферментов КК, ЛДГ и аспартатаминотрансферазы — АСТ, которые зависят от времени, прошедшего от начала развития инфаркта и от зоны тканевого повреждения. После закупорки (окклюзии) коронарного сосуда в крови вначале отмечают повышение активности КК изоформы МВ, однако фермент быстро удаляется из кровотока. Обнаружение повышенной активности КК в плазме крови — основной энзимодиагностический критерий инфаркта миокарда. Если у пациента с загрудинными болями не обнаружено изменения в активности КК, диагноз инфаркта миокарда маловероятен.

Дополнительным подтверждением диагноза инфаркта миокарда служит обнаружение активностей ферментов АСТ и ЛДГ в крови больных. Динамика изменений этих активностей также представлена на этом рисунке. Активность АСТ в норме составляет 5-40 МЕ/л. При инфаркте миокарда активность АСТ повышается через 4—6 ч;



Изменение активности ферментов в плазме крови при инфаркте миокарда.

ЭНЗИМОПАТИИ

В основе многих заболеваний лежат нарушения функционирования ферментов в клетке — энзимопатии. Различают первичные (наследственные) и вторичные (приобретённые) энзимопатии. Приобретённые энзимопатии, как и вообще протеинопатии, по-видимому, наблюдают при всех болезнях.

При первичных энзимопатиях дефектные ферменты наследуются, в основном, по аутосомно-рецессивному типу. Гетерозиготы, чаще всего, не имеют фенотипических отклонений. Первичные энзимопатии обычно относят к метаболическим болезням, так как происходит нарушение определённых метаболических путей. -При—эчвем—развитие

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДТСВ

Использование ферментов в качестве терапевтических средств имеет много ограничений вследствие их высокой иммуногенности. Тем не менее энзимотерапию активно развивают в следующих направлениях:

- заместительная терапия — использование ферментов в случае их недостаточности;
- элементы комплексной терапии — применение ферментов в сочетании с другой терапией.

Заместительная энзимотерапия эффективна при желудочно-кишечных заболеваниях, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных соков.

Например, пепсин используют при ахилии, гипо- и анацидных гастритах. Дефицит панкреатических ферментов также в значительной степени может быть компенсирован приёмом внутрь препаратов, содержащих основные ферменты поджелудочной железы (фестал, энзистал, мезим-форте и др.).

В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют при ряде заболеваний, Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) применяют при местном воздействии для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток, для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей. Ферментные препараты рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу используют в качестве противовирусных препаратов при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герметических кератитов.

Ферментные препараты стали широко применять при тромбозах и тромбоэмболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, стрептодеказы, урокиназы.

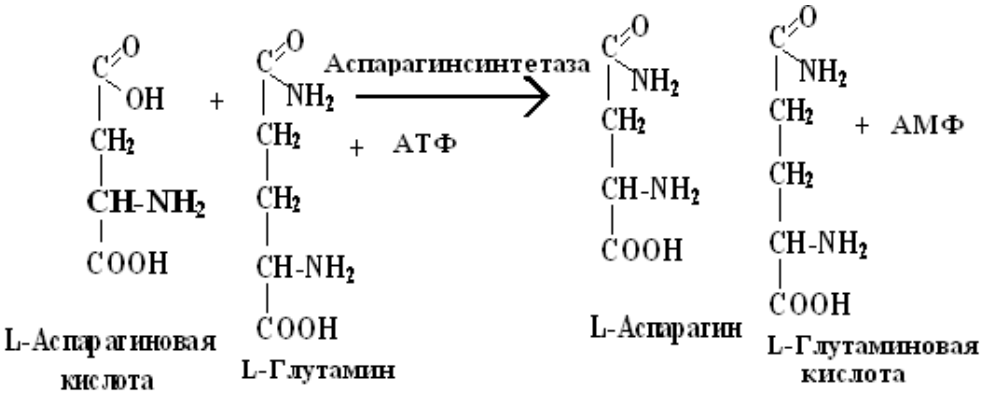
Фермент гиалуронидазу (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты, используют подкожно и внутримышечно для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций (гиалуроновая кислота образует сшивки в соединительной ткани).

Ферментные препараты используют при онкологических заболеваниях. Аспарагиназа, катализирующая реакцию катаболизма аспарагина, нашла применение для лечения лейкозов:

Предпосылкой антилейкемического действия аспарагиназы послужило обнаружение в лейкозных клетках дефектного фермента аспарагин-синтетазы, катализирующего реакцию синтеза аспарагина.

Лейкозные клетки не могут синтезировать аспарагин и получают его из плазмы крови. Если имеющийся в плазме аспарагин разрушать введением аспарагиназы, то в лейкозных клетках наступит дефицит аспарагина и в результате — нарушение метаболизма клетки.

L-Аспарагин — L-Аспарагиновая кислота



: МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Основу жизнедеятельности любого организма составляют химические процессы. Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых ферментами, или энзимами. Среди множества энергетически возможных реакций ферменты избирательно преобразуют реагенты, называемые субстратами, по физиологически полезному пути. Таким образом, ферменты управляют всеми метаболическими процессами организма. Ферменты, как было установлено ещё в 1922 г., являются белками. Их роль уникальна: они увеличивают скорость протекания химической реакции, однако при этом не расходуются. В 1926 г. был впервые очищен и выделен в виде белковых кристаллов фермент уреаза, катализирующий реакции расщепления мочевины до аммиака и диоксида углерода. К настоящему времени в кристаллическом виде получены сотни различных ферментов, расшифрованы их аминокислотные последовательности, изучается их роль в метаболических превращениях.

Поскольку ферменты — белковые молекулы, следовательно, они ооладают всеми свойствами, характерными для белков. В то же время они имеют особенности строения, характеризующие их как катализаторы.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называют субстратом. В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата. Условно эти группы обозначают как участок связывания субстрата и каталитический участок, однако следует помнить, что не всегда эти участки имеют чёткое пространственное разделение и иногда могут «перекрываться».

В участке связывания субстрат при помощи нековалентных связей взаимодействует (связывается) с ферментом, формируя фермент- субстратный комплекс. В каталитическом участке субстрат претерпевает химическое превращение в продукт, который затем высвобождается из активного центра фермента. Схематично процесс катализа можно представить следующим уравнением:

E + S ↔ES ↔EP ↔E + P,

Где Е - фермент, S - субстрат, Р- продукт. Данные обозначения общеприняты и происходят от английских слов enzyme, substrat, product.

Специфичность - наиболее важное свойство ферментов, определяющее биологическую значимость этих молекул. Различают субстрадную и каталитическую специфичности фермента, определяемые строением активного центра.

Субстратная специфичность

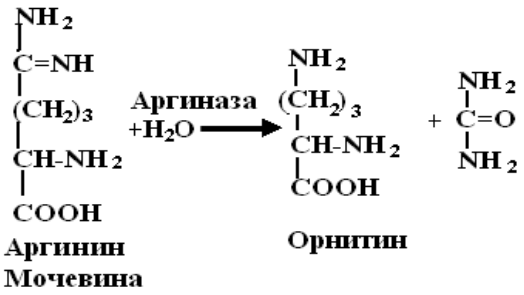
Под субстратной специфичностью понимают способность каждого фермента взаимодействовать лишь с одним или несколькими определенными субстратами. Различают:

- Абсолютную субстратную специфичность;
- Групповую субстратную специфичность;
- Стереоспецифичность.
-

Абсолютная субстратная специфичность.

Активный центр ферментов, обладающих абсолютной субстратной специфичностью, комплементарен только одному субстрату. Следует отметить, что таких ферментов в живых организмах мало.

Пример фермента с абсолютной субстратной специфичностью - аргиназа, катализирующая реакцию расщепления аргинина до мочевины и орнитина:



Групповая субстратная специфичность

Большинство ферментов катализирует однотипные реакции с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов.

Так, фермент панкреатическая липаза катализирует гидролиз жиров в двенадцатиперстной кишке человека, катализируя превращение любой молекулы жира (триацилглицерола) до молекулы моноацилглицерола и двух молекул высших жирных кислот. Панкреатическая липаза гидролизует эфирную связь у *а* - атомов углерода глицерола, независимо от того, какие жирные кислоты входят в состав молекулы жира.

Большинство протеолитических ферментов, осуществляющих гидролиз белков, имеет групповую субстратную специфичность, гидролизуя пептидные связи, образованные разными аминокислотами.

Стереоспецифичность

При наличии у субстрата нескольких стереоизомеров фермент проявляет абсолютную специфичность к одному из них.

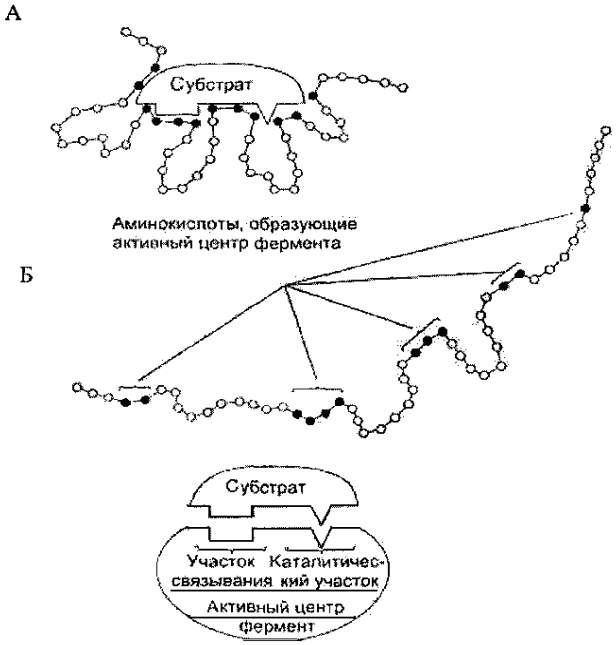
Исключение составляют только ферменты эпимеразы (рацемазы), катализирующие превращение оптических изомеров.

Стереоспецифичность к *а* и *в* - гликозидным связям.

Фермент амилаза действует только на ***а*** - гликозидные связи, что позволяет гидролизовать крахмал и гликоген (полимеры глюкозы), остатки глюкозы в которых соеденены ***а*** - гликозидными связями.

Целлюлоза - также полимер глюкозы, однако остатки глюкозы в нем связаны *в* - гликозидными связями. В результате отсутствия у человека ферментов, специфичных к *в* -

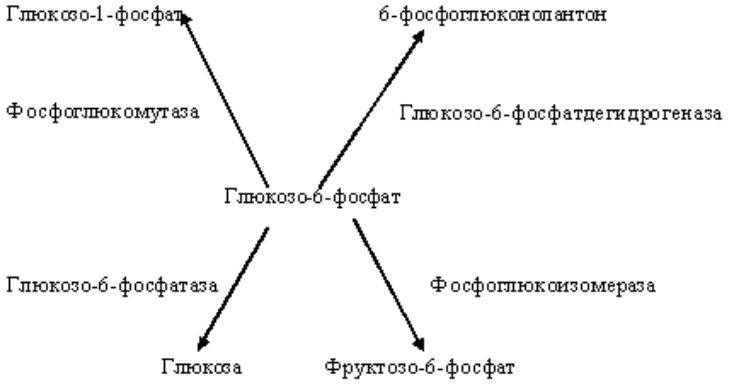
гликозидной связи, целлюлоза не гидролизуется в кишечнике человека и не может служить источником глюкозы.



Строение активного центра фермента. А - присоединение субстрата к ферменту в активном центре; Б положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка; В - активный центр фермента условно разделяется на участок связывания и каталитический участок- Участок связывания представлен радикалами аминокислот, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата. Каталитический участок образован радикалами аминокислотных остатков, функциональные группы которых обеспечивают химическое превращение субстпатя

Каталитическая специфичность

Фермент катализирует превращение присоединенного превращение присоединенного субстрата по одному из возможных путей его превращения. Это свойство обеспечивается строением каталитического участка активного центра фермента и называется каталитической специфичностью пути превращения субстрата. Так, как молекула глюкозо-6-фосфата в клетках печени человека - субстрат 4 различных ферментов: фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, фосфоглюкоизомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Однако из-за особенностей строения каталитических участков этих ферментов происходит различное превращение этого соединения с образованием 4 различных продуктов.



КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКУЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Каждый фермент имеет 2 названия. Первое - короткое, так называемое рабочее, удобное для повседневного использования. Второе (более полное) - систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента.

Рабочее название

В названии большинства ферментов содержится суффикс «аза», присоединенный к названию субстрата реакции, например уреаза, сахараза, липаза, нуклеаза или к названию химического превращения определенного субстрата, например лактатдегидрогеназа, аденилатциклаза, фосфоглюкомутаза, пируваткарбоксилаза. Согласно российской классификации ферментов (КФ), названия ферментов пишутся слитно. Однако в употреблении сохранился ряд тривиальных, исторически закрепленных названий ферментов, которые не дают представления ни о субстрате, ни о типе химического превращения, например трипсин, пепсин, ренин, тромбин.

Классы ферментов

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961г. разработал систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разбиты на босновных классов в зависимости от типа катализируемой химической реакции. Каждый класс состоит из многочисленных подклассов и подподклассов с учетом преобразуемой химической группы субстрата, донора и акцептора преобразуемых группировок, наличия дополнительных молекул и т.д. Каждый из 6 классов имеет свой порядковый номер, строго закрепленный за ним.

Оксидоредуктазы

Катализуют различные окислительно - восстановительные реакции с участием 2 субстратов (перенос е или атомов водорода с одного субстрата на другой).

Систематическое наименование ферментов составляют по формуле «донор: акцептор-оксидоредуктаза», рабочее - субстрат - подкласс оксидоредуктаз.

Дегидрогеназы. В этот подкласс входят ферменты, катализирующие реакции дегидрирования (отщепления водорода). В качестве акцепторов электронов используются коферменты NAD^+, $NADP^+$,FAD^+,FMN^+ (см. ниже). Все ферменты этой группы обладают высокой субстратной специфичностью. Пример реакции:

Трансферазы

Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому.

Подразделяют в зависимости от переносимой группы.

Название этих ферментов составляют по формуле «донор: акцептор транспортируемая группа трансферазы». К классу трансфераз относят

аминотрансферазы, ацилтрансферазы, метилтранс феразы, гликозилтрансферазы, киназы

(фосфотрансферазы). Примеры реакций.

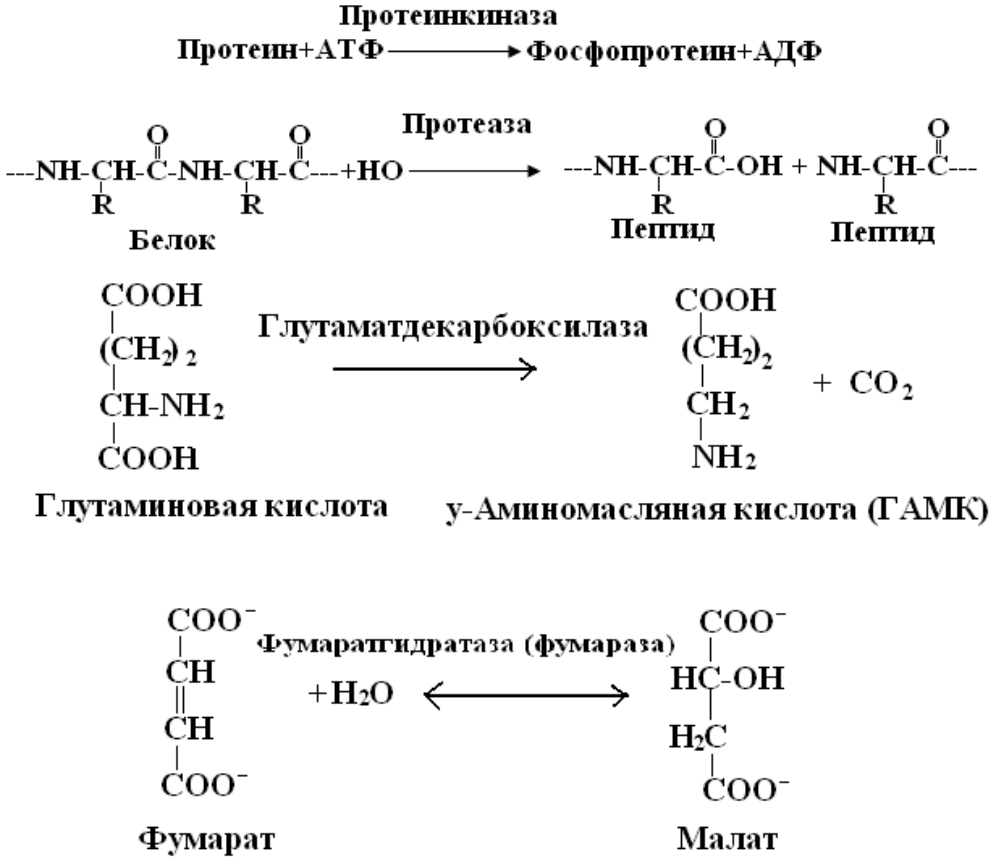
Гидролазы

Катализируют реакции гидролиза (расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва). Подразделяют в зависимости от расщепляемой связи. Наименование ферментов составляют по формуле «субстрат—гидролаза» или прямым присоединением к названию субстрата суффикса «аза», например протеаза, липаза, фосфолипаза, рибонуклеаза. Для отдельных классов гидролаз применимы специальные термины, характеризующие гидролиз определённой химической связи: эстеразы, фосфатазы и др.

Лиазы

К лиазам относят ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путём определённую группу (при этом могут отщепляться ССЬ, H2O, NH2, SH2 и др.) или присоединяющие чаще всего молекулу воды по двойной связи.

Наименование ферментов составляют по формуле «субстрат—отщепляемая или присоединяемая группировка».



Изомеразы

Катализируют различные внутримолекулярные превращения. Подразделяют в зависимости от типа реакции изомеризации.

Как общее название ферментов этого класса применяют термин «изомеразы», например (см. схему А).

Изомеразы могут катализировать внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, осуществляя взаимопревращения альдоз и кетоз, кетонных и енольных групп, перемещения двойных связей внутри молекулы (см. схему Б).

Когда изомеризация состоит во внутримолекулярном переносе группы, фермент называют «мутазой».

Лигазы (синтетазы)

Катализируют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи. Этот процесс сопряжён с разрывом фосфоэфирной связи в молекуле АТФ (или других нуклеозидтрифосфатов) или с разрывом; макроэргических связей других соединение В первом случае (при использовании энергии: гидролиза АТФ) такие ферменты называют лигазами или синтетазами. В случае, когда источником энергии служит любое другое макроэргическое соединение (не АТФ), ферменты называют синтазами.

Систематическое название.

В 1972г. комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии были предложены «Правила номенклатуры ферментов», имеющие кодовое четырехзначное цифровое обозначение, где первая цифра

обозначает класс фермента, вторая цифра (подкласс) уточняет преобразуемую группировку, третья (подподкласс) - уточняет дополнительных участников реакции (например, донора и акцептора) и четвертая - порядковый номер фермента в данной подгруппе. Так, фермент малатдегидрогезана имеет систематическое название L -малат: NAD- оксидоредуктаза и кодовый шифр 1.1.1.38. Шифр означает, что этот фермент относят к первому классу ферментов - оксидоредуктаз, окисляемая группа -гидроксильная группировка (1) в присутствии кофермента NAD^+ (1) и порядковый номер фермента в этой подгруппе - 38. кодовую номенклатуру ферментов в основном используют в научной литературе.

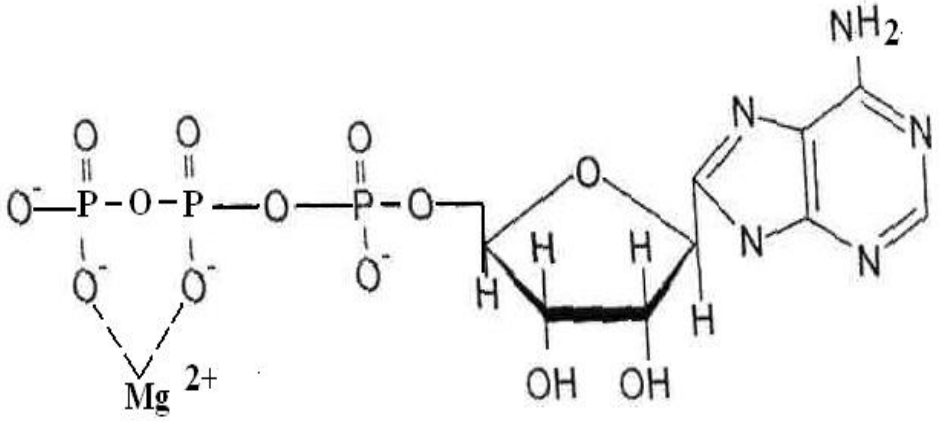
КОФАКТОРЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы (коферментах) и/или в ионах металлов (кофакторах).

Термин «кофермент» был введен в начале XX века и обозначал часть некоторых ферментов, которая легко отделялась от белковой молекулы фермента и удалялась через полупроницаемую мембрану при диализе. Несколько позже было выяснено, что большинство ферментов состоит из термолабильной белковой части и термостабильного небелкового фактора - кофермента. Белковая часть получила название «апофермент», который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью. Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу холофермента, обладающую каталитической активностью. Более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Рассмотрим роль кофакторов в ферметативном катализе.

1. Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента

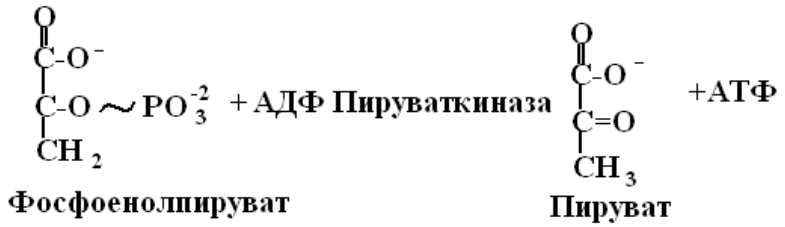
Ионы металла выполняют функцию стабилизаторов молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур.


NH2
O
P
O
O
O

субстрата и протекание химической реакции. В ряде случаев ион металла может способствовать присоединению кофермента. Перечисленные выше функции выполняют такие металлы, как Mg^{2+}? Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mo^{2+}. В отсутствие металла эти ферменты активностью не обладают. Такие ферменты получили название «металлоэнзимы». Схематично данный процесс взаимодействия фермента, субстрата и металла можно представить

E-Me-S

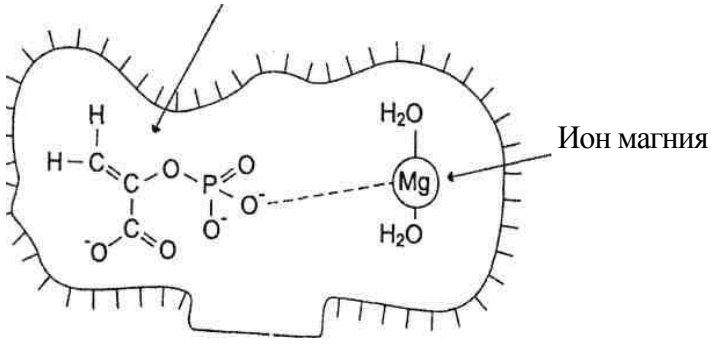
К металлоэнзимам относят, например, фермент пируваткиназу катализирующий реакцию:



Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента

Ионы металлов обеспечивают сохранение вторичной, третичной, четвертичной структуры молекулы фермента. Такие ферменты в отсутствие

Фосфоенолпируват



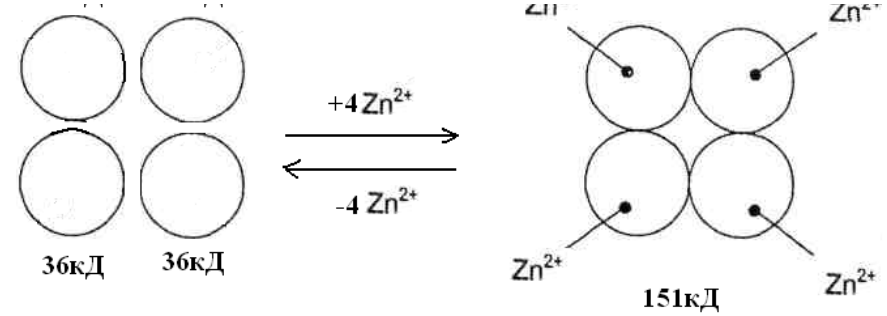
Участок связывания АДФ

Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре пируваткиназы. Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и АДФ. Mg^{2+} участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоеноппирувата. В ходе ферментативной реакции образуется пируват и АТФ. Ионов металлов способны к химическому катализу, однако они нестабильны. Их активность снижается и даже полностью исчезает при не больших изменениях pH, температуры и других незначительных изменениях внешнего окружения. Таким образом, ионы металлов выполняют функцию стабилизаторов оптимальной конформации белковой молекулы.

Иногда в стабилизации вторичной и третичной структуры принимают участие ионы щелочно-земельных металлов. Так, для поддержания третичной конформации пируваткиназы необходимы ионы K^{+}.

Для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы, катализирующей реакцию окисления этанола, необходимы ионы цинка. Алкогольдегидрогеназа состоит из 4 субъедениц с молекулярной массой 151 кД. В состав фермента входят 4 атома Zn^{2+}, Удаление Zn^{2+} приводит к потере активности фермента за счет диссоциации на 4 неактивные субъедениицы с молекулярной массой ЗбкД ***Роль металлов в ферментативном катализе***

Не менее важную роль отводят ионам металлов в осуществлении ферментативного катализа.



Фермент не активен

Алькогольдегидрогеназа
Фермент активен

Единицы измерения активности фермента

Одна международная единица активности (МЕ) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при оптимальных условиях проведения ферментативной реакции. Оптимальные условия индивидуальны для каждого фермента и зависят от температуры среды, pH раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

$$МЕ = \frac{\text{1 мкмоль превращенного субстрата}}{\text{1 мин}}$$

количество единиц активности пМЕ определяют по формуле:

$$nME = \frac{\text{Количество превращенного субстрата}}{\text{Время (мин)}}$$

В 1973 г. была принята новая единица активности ферментов: 1 катал (кат), соответствующий такому количеству катализатора, которое превращает 1 моль субстрата за 1 с. Количество каталов определяют по формуле:

$$nкатал = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (моль)}}{\text{Время (с)}}$$

Международная единица ферментативной активности МЕ связана с каталом следующими равенствами:

1кат=1моль S/c=60 моль S/мин=6OxIO^6 мкмоль/мин = 6x10^7 МЕ,
1 МЕ = 1 мкмоль/мин = 1/60 мкмоль/с = 1/60 мккат = 16,67 нкат.

В медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов часто используют международные единицы активности — МЕ.

Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (уд. ак.) фермента, численно равную количеству единиц активности фермента (пМЕ) в образце ткани, делённому на массу (мг) белка в этой ткани:

$$Уд.\ ак. = \frac{\text{Количество превращенного субстрата}}{\text{Время (мин)} \times \text{количество белка (мг)}}$$

По удельной активности судят об обчистке фермента: чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность.

ТЕМА: ВИТАМИНЫ И ИХ КОФЕРМЕНТНАЯ ФУНКЦИЯ.

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Витамины - пищевые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена целостного организма. Нарушения нормального процесса обмена часто связаны с недостаточным поступлениям витаминов в организм, полным отсутствием их в потребляемой пище или нарушениями их всасывания, транспорта и т.д.

В результате развиваются **авитаминозы** – болезни возникающие на почве полного отсутствия в пище или полного нарушения усвоения какого-либо витамина, и **гиповитаминозы**, обусловленные недостаточным поступлением витаминов с пищей или плохим их усвоением. Также существуют патологические состояния, связанные с поступлением черезмерно больших количеств витаминов в организме – **гипервитаминозы.**

Классификация витаминов.

Витамины растворимые в жирах

1. Витамин А (антиксерофтальмический); ретинол
2. Витамин D (антирахитический); кальциферолы
3. Витамин Е (антистерильный, витамин размножения); токоферолы
4. Витамин К (антигеморрагический); нафтохиноны

Витамины растворимые в воде

1. Витамин В1 (антиневритный); тиамин
2. Витамин В2 (Витамин роста); рибофлавин
3. Витамин В6 (антидерматитный, адермин); пиридоксин
4. Витамин В12 (антианемический); кобаламин
5. Витамин РР (антипеллагрический) ниацин, никотинамид
6. Витамин Вс (антианемический) фолиевая кислота
7. Витамин В3 (антидерматитный) пантотеновая кислота
8. Витамин Н (антисеборейный, фактор роста бактерий, дрожжей и грибов) биотин
9. Витамин С (антискорбутный) аскорбиновая кислота
10. Витамин Р (капиляроукрепляющий, витамин проницаемости) биофлавоноиды

ВИТАМИНЫ, РАСТВОРИМЫЕ В ЖИРАХ

Витамины группы А

Витамин А (ретинол , антиксерофтальмический витамин) хорошо изучен. Известны три витамина группы А: $A_ь$ A_2 и цис-форма витамина А,, названная неовитамином А. С химической точки зрения ретинол представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из шестичленного кольца (В-ионона), двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы.

Витамин A_2 отличается от витамина А1, наличием дополнительной двойной связи в кольце В-ионона. Все три формы витаминов группы А существуют в виде стереоизомеров, однако только некоторые из них обладают биологической активностью. Витамины группы А хорошо растворимы в жирах и жирорастворителях: бензоле, хлороформе, эфире, ацетоне и др. В организме они легко окисляются при участии специфических ферментов с образованием соответствующих *цис*- и *транс*-альдегидов, получивших название р е т и н а л ей (ретиненов), т. е. альдегидов витамина А. В организме витамин А может откладываться про запас в печени в форме более устойчивых сложных зфиров с уксусной или пальмитиновой кислотой.

Характерными симптомами недостаточности витамина А у человека и животных являются, помимо торможения роста, потеря массы тела и общее истощение организма, специфические поражения кожи, слизистых оболочек и глаз. В первую очередь поражается эпителий кожи, что сопровождается пролиферацией и патологическим ороговением его; процесс сопровождается развитием фолликулярного гиперкератоза, кожа усиленно шелушится, становится сухой. В

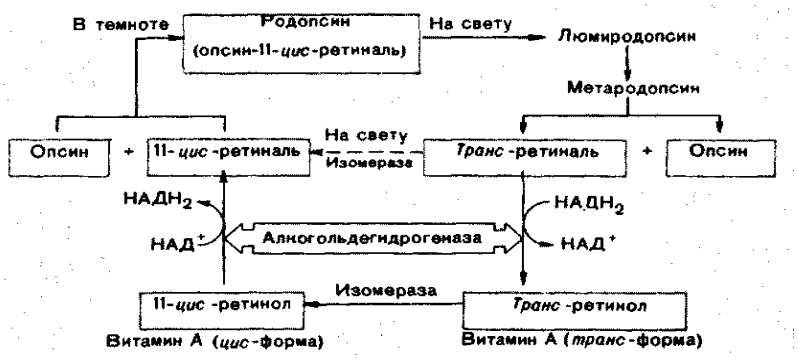
результате начинаются вторичные гнойные и гнилостные процессы. При авитаминозе А поражается также эпителий слизистой оболочки всего желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы и дыхательного аппарата. Характерно поражение глазного яблока — к с е р о-ф т а л ь м и я, т. е. развитие сухости роговой оболочки глаза (от греч. xerox — сухой, ophtalmos - глаз), являющееся следствием закупорки слезного канала, эпителий которого также подвергается ороговению. Глазное яблоко не омывается слезой, которая, как известно, обладает бактерицидным свойством. Вследствие этого развиваются воспаления конъюнктивы, отек, изъязвление и размягчение роговой оболочки. Этот комплекс поражений обозначают термином к е р а т о м а л я ц и я (о т греч. keras - рог, malatia - распад); она развивается очень быстро, иногда в течение нескольких часов. Распад и размягчение роговой оболочки связаны с развитием гнойного процесса, поскольку гнилостные микроорганизмы при отсутствии слезной жидкости быстро развиваются на поверхности роговицы.

К наиболее ранним и специфическим симптомам авитаминоза А (гиповитаминоза А) относится куриная, или ночная, слепота (гемералопия). Она выражается в потере остроты зрения, точнее, способности различать предметы в сумерках, хотя больные днем видят нормально.

Помимо гипо- и авитаминозов, описаны случаи г и п е р в и т а м и н о з а . Этому сопутствуют, как правило, потеря аппетита, головные боли, диспепсические явления (тошнота, рвота), бессонница. Гипервитаминоз может развиться также и у детей в результате приема больших количеств рыбьего жира и препаратов витамина А. Описано развитие острого гипервитаминоза у детей после приема высоких доз витамина А, при этом повышается его содержание в крови.

Б и о л о г и ч е с к а я роль. Витамин А оказывает влияние на барьерную функцию кожи, слизистых оболочек, проницаемость клеточных мембран и биосинтез их компонентов, в частности определенных гликопротеинов. Действие витамина А в этих случаях связывают с его вероятной причастностью к синтезу белка. Существует предположение, что благодаря наличию двойных связей в молекуле витамин А может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, поскольку он способен образовывать перекиси, которые в свою очередь повышают скорость окисления других соединений.

Более подробно выяснено значение витамина А в п р о ц е с с е светоощущения. В этом важном физиологическом процессе выдающуюся роль играет особый хромолипопротеин - сложный белок родопсин, или зрительный пурпур, являющийся основным светочувствительным веществом сетчатки, в частности палочек, занимающих ее периферическую часть. Установлено, что родопсин состоит из липо-протеина опсина и простетической группы, представленной альдегидом витамина А] (ретиналь); связь между ними осуществляется через альдегидную группу витамина и свободную £-ТМНггруппу белка с образованием шиффова основания. На свету родопсин расщепляется на белок опсин и ретиналь; последний превращается в *трансформу;* с этими превращениями каким-то образом связана трансформация энергии световых лучей в зрительное возбуждение - процесс, который до сих пор остается загадкой. В темноте происходит обратный процесс - синтез родопсина, требующий наличия активной формы альдегида - П-г/ыоретиналя, который может синтезироваться из уыс-ретинола или т/шнс-ретиналя, или *транс-формы* витамина А при участии специфических дегидрогеназы и изомеразы. Более подробно цикл превращений родопсина в сетчатке глаза на свету и в темноте можно представить в виде



схемы:

Таким образом, под действием кванта света родопсин через ряд промежуточных продуктов («оранжевый» и «желтый» белки) распадается на опсин и алло-т/?амс-рети-наль, представляющий собой неактивную форму альдегида витамина А. Имеются указания, что алло-транс-ретиналь может частично превращаться в активный 11-г/ыо ретииаль под влиянием света (на схеме - пунктирная стрелка). Однако главным путем образования П-унс-ретиналя является ферментативное превращение *транс*-формы витамина А в г/мс-форму (под действием изомеразы) и последующее окисление ее при участии алкогольдегидрогеназы .

Распространение в природе и суточная потребность

Витамин А широко распространен. Наиболее богаты этим витамином следующие продукты животного происхождения:,печень крупного рогатого скота и свиней, яичный желток, цельное молоко, сметана, сливки. Особенно много свободного витамина А в жирах печени морскою окуня, трески, палтуса; в частности, в жире печени морского окуня содержание витамина А доходит до 35%. Источниками витамина А для человека являются также красно-мякотные овощи (морковь, томаты, перец и др.), в которых витамин А содержится в виде п р о в и т а м и н о в — каротин о в, выделенных впервые из моркови (от лат. carota - морковь). Известны три типа каротинов: а-, }}- и у-каротины, отличающиеся друг от друга по химическому строению и биологической активности. Наибольшей биологической активностью обладает 3-каротин, поскольку он содержит два Р-иононовых кольца и при распаде в организме из него образуются две молекулы витамина А.

При окислительном распаде а- и у-каротинов образуется только по одной молекуле витамина А, поскольку зти провитамины содержа! по одному Р-иононовому кольцу. Расщепление каротинов на молекулы витамина А преимущественно осуществляется в кишечнике иод действием специфического фермента Р-каротин-диоксн-геназы (хотя не исключена возможность аналогичного превращения и в печени). Это расщепление происходи! в присутствии кислорода; при этом образуются две молекулы ретиналя, которые иол действием специфической кишечной редуктазы восстанавливаю гея в витамин А. Степень усвоения каротинов и свободного витамина А зависит как от содержания жиров в пище, так и от наличия свободных желчных кислот, являющихся абсолютно необходимыми соединениями для всасывания продуктов распада жиров.

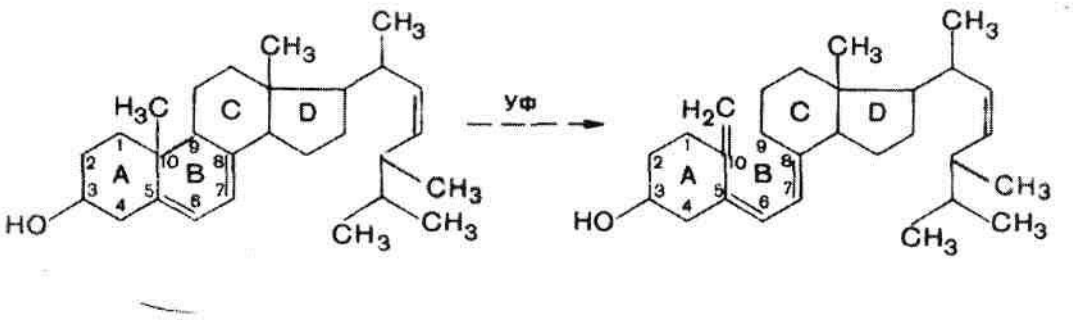
Суточная потребность в витамине А для взрослого человека составляет в среднем 2,7 мг витамина А или от 2 до 5 мг Р-каротина. Основным органом, в котором частично откладывается витамин А у человека, является печень, содержащая в норме около 20 мг этого витамина на 100 г ткани.

Витамины группы D

Витамин *D* (кальциферол, антирахитический витамин) существует в виде нескольких соединений, отличающихся по химическому строению и биологической активности Для человека и животных активными препаратами считаются витамины D2 и D3 хотя в литературе известен и витамин D_4 (дигидроэргокальциферол). В природных продуктах содержатся преимущественно провитамины D_2 и D3 , соответственно — эргостерин и холестерин.

В 1924 г. А. Гесс и М. Вейнштоk и независимо Г. Стинбок из растительных масел и продуктов питания после воздействия УФ-излучением с длиной волны 280-310 нм получили активный препарат, предотвращающий развитие рахита у детей. Оказалось, что активное начало связано с каким-то стерином, который был идентифицирован с эргостерином и назван витамином Б). В 1932 г. А. Виндаус выделил эргостерол из дрожжей и показал, что истинным витамином D1 является не эргостерин, а продукт его превращения, образующийся при УФ-облучении, который был обозначен витамином D_2, или кальциферолом. В 1956 г. Международная комиссия по химической номенклатуре предложила для витамина D2 новое название — эрго-кальциферол.

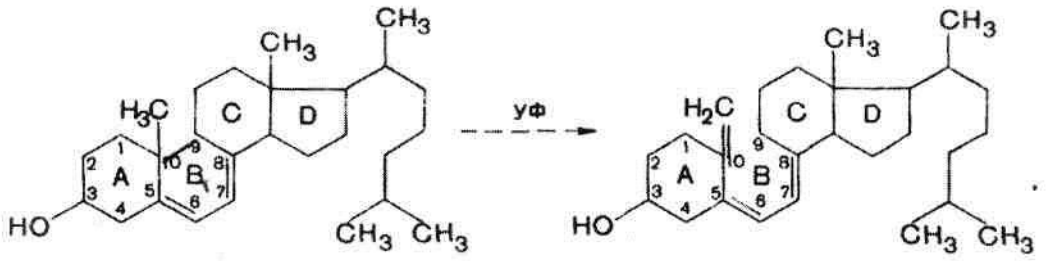
С химической точки зрения эргостерин представляет собой одноатомный ненасыщенный циклический спирт, в основе структуры которого лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена; под действием УФ-излучения эргостерин через ряд промежуточных продуктов (дюмистерин тахистерин) превращается в витамин D_2:



Эргостерин * Витамин 0_2 (эргоиальциферол)

Как видно, витамин D_2 образуется из эргостерина в результате разрыва между 9-м и 10-м углеродными атомами кольца В под действием УФ-излучения.

В 1936 г. в лаборатории А. Виндауса был выделен активный в отношении рахита препарат из рыбьего жира и назван витамином D3. Выяснилось, кроме того, что предшественником витамина D3 является не эргостерин, а х о л е с т е р и н . А. Виндаус в 1937 г. выделил из поверхностных слоев кожи свиньи 7-дегидро-холестерин, который при УФ-облучении превращался в активный витамин D3.



7-Дегидрохолвстврин витамин 0_3 (холекальциферол)

Следует отметить, что благодаря наличию холестерина и 7-дег идрохолестерина в составе липидов кожи человека имеется возможность синтеза витамина D3 при солнечном облучении или облучении лампой ультрафиолетового излучения поверхности тела. Этим приемом широко пользуются при лечении рахита у детей.

Витамины D_2 и D_3 представляют собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 115—117°С, нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в жирах, хлороформе, эфире и других жирорастворителях.

Недостаток витамина D в рационе детей приводит к возникновению широко известного заболевания - рахита, в основе развития которого лежат изменения фос-форно-кальциевого обмена и нарушение отложения в костной ткани фосфата кальция. Поэтому основные симптомы рахита связаны с нарушением нормального процесса остеогенеза. Развивается о с т е о м а л я ц и я — размягчение костей. Кости становятся мягкими и под тяжестью тела принимают уродливые О- или Х-образные формы. На костно-хрящевой границе ребер отмечаются своеобразные утолщения -так называемые рахитические четки. У детей при рахите относительно большая голова и увеличенный живот. Развитие последнего симптома обусловлено гипотонией мышц. Нарушение процесса остеогенеза при рахите сказывается также на развитии зубов - задерживается появление первых зубов и развитие дентина. Для авитаминоза D взрослых характерной особенностью является развитие о с т е о п о р о з а вследствие вымывания уже отложившихся солей; кости становятся хрупкими, что часто приводит к переломам.

Б и о л о г и ч е с к а я р о л ь . Значение витамина D начинает проясняться в последнее время. Получены доказательства, что при физиологических условиях кальциферолы функционально инертны. По данным Г. де Лука и сотр., витамин Э выполняет свои биологические функции в организме в форме образующихся из него активных метаболитов, в частности 1,25-диоксихолекальциферола [обозначается $1,25(OH)_2D_3$] и 24,25-

диоксихолекалышферола [24,25$(OH)_2$D3}][1], причем если гид-роксшшрование в 25-м положении осуществляется в печени, то этот процесс в 1-м положении протекает в почках; показано, кроме того, что специфическая 1а-гидро-ксилаза содержится, помимо почек, также в костной ткани и плаценте. Имеются бесспорные доказательства, что именно эти активные метаболиты, выполняя скорее гормональную, чем биокаталитическую роль, функционируют в системе гомеостати-ческой регуляции обмена кальция и остеогенеза. В частности, 1,25$(OH)_2D_3$ участвует в регуляции процессов всасывания Са и Р в кишечнике, резорбции костной ткани и реабсорбции Са и Р в почечных канальцах. Процессы остеогенеза и ремоделиро-вания костной ткани, напротив, регулируются 24,25$(OH)_2$D. Методом ауторадиогра-фии показано накопление 1,25$(OH)_2$Оз в ядерном аппарате клеток органов-мишеней (почки, мозг, поджелудочная железа, гипофиз, молочная железа); в то же время он не открывается в печени, селезенке, скелетной и сердечной мышцах, способствуя синтезу мРНК, соответственно Са-связываюших белков и гормонов, регулирующих обмен кальция. Подтвердилось предположение о существовании специфического внутриклеточного белка, являющегося рецептором кальциферолов. Показано, кроме того, что 1,25$(OH)_2$Dз вызывает дифференцировку некоторых лейкозных клеток, что, по-видимому, указывает на возможную связь между витаминами группы D и опухолевым ростом. Это не означает, однако, что функции витаминов *D* осуществляются только через ядерный аппарат. Совсем недавно открыты новые пути метаболизма витаминов группы D, включающие окисление в 23-м положении с образованием 23,25$(OH)_2$D3.ч или 23-гидроксилированной формы 1,25$(OH)_2$D3. Более того, 24- и 26-гидроксилированные метаболиты D3 в частности 1-оксипроизводные последних, по биологическому действию оказались в 10 раз более активными, чем нативный 1,25$(OH)_2$D.

Распространение в природе и суточная потребность

Наибольшее количество витамина D3 содержится в продуктах животного проис-хождения: сливочном масле, желтке яиц, печени и в жирах, а также в рыбьем жире, который широко использовался для профилактики и лечения рахита. Из растительных продуктов наиболее богаты витамином D_2 растительные масла (подсолнеч ное, оливковое и др.); много витамина D2 в дрожжах. Для профилактики рахита а детском возрасте, помимо полноценного питания, включающего масло, молоко, жиры, мясо и другие продукты, рекомендуется УФ-облучение поверхности кожи (солнечное облучение, лампы ультрафиолетового облучения), а также продуктов растительного происхождения, способствующие обогащению их витамином D.

Суточная потребность в витамине D для детей колеблется от 10 до 25 мкг (500-1000 МЕ) в зависимости от возраста, физиологического состояния организма, соотношений солей фосфора и кальция в рационе и др. Для взрослого человека достаточно минимального количества витамина D.

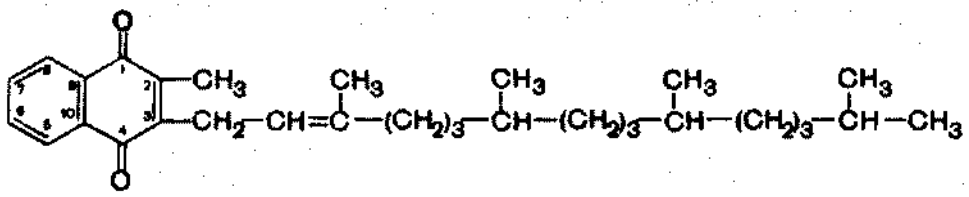
Случаи гипервитаминоза D у людей наблюдаются при «ударной» терапии рахита и некоторых дерматозов (волчанка). Гиервитаминоз был отмечен после приема более 1 500000 МЕ витамина D в сутки. Прием очень больших доз витамина D может вызвать смертельный исход. У экспериментальных животных гипервитаминоз сопровождается увеличением отложения гидроксилапатита в костях и некоторых внутренних органах. У собак, например, отмечена кальцификация почек. Однако все эти симптомы исчезают после прекращения приема витамина.

Витамины группы К

Согласно номенклатуре биологической химии, к группе витаминов К относятся два типа хинонов с боковыми цепями, представленными изопреноидными звеньями: витамины К.1 и $К_2$. В основе циклической структуры обоих витаминов лежит кольцо 1,4-нафтохинона.

Для витамина К1 сохранено название ф и л л о х и н о н , а для витаминов группы К 2 введено название менахинон с указанием числа изопреновых звеньев[2]; в частности, для витамина $К_2$ рекомендовано название менахинон-6, где цифра 6 указывает число кзопреновых звеньев в боковой цепи.

Витамин К.1 (филлохинон) впервые был изолирован из люцерны; это производное 2-метил-1,4-нафтохинона, содержащего в положении 3 фитильный радикал, имеющий 20 атомов углерода:



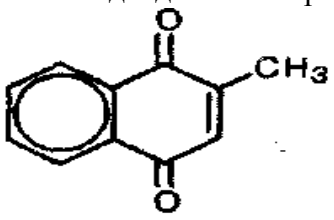
Витамин К(филлохинон)

Витамин К-2 открыт в растениях и у животных и содержит в боковой цепи от 6 до 9 изопреновых единиц.

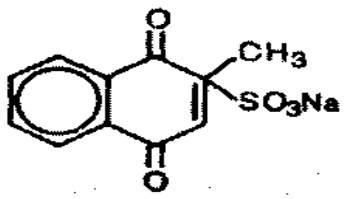
Витамин К представляет собой светло-желтую жидкость, неустойчивую при нагревании в щелочной среде и при облучении; витамин К 2 — желтые кристаллы, также неустойчив. Оба препарата нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях: бензоле, хлороформе, ацетоне, гексане и др.

Помимо витаминов К) и $К_2$. некоторые производные нафтохинона обладают витаминными свойствами и высокой антигеморрагической активностью, например синтетический аналог витамина К, лишенный боковой цепи в положении 3, обозначается витамином Кч (ченадион, или 2-метил-1,4-нафтохинон). Поскольку витамин К? нерастворим в воде, на его основе были синтезированы десятки растворимых в воде производных,

одно из которых нашло широкое применение в медицинской практике -это синтезированная А. В. Падладиным натриевая соль бисульфитного производного витамина



Витамин $К_3$



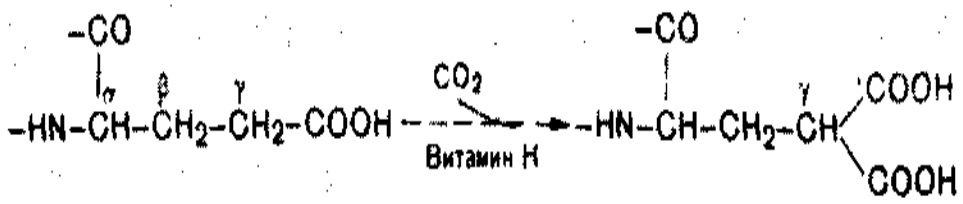
Викасол

К — викасол:

Витамин К является антигеморрагическим фактором, определенным образом связанным со свертыванием крови. Поэтому при авитаминозе К возникают самопроизвольные паренхиматозные и капиллярные кровотечения (носовые кровотечения, внутренние кровоизлияния). Кроме того, любые поражения сосудов (включая хирургические операции) при авитаминозе К могут привести к обильным кровотечениям. У человека авитаминоз К встречается реже, чем другие авитаминозы. Объясняется это двумя обстоятельствами: во-первых, смешанная пища довольно богата витамином К (поскольку витамины группы К синтезируются в зеленых растениях и некоторыми микроорганизмами); во-вторых, синтезируемого кишечной микрофлорой количества витамина К вполне достаточно для предотвращения авитаминоза. Авитаминоз обычно развивается при нарушении процесса всасывания жиров в кишечнике. У грудных детей часто возникают обильные подкожные кровотечения и кровоизлияния; они наблюдаются и при так называемом геморрагическом диатезе, являющемся следствием недостаточности свертывания крови у матери.

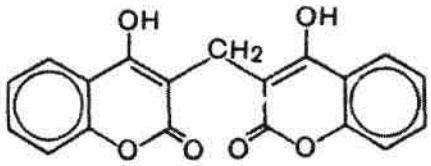
Биологическая роль. Витамин К принимает участие в синтезе протромбина в печени, очевидно, через ферментную систему. Получены доказательства, что витамин К необходим как стимулятор биосинтеза в печени минимум четырех белков-ферментов, участвующих в сложном процессе свертывания крови; факторов П. VII, IX, X. В частности, имеются данные, что в молекуле указанных факторов обязательно присутствуют остатки карбоксиглутаминовой кислоты; в молекуле активною протромбина таких остатков

оказалось 10. Показано, что у-карбоксилирование остатка гдутаминовой кислоты в молекуле белков протекает поеттрансляционно при участии {Млутамилкарбоксилазы, требующей наличия витамина К. В пой реакции витамин К выполняет, по-видимому, кофакторную функцию.

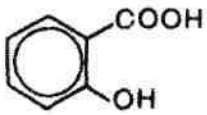


Реакция пост синтетического карбоксили'рования у-карбоксильной группы глутама-га играет, кроме того, важную роль в связывании ионов Ca^{2+} с молекулой белка, поскольку при этом образуются дополнительные отрицательно заряженные ионы карбоксильных групп. Укажем также, что биотин не участвует в этой реакции карбоксилирования.

Одним из мощных антивитаминов К является природное вещество ди к у м а р о л (дикумарин), введение которого вызывает резкое снижение в крови протромбина и ряда других белковых факторов свертывания крови и соответственно кровотечения. Аналогичным свойством обладает, кроме того, салициловая кислота.



Дикумарол



Салициловая кислота

Способность дикумарола снижать свертываемость крови в дальнейшем стали использовать для лечения болезней человека, характеризующихся повышенной свертываемостью крови. В частности, при тромбозах, тромбофлебитах дикумарол, способствуя разжижению сгустка крови, оказывает эффективное действие. В случае возникновения кровотечения после введения дикумарола больным назначают препараты витамина К..

Распространение в природе и суточная потребность

Наиболее богаты витамином К растения, в частности зеленые листья каштана. крапивы, люперны; к растительным продуктам, богатым витамином К, следует отнести капусту, шпинат, тыкву, зеленые томаты, арахисовое масло, ягоды рябины и т. д. В животных продуктах, кроме печени свиньи, он почти не содержится. Суточная потребность в витамине К для человека точно не установлена, поскольку он синтезируется микроорганизмами кишечника: считается достаточным количество около 1г.

Витамины группы Е

В начале 20-х годов Г. Эванс показал, что в смешанной пище содержится вещество, которое абсолютно необходимо для нормального размножения животных. Так, у крыс, содержащихся на синтетической диете, включающей молоко, препараты железа и дрожжи (в качестве источника витаминов группы В), развивалось бесплодие. Добавление к такой диете листьев салата полностью излечивало животных от бесплодия. Активное вещество, предохраняющее от бесплодия, было выделено из масла пшеничных зародышей и хлопкового масла и названо витамином Е, или токоферолом (от греч. tokos — потомство, phero — несу). Вскоре был осуществлен и химический синтез. В настоящее время известно 7 природных соединений, обладающих биологической активностью витамина Е. Все они выделены к чистом виде из растительных масел или получены синтетическим путем и обозначаются соответственно: а-, В-, у-, 5-токоферолы и 8-метилтокотриенол.

С химической точки зрения токоферолы представляют собой производные 2-метил-2(4 . 8', 12 -триметилтридецил)-хроман-6-ода, или токола. Ниже представлена структура а-токоферола (5,7,8-триметилтокола).

Различные токоферолы отличаются друг от друга числом и расположением метальных групп в бензольном кольце. Они представляют собой бесцветные маслянистые жидкости, хорошо растворимые в жирах (маслах) и жирорастворителях, весьма устойчивые к нагреванию, но быстро разрушающиеся под действием УФ-излу-чения.

Изменения в организме человека при авитаминозе Е изучены недостаточно, поскольку с растительными маслами человек получает достаточное количество витамина Е. Недостаточность его отмечена в некоторых тропических странах, где основным источником пиши являются углеводы, тогда как жиры употребляются в незначительных количествах. Препараты витамина Е нашли применение в медицинской практике. Они иногда предотвращают самопроизвольные (или привычные) аборты у женщин. У экспериментальных животных, в частности крыс, недостаточность витамина Е вызывает нарушение эмбриогенеза и дегенеративные изменения репродуктивных органов, что приводит к стерильности. У самок в большей степени поражается плацента, чем яичники, не нарушен процесс оплодотворения яйца, но очень скоро плод рассасывается У сам нон происходит атрофия половых желез, приводящая к полной или частичной стерильности. К специфическим проявлениям недостаточности витамина Е относятся также мышечная дистрофия, жировая инфильтрация печени, дегенерация спинного мозга. Следствием дегенеративных и дистрофических изменений мышц является резкое ограничение подвижности животных; в мышцах резко снижается количество миозина, гликогена, калия, магния, фосфора и креатина и, наоборот, повышается содержание линидов и хлорида натрия.

Биологическая роль. Существует прямая связь между витамином Е и тканевым дыханием и обратная связь между этим витамином и степенью окисления липидов.

Как теперь стало известно, токоферолы выполняют в организме две главные метаболические функции. Они являются наиболее активными и возможно главными жирорастворимыми антиоксидангами, предохраняя от окисления полиненасыщенные жирные кислоты, и играют специфическую, пока еще не полностью раскрытую роль в обмене селена. Селен, как известно, является интегральной частью глутатион-пероксидазы, обеспечивающей защиту мембран от разрушающего действия пероксид-ных радикалов. Биологическая роль витамина Е сводится, таким образом, к предотвращению аутоокисления липидов биомембран и возможному снижению потребности в глутатионпероксидазе, необходимой для разрушения образующихся в клетке перекисей. Участие токоферолов в механизме переноса электронов и протонов, как и в регуляции процесса транскрипции генов, и их роль в метаболизме убихинонов пока недостаточно выяснены.[5] Токотриенолы и токолы имеют почти одинаковую структуру; отличаются тем, что первые содержат вместо полностью гидрированной ненасыщенную изопреноидиую боковую цепь.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Место проведения занятия, оснащение:

Условно можно считать, что отличительной особенностью витаминов, растворимых в воде, является участие-большинства из них в построении молекул коферментов, представляющих собой низкомолекулярные органические вещества небелковой природы, называемые также простетическими группами и принимающие вместе с белковым компонентом (апоферментом) непосредственное участие в каталитических реакциях. Коферментная роль с достоверностью доказана для следующих витаминов и витаминоподобных веществ: В1, В2, В6, В12, РР, биотина, фолиевой, парааминобензойной, пантотеновой и липоевой кислот, а также жирорастворимых коэнзима Р и пирролохинолипохмнона. Почти все они в организме человека и животных не синтезируются, поэтому недостаточное содержание или полное отсутствие этих витаминов в пище приводит к существенным нарушениям процессов обмена веществ и развитию соответствующего клинического синдрома, характерного для данного гипо- или авитаминоза.

Витамин В1

Витамин В1 (тиамин; антиневритный), как отмечалось, был первым кристаллическим витамином, выделенным К. Функом в 1912 г. Позже был осуществлен его химический синтез. Наряду с аминогруппой витамин В1 содержит атомы серы, поэтому он был назван тиамином. В химической структуре его содержатся два кольца - пиримидиновос и тиазоловое, соединенных метиленовой связью. Обе кольцевые системы синтезируются отдельно в виде фосфор ил ированных форм, затем объединяются через четвертичный атом азота.

Тиамин хорошо растворим в воде. Водные растворы тиамина в кислой среде выдерживают нагревание до высоких температур без снижения биологической активности. В нейтральной и особенно в щелочной среде шпамин В1, наоборот, быстро разрушается при нагревании. Этим объясняется частичное или даже полное разрушение тиамина при кулинарной обработке пищи, например выпечке теста с добавлением гидрокарбоната натрия или карбоната аммония. При окислении тиамина образуется тио-хром, дающий синюю флюоресценцию при УФ облучении. На этом свойстве тиамина основано его количественное определение.

Витамин В1 легко всасывается в кишечнике, но не накапливается в тканях и не обладает токсическими свойствами. Избыток пищевого тиамина быстро выводится с мочой. В превращении витамина В1в его активную форму - тиаминпирофосфат (ТЛФ), называемый также тиамин-дифосфатом (ТДФ), участвует специфический АТФ-зависимьш фермент тиамиыпирофосфокиназа, содержащаяся главным образом в печени и ткани мозга. Опытами с меченным 32Р АТФ доказан перенос на тиамин целиком пирофосфатной группы в присутствии фермента. ТПФ имеет следующее строение:

Приведенными примерами, вероятнее всего, не ограничиваются биологические функции тиамина. В частности. ТПФ участвует в окислительном декарбоксилировании глиоксиловой кислоты и а-кетокислот, образующихся при распаде аминокислот с разветвленной боковой цепью; в растениях ТПФ является эссенциальным кофактором при синтезе валина и лейцина в составе фермента ацетолактатсинтетазы.

Распространение в природе и суточная потребность. Витамин В1 широко распространен в природе. Основное количество его человек получает с растительной пищей. Много витамина В1 содержится в дрожжах, пшеничном хлебе из муки грубого помола, оболочке и зародышах семян хлебных злаков, сое, фасоли, горохе, меньше - в картофеле, моркови, капусте. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты витамином В1 печень, почки, мозг. Некоторые бактерии, населяющие кишечник животных, способны синтезировать достаточное количество тиамина: например, количества витамина В1, синтезированного микрофлорой кишечника коров, оказывается вполне достаточно для покрытия потребностей организма. Рекомендуемые Институтом питания РАМН нормы суточного потребления тиамина для отдельных групп населения составляют от 1,2 до 2,2 мг.

Витамин В2

Витамин В2 (рибофлавин) впервые был выделен из молока и ряда других пищевых продуктов. В зависимости от источника получения витамин В2 называли по-разному, хотя по существу это было одно и то же соединение: лактофлавин (из молока), гепатофлавин (из печени), овофлавин (из белка яиц), вердофлавин (из растений). Химический синтез витамина В2 был осуществлен в 1935 г. Р. Куном. Растворы витамина В2 имеют оранжево-желтую окраску и характеризуются желто-зеленой флюоресценцией.

В основе молекулы рибофлавина лежит гетероциклическое соединение изоаллоксазнп (сочетание бензольного, пиразинового и пиримидинового колец), к которому в положении 9 присоединен пятиатомный спирт риби-тол. Химическое название «рибофлавин» отражает наличие рибитола и желтой окраски препарата , рациональное название его 6,7-диметил-9-0-рибитилизоаллоксазин.

Рибофлавин хорошо растворим в воде, устойчив в кислых растворах, но легко разрушается в нейтральных и щелочных растворах. Он весьма чувствителен к видимому и

УФ-излучению и сравнительно легко подвергается обратимому восстановлению, присоединяя водород по месту двойных связей и превращаясь в бесцветную лейкоформу. Это свойство рибофлавина легко окисляться и восстанавливаться лежит в основе его биологического действия в клеточном метаболизме.

Клинические проявления недостаточности рибофлавина лучше всего изучены на экспериментальных животных. Помимо остановки роста, выпадения волос (алопеция), характерных для большинства авитаминозов, специфичными для авитаминоза В2 являются воспалительные процессы слизистой оболочки языка (глоссит), губ, особенно у углов рта, эпителия кожи и др. Наиболее характерны кератиты, воспалительные процессы и усиленная васкуляризация роговой оболочки, катаракта (помутнение хрусталика). При авитаминозе В2 у людей развиваются общая мышечная слабость и слабость сердечной мышцы.

Согласно данным К. Яги, существует прямая связь между степенью недостаточности рибофлавина у животных и накоплением в крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), развитием атеросклероза и катаракты. Эти нарушения, по мнению автора, указывают на важную роль флавопротеинов в молекулярных механизмах синтеза и распада продуктов ПОЛ.

Биологическая роль. Рибофлавин входит в состав флавиновых кофер-ментов, в частности ФМН и ФАД , являющихся в свою очередь просте-тическими группами ферментов ряда других сложных белков - флаво-протеинов. Некоторые флавопротеины в дополнение к ФМН или ФАД содержат еще прочно связанные неорганические ионы, в частности железо или молибден, наделенные способностью катализировать транспорт электронов. Различают 2 типа химических реакций, катализируемых этими ферментами. К первому относятся реакции, в которых фермент осуществляет прямое окисление с участием кислорода, т.е. дегидрирование (отщепление электронов и протонов) исходного субстрата или промежуточного метаболита. К ферментам этой группы относятся оксидазы а и в-аминокислот, глициноксидаза, альдегидоксидаза, ксантиноксидаза и др. Вторая группа реакций, катализируемых флавопротеинами, характеризуется переносом электронов и протонов не от исходного субстрата, а от восстановленных пиридиновых коферментов. Ферменты этой группы играют главную роль в биологическом окислении. В каталитическом цикле изоаллоксазиновый остаток ФАД или ФМН подвергается обратимому восстановлению с присоединением электронов и атомов водорода к N1 и N10. ФМН и ФАД прочно связываются с белковым компонентом, иногда даже ковалентно, как, например, в молекуле сукцинатдегидрогеназы.

Образование ФАД в тканях также протекает при участии специфического АТФ-зависимого фермента ФМН-аденилилтрансферазы. Исходным веществом для синтеза является ФМН:

ФМН + АТФ—* ФАД + Пирофосфат.

Распространение в природе и суточная потребность. Рибофлавин достаточно широко распространен в природе. Он содержится почти во всех животных тканях и растениях; сравнительно высокие концентрации его обнаружены в дрожжах. Из пищевых продуктов рибофлавином богаты хлеб (из муки грубого помола), семена злаков, яйца, молоко, мясо, свежие овощи и др.; в молоке он содержится в свободном состоянии, а в печени и почках животных прочно связан с белками в составе ФАД и ФМН. Из организма человека и животных рибофлавин выделяется с мочой в свободном виде. Суточная потребность взрослого человека в рибофлавине составляет 1,7 мг, в пожилом возрасте и при тяжелой физической работе эта потребность возрастает.

Витамин РР

Витамин РР (никотиновая кислота, никотинамид, ниацин) получил также название антипеллагрического витамина (от итал. ргеуепп'уе ре11а§га- предотвращающий пеллагру), поскольку его отсутствие является причиной заболевания, называемого пеллагрой.

Никотиновая кислота известна давно, однако только в 1937 г. она была выделена К. Эльвегеймом из экстракта печени и было показано, что введение никотиновой кислоты(или ее амида - никотинамида) либо препаратов печени предохраняет от развития

или излечивает от пеллагры. В 1904 г. А. Гарден и У. Юнг установили, что для превращения глюкозы в этанол в бесклеточном экстракте дрожжей необходимо присутствие легкодиализируемого кофактора, названного козимазой. Химический состав аналогичного кофактора из эритроцитов млекопитающих был расшифрован в 1934 г. О. Варбугом и У. Кристианом; он оказался производным амида никотиновой кислоты.

Никотиновая кислота представляет собой соединение пиридинового ряда, содержащее карбоксильную группу (никотинамид отличается наличием амидной группы).

Витамин РР малорастворим в воде (примерно 1%), но хорошо растворим в водных растворах щелочей. Никотиновая кислота кристаллизуется в виде белых игл.

Наиболее характерными признаками авитаминоза РР, т.е. пеллагры (от итал. ре11е а - шершавая кожа), являются поражения кожи (дерматиты), пищеварительного тракта (диарея) и нарушения нервной деятельности (деменция).

Дерматиты чаще всего симметричны и поражают те участки кожи, которые подвержены влиянию прямых солнечных лучей: тыльную поверхность кистей рук, шею, лицо; кожа становится красной, затем коричневой и шершавой. Поражения кишечника выражаются в развитии анорексии, тошнотой, болями в области живота, поносами. Диарея приводит к обезвоживанию организма. Слизистая оболочка толстой кишки сначала воспаляется, затем изъязвляется. Специфичными для пеллагры являются стоматиты, гингивиты, поражения языка со вздутием и трещинами. Поражения мозга проявляются головными болями, головокружением, повышенной раздражимостью, депрессией и другими симптомами, включая психозы, психоневрозы, галлюцинации и др. Симптомы пеллагры особенно резко выражены у больных с недостаточным белковым питанием. Установлено, что это объясняется недостатком триптофана, который является предшественником никотинамида, частично синтезируемого в тканях человека и животных, а также недостатком ряда других витаминов (пиридоксина).

Биологическая роль. Витамин РР входит в состав НАД или НАДФ, являющихся коферментами большого числа обратимо действующих в окислительно-восстановительных реакциях дегидрогеназ (формулы ко-ферментов приведены в главе 9).

Показано, что ряд дегидрогеназ использует только НАД и НАДФ (соответственно малатдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), другие могут катализировать окислительно-восстановительные реакции в присутствии любого из них (например, глутаматдегидрогеназа; см. главу 12). В процессе биологического окисления НАД и НАДФ выполняют роль промежуточных переносчиков электронов и протонов между окисляемым субстратом и флавиновыми ферментами (молекулярные механизмы участия пиридиновых нуклеотидов в этом процессе подробно рассматриваются в главе 9).

Распространение в природе и суточная потребность. Никотиновая кислота также относится к витаминам, широко распространенным в растительных и животных организмах. Для человека основными источниками никотиновой кислоты и ее амида являются рис, хлеб, картофель, мясо, печень, почки, морковь и другие продукты. Суточная потребность для взрослого человека составляет 18 мг.

Витамин В6

Витамин В6 (пиридоксип. антидерматитный) как самостоятельный независимый пищевой фактор был открыт П. Дьерди в 1934 г. в результате того, что в отличие от

известных к тому времени водорастворимых витаминов В1, В2и РР он устранял особую форму дерматита конечностей у крыс, названного акродинией. Впервые витамин В6 был выделен в 1938 г. из дрожжей и печени, а вскоре был синтезирован химически. Он оказался производным 3-оксипиридина, в частности 2-метил-3-окси-4,5-диоксиметилпиридином. Термином «витамин В6», по рекомендациям Международной комиссии по номенклатуре биологической химии, обозначают все три производных 3-оксипиридина, обладающих одинаковой витаминной активностью: пиридоксин (пиридоксол), пиридоксаль и пиридоксамин. Как видно, производные 3-оксипиридина отличаются друг от друга природой замещающей группы в положении 4 пиридинового ядра. Витамин В6 хорошо

растворим в воде и этаноле. Водные растворы весьма устойчивы по отношению к кислотам и щелочам, однако они чувствительны к влиянию света в нейтральной зоне pH среды.

Недостаточность витамина B6 наиболее подробно изучена на крысах, у которых самым характерным признаком является акродиния, или специфический дерматит с преимущественным поражением кожи лапок, хвоста, носа и ушей. Отмечаются повышенное шелушение кожи, выпадение шерсти, изъязвление кожи конечностей, заканчивающееся гангреной пальцев. Эти явления не поддаются лечению витамином PP, но быстро проходят при введении пиридоксина. При более глубоком авитаминозе B6 у собак, свиней, крыс и кур отмечаются эпилептиформные припадки с дегенертивными изменениями в ЦНС.

У человека недостаточность витамина B6 встречается реже, хотя некоторые пеллагроподобные дерматиты, не поддающиеся лечению никотиновой кислотой, легко проходят при введении пиридоксина. У детей грудного возраста описаны дерматиты, поражения нервной системы (включая эпилептиформные припадки), обусловленные недостаточным содержанием пиридоксина в искусственной пище. Недостаточность пиридоксина часто наблюдается у больных туберкулезом, которым с лечебной целью вводят изоникотинилгидразид (изониазид), оказавшийся, как и дезокси-пиридоксин, антагонистом витамина B6.

Из биохимических нарушений при недостаточности витамина B6 следует отметить гомоцистинурию и цистатионинурию, а также нарушения обмена триптофана, выражающиеся в повышении экскреции с мочой ксантуреновой кислоты и снижении количества экскретируемой кинуреновой кислоты (см. главу 12).

Биологическая роль. Оказалось, что, хотя все три производных 3-окси-пиридина наделены витаминными свойствами, коферментные функции выполняют только фосфорилированные производные пиридоксаля и пи-ридоксамина.

Фосфорилирование пиридоксаля и пиридоксамина является ферментативной реакцией, протекающей при участии специфических киназ. Синтез пиридоксальфосфата, например, катализирует пиридоксалькиназа, которая наиболее активна в ткани мозга. Эту реакцию можно представить следующим уравнением:

Пиридоксаль + АТФ->Пиридоксальфосфат + АДФ.

Доказано, что в животных тканях происходят взаимопревращения пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата, в частности в реакциях трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот.

Следует отметить, что в выяснение биологической роли витамина B6 и пиридоксальфосфата в азотистом обмене существенный вклад внесли А.Е. Браунштейн, СР. Мардашев, Э. Снелл, Д. Мецлер, А. Майстер и др. Известно более 20 пиридоксалевых ферментов, катализирующих ключевые реакции азотистого метаболизма во всех живых организмах. Так доказано, что пиридоксальфосфат является простетической группой аминотранс-фераз, катализирующих обратимый перенос аминогруппы (№12-группы) от аминокислот на а-кетокислоту, и декарбоксилаз аминокислот, осуществляющих необратимое отщепление CO2 от карбоксильной группы аминокислот с образованием биогенных аминов. Установлена кофер-ментная роль пиридоксальфосфата в ферментативных реакциях неокислительного дезаминирования серина и треонина, окисления триптофана, кинуренина, превращения серосодержащих аминокислот, взаимопревращения серина и глицина (см. главу 12), а также в синтезе 5-аминолевулиновой кислоты, являющейся предшественником молекулы гема гемоглобина, и др.

Пиридоксин относится к витаминам, коферментная роль которых изучена наиболее подробно. В последние годы число вновь открытых пиридокса-левых ферментов быстро увеличивалось. Так, для действия гликогенфос-форилазы существенной оказалась фосфорильная, а не альдегидная группа пиридоксальфосфата. Вследствие широкого участия пиридоксальфосфата в процессах обмена при недостаточности витамина B6 отмечаются разнообразные нарушения метаболизма аминокислот.

Распространение в природе и суточная потребность. Витамин В6 широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Основными источниками витамина В6 для человека служат хлеб, горох, фасоль, картофель, мясо, почки, печень и др. Во многих продуктах животного происхождения пиридоксин химически связан с белком, но в пищеварительном тракте под действием ферментов он легко освобождается. Суточная потребность в пиридоксине для человека точно не установлена, поскольку он синтезируется микрофлорой кишечника в количествах, частично покрывающих потребности в нем организма. Косвенные расчеты показывают, что взрослый человек должен получать в сутки около 2 мг витамина В6.

Биотин (витамин Н)

В 1916 г. в опытах на животных было показано токсичное действие сырого яичного белка; употребление печени или дрожжей снимало этот эффект. Фактор, предотвращающий развитие токсикоза, был назван витамином Н. Позже было установлено, что в дрожжевом экстракте печени и желтке куриного яйца содержится пищевой фактор, отличный от всех других известных к этому времени витаминов. Этот фактор стимулирует рост дрожжей и азотфиксирующих бактерий ШнгоЫшп, в связи с чем он и получил название «биотин» (от греч. Ыоз - жизнь), или коэнзим Я. В 1940 г. было установлено, что все три названия (биотин, витамин Н и коэнзим К) относятся к одному и тому же химически индивидуальному соединению. Выделенное из сырого яичного белка вещество оказалось гликопротеином - белком основного характера, названным авидином; этот белок обладает высоким сродством связывания с биотипом с образованием нерастворимого в воде комплекса. Комплекс не подвергается расщеплению в пищеварительном тракте, поэтому биотин не всасывается, хотя и содержится в пищевых продуктах.

Биотин был впервые выделен в 1935 г. из яичного желтка. Молекула биотина является циклическим производным мочевины, а боковая цепь представлена валериановой кислотой.

Карбонильная группа биотина связывается амидной связью с е-амино-группой лизина, образуя биотиниллизин (биоцитин), обладающий биологической активностью. Природные сложные белки, содержащие биотин, при попадании в организм подвергаются протеолизу с освобождением свободного биоцитина; последний подвергается гидролизу под действием биоцитиназы печени и сыворотки крови с образованием биотина и лизина.

Клинические проявления недостаточности биотина у человека изучены недостаточно. Это объясняется тем, что бактерии кишечника обладают способностью синтезировать биотин в необходимых количествах. Недостаточность его проявляется в случае употребления большого количества сырого яичного белка или приема сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, подавляющих рост бактерий в кишечнике. У человека при недостаточности биотина отмечаются воспалительные процессы кожи (дерматиты), сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желез, выпадением волос, поражением ногтей, часто отмечаются боли в мышцах, усталость, сонливость, депрессия, а также анорексия и анемия. Все эти явления обычно проходят через несколько дней после ежедневного введения биотина. У крыс недостаточность биотина, вызванная введением с пищей сырого яичного белка, вызывает явления острого дерматита, облысение и параличи.

Биологическая роль. Биотин подробно изучен благодаря работам Ф. Линена. Известные к настоящему времени биотиновые ферменты (т.е. ферменты, содержащие в качестве кофермента биотин) катализируют два типа реакций:

1) реакции карбоксилирования (с участием С02 или НСО3-), сопряженные с распадом АТФ

2) реакции транскарбоксилирования (протекающие без участия АТФ), при которых субстраты обмениваются карбоксильной группой

Получены доказательства двустадийного механизма этих реакций с образованием промежуточного комплекса (карбоксибиотинилфермент).

К реакциям первого типа относятся, например, ацетил-КоА- и пируват-карбоксилазные реакции.

Пируваткарбоксилаза является высокоспецифичным ферментом, катализирующим уникальную реакцию усвоения С02 в организме животных. Сущность реакции сводится к пополнению запасов оксалоацстата (щаве-левоуксусная кислота) в лимоннокислом цикле (так называемые «анаплеро-тические», «пополняющие» реакции), т.е. его синтезу из С02 и пирувата:

Реакция протекает в две стадии: на первой стадии, связанной с затратой энергии, СО2 подвергается активированию, т.е. ковалентному связыванию с биотином в активном центре фермента (Е-биотин)

Распространение в природе и суточная потребность. Биотин содержится почти во всех продуктах животного и растительного происхождения, главным образом в связанной форме. Богаты этим витамином печень, почки, молоко, желток яйца. В растительных продуктах (картофель, лук, томат, шпинат) биотин находится как в свободном, гак и в связанном состоянии. Для человека и животных важным источником является биотин, синтезируемый микрофлорой кишечника. Суточная потребность взрослого человека в биотине приблизительно 0,25 мг.

Фолиевая кислота

Фолиевая (птероилглутаминовая) кислота (фолацин) в зависимости от вида животных или штамма бактерий, нуждающихся для нормального роста в присутствии этого пищевого фактора, называлась по-разному: фактор роста Ь. сазец витамин М, необходимый для нормального кроветворения у обезьян; витамин Вс, фактор роста цыплят (индекс «с» от англ. сЫскеп — цыпленок). В 1941 г. фолиевая кислота была выделена из зеленых листьев растений, в связи с чем и получила свое окончательное название (от лат. гЫшт - лист). Еще до установления химического строения фолиевой кислоты было показано, что для роста некоторых бактерий необходимо присутствие в питательной среде парааминобензойной кислоты. Добавление структурных аналогов ее, в частности сульфаниламидных препаратов, наоборот, оказывало тормозящее действие на рост бактерий. В настоящее время установлено, что это ростстимулирующее действие парааминобен-зойной кислоты обусловлено включением ее в состав более сложно построенной молекулы фолиевой кислоты.

Фолиевая кислота состоит из трех структурных единиц: остатка 2-амино-4-окси-6-метилптеридина (I), парааминобензойной (II) и а-глутаминовой (III) кислот формильной группы) и т.д. (см. главы 12 и 13). Перечисленные вещества играют исключительно важную, ключевую, роль в биосинтезе белков и нуклеиновых кислот, поэтому становятся понятными те глубокие нарушения обмена, которые наблюдаются при недостаточности фолиевой кислоты.

В медицинской практике (в частности, в онкологии) нашли применение некоторые синтетические аналоги (антагонисты) фолиевой кислоты. Так, 4-аминоптерин используется в качестве препарата, тормозящего синтез нуклеиновых кислот, и рекомендуется в качестве лечебного препарата при опухолевых поражениях, в частности при острых и хронических формах лейкозов у детей и взрослых.

Распространение в природе и суточная потребность. Вещества, обладающие активностью фолиевой кислоты, широко распространены в природе. Богатыми источниками их являются зеленые листья растений и дрожжи. Эти вещества содержатся также в печени, почках, мясе и других продуктах. Многие микроорганизмы кишечника животных и человека синтезируют фолиевую кислоту в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей организма в этом витамине. Суточная потребность в свободной фолиевой кислоте для взрослого человека составляет 1-2 мг.

Витамин В12

Витамин В12 (кобаламип; антианемический витамин) выделен из печени в кристаллическом виде в 1948 г. Задолго до этого было известно, что в печени животных содержится особое вещество, регулирующее процесс кроветворения и оказывающее

лечебный эффект при пернициозной (злокачественной) анемии у людей. Однако только в 1955 г. Д. Ходжкин расшифровала его структуру, включая трехмерную пространственную конфигурацию, главным образом при помощи физических методов исследования рентгенографическая кристаллография). На основании этих данных, а также результатов изучения химического состава для витамина В12 было предложено следующее строение:

В молекуле витамина В12 центральный атом кобальта соединен с атомами азота четырех восстановленных пиррольных колец, образующих порфириноподобное корриновое ядро, и с атомом азота 5,6-диметил-бензимидазола . Кобальтсодержащая часть молекулы витамина представляет собой планарную (плоскостную) фигуру; по отношению к ней перпендикулярно расположен нуклеотидный лиганд, который, помимо 5,6-диметилбензимидазола, содержит рибозу и остаток фосфата у 3-го атома углерода. Вся структура получила название «кобаламин». Были получены производные витамина В12, содержащие ОН-группу (оксикобаламин), хлор (хлоркобаламин), Н20 (аквакобаламин) и азотистую кислоту (нитрито-кобаламин). Строение КоА расшифровал Ф. Линен. В основе структуры лежит остаток 3'-фосфоаденозин-5'-дифосфата (отличается от АТФ наличием у З'-гидроксила фосфатной группы), соединенный с остатком пантотеновой кислоты, карбонильная группа которой в свою очередь связана с остатком [3-меркаптоэтиламина (тиоэтиламина).

Реакционноспособным участком молекулы КоА в биохимических реакциях является 8Н-группа, поэтому принято сокращенное обозначение КоА в виде 8Н-КоА. О важнейшем значении КоА в обмене веществ (как будет показано далее - см. главы 9-11) свидетельствуют обязательное непосредственное участие его в основных биохимических процессах, окисление и биосинтез высших жирных кислот, окислительное декарбоксилирование а-кетокислот (пируват, а-кетоглутарат), биосинтез нейтральных жиров, фосфолипидов, стероидных гормонов, гема гемоглобина, ацетилхолина, гиппуровой кислоты и др.

Распространение в природе и суточная потребность. Уже отмечалось широкое, повсеместное распространение пантотеновой кислоты в природе. Основными пищевыми источниками ее для человека являются печень, яичный желток, дрожжи и зеленые части растений. Пантотеновая кислога синтезируется, кроме того, микрофлорой кишечника. Суточная потребность в пантотеновой кислоте для взрослого человека составляет 3-5 мг.

Витамин С

Витамин С (аскорбиновая кислота; антискорбутный витамин) получил название антискорбутного, антицинготного фактора, предохраняющего от развития цинги -болезни, принимавшей в средние века характер эпидемии. Причину болезни долго не могли распознать, и только в 1907-1912 гг. были получены неоспоримые экспериментальные доказательства (на морских свинках, также подверженных, подобно людям, заболеванию цингой) прямой зависимости между развитием цинги и недостаточностью или отсутствием в пище витамина С.

По химической структуре аскорбиновая кислота представляет собой лактон кислоты со структурой, близкой структуре Ь-глюкозы; окончательно строение витамина С было установлено после синтеза его из Ь-ксилозы. Аскорбиновая кислота относится к сильным кислотам; кислый характер ее обусловлен наличием двух обратимо диссоциирующих еноль-ных гидроксилов у 2-го и 3-го углеродных атомов.

Предполагают, что витамин С участвует в реакциях гидроксилирования пролина и лизина при синтезе коллагена, синтезе гормонов коры надпочечников (кортикос героидов), аминокислоты триптофана и, возможно, в других реакциях гидроксилирования. Имеются доказательства необходимости участия витамина С в окислительном распаде тирозина и гемоглобина в тканях.

Распространение в природе и суточная потребность. Витамин С относится к широко распространенным в природе витаминам. Наиболее важными источниками его для человека служат продукты растительного происхождения (овощи и фрукты). Много витамина С в перце, салате, капусте, хрене, укропе, ягодах рябины, черной смородины и

особенно в цитрусовых (лимон). Картофель также относится к основным повседневным источникам витамина С, хотя содержит его значительно меньше. Из непищевых источников богаты витамином С шиповник, хвоя, листья черной смородины, экстракты из которых могут полностью удовлетворить потребности организма. Суточная потребность в витамине С для человека составляет 75 мг. Рекомендованные рядом ученых (в том числе Л. Полингом) более высокие суточные дозы аскорбиновой кислоты (1 г) для человека, вероятнее всего, недостаточно обоснованны.

Витамин Р

Витамин Р (рутин, цитрин; витамин проницаемости) выделен в 1936 г. А. Сент-Дьердьи из кожуры лимона. Под термином «витамин Р», повышающим резистентность капилляров (от лат. регтеаЪНпу - проницаемость), объединяется группа веществ со сходной биологической активностью: катехины, халконы, дигидрохалконы, флавины, флавононы. изо-флавоны, флавонолы и др. Все они обладают Р-витаминной активностью, и в основе их структуры лежит дифенилпропановый углеродный «скелет» хромона или флавона. Этим объясняется их общее название «биофла-воноиды». Приводим структуру рутина, выделенного из листьев гречихи:

Рутин

При недостаточности биофлавоноидов или отсутствии их в пище у людей и морских свинок повышается проницаемость кровеносных сосудов, сопровождающаяся кровоизлияниями и кровотечениями; у людей отмечаются кроме того, общая слабость, быстрая утомляемость и боли в конечностях.

Биологическая роль. Биофлавоноиды стабилизируют основное вещество соединительной ткани путем ингибирования гиалуронидазы, что подтверждается данными о положительном влиянии Р-витаминных препаратов, как и аскорбиновой кислоты, в профилактике и лечении цинги, ревматизма, ожогов и др. Эти данные указывают на тесную функциональную связь витаминов С и Р в окислительно-восстановительных процессах организма, образующих единую систему. Об этом косвенно свидетельствует лечебный эффект, оказываемый комплексом витамина С и биофлавоноидов, названный аскорутином.

Основными источниками витамина Р для взрослого человека являются те же растительные продукты питания (в частности, овощи и фрукты), в которых содержится много витамина С. Витаминная промышленность выпускает ряд препаратов с Р-витаминной активностью: чайные катехины, рутин, кверцетин, гесперидин, нарингил и др. Суточная потребность в витамине Р не установлена.

Влияние витаминов на обмен веществ в тканях зуба и полости рта, их применение в стоматологии в качестве лекарственного средства.

Участие витаминов в процессах минерализации

ВитаминА влияет на скорость биосинтеза гликозаминогликанов – одного из органических компонентов дентина и цемента. Витамин А активирует синтез белков гликопротеинов и протеогликанов (структурные компоненты муцина – защитного белка слизистых оболочек, в т.ч. полости рта), обеспечивая процессы минерализации зуба; обеспечивает образование активной формы сульфатов (для синтеза хондроитинсульфатов). Гиповитаминоз А может иметь последствия: Угнетается активность одонтобластов и фибробластов. Нарушается кальцификация эмали и дентина Задерживается прорезывание зубов у детей, неправильное их развитие. Возникает сухость слизистых оболочек рта, трещины и эрозии в уголках губ, увеличивается риск инфекционных процессов. ВитаминА

используется в стоматологической практике как средство, ускоряющее эпителизацию эрозий, заживление повреждений слизистой оболочки ротовой полости.

Витамин С (аскорбиновая кислота) способствует созреванию коллагена через образование гидроксипролина. Витамин С является необходимым фактором в процессах гидроксилирования пролина и лизина в составе коллагена. Зрелый протеин способен связывать ионы кальция и фосфатов, формируя кристаллы гидроксиапатита. При гиповитаминозе С угнетается формирование кристаллов гидроксиапатитов, нарушается 21 процесс минерализации тканей зуба, усиливается деминерализация. Кроме того, зубы фиксируются периодонтальной связкой, которая образована коллагеновыми волокнами. Поэтому при цинге происходит расшатывание и выпадениезубов.Вследствие увеличения проницаемости и ломкости капилляров развиваются множественные точечные кровоизлияния (петехии), кровоточивость и воспаление десен.

Витамин Д усиливает всасывание кальция в кишечнике путем стимуляции Сатранспортного белка, таким образом регулирует процессы кальцификации тканей зуба. Из холестерола в коже под воздействием ультрафиолетовых лучей синтезируется провитамин D (кальцитриол). Гиповитаминоз Д в период формирования тканей зуба обусловливает неполноценную минерализацию,дефекты и кариес зубов. Витамин К. Недостаток витамина К угнетает образование Са – связывающегобелка(Кальпротеина), т. е. угнетается процесс минерализации тканей зуба. Витамин Е. Биологическое действие связано с его антиоксидантными свойствами, стабилизацией биологических мембран. Гиповитаминоз витамина Е вызывает уменьшение стойкости тканей зуба, увеличивает проницаемость капилляров дёсен.Витамин Е используется в лечении пародонтоза, эрозий и язв слизистой оболочки ротовой полости.

Витамин А (ретинол). При недостаточности витамина А возникает гипероороговение слизистых оболочек (гиперкератоз), снижается секреция слюнных желез, зубы "как мелом покрыты", угнетается синтез антител и фагоцитоз, уменьшается иммунитет. Поэтому витамин А широко применяют местно в комплексной терапии эрозивно-язвенных процессов, трещин, воспалительно-дистрофической формы пародонтита, заболеваний, сопровождающихся гиперкератозом (лейкоплакия, красный плоский лишай). При назначении препарата внутрь в дозах, превосходящих суточную потребность, необходимо помнить о возможности развития гипервитаминоза.

При этом наблюдается сухость и пигментация кожи, выпадение волос, ломкость ногтей, боли в области суставов и костей, диффузное утолщение костей, увеличение печени и селезенки, диспепсические явления.

Витамин D (эргокальциферол или витамин D_2) способствуют отложению кальция в костной ткани и дентине, препятствует резорбции костной ткани, способствует выведению свинца из организма. Прием препаратов витамина D в дозах, значительно превышающих суточную потребность в них, без рекомендации врача недопустим.

Длительное применение витамина D в повышенных дозах или использование его в ударных дозах может приводить к рассасыванию стромы костей, развитию остеопороза, деминерализации костей, увеличению синтеза мукополисахаридов в мягких тканях (сосуды, клапаны сердца и т.д.) с последующей их кальцификацией.

Витамин Е (токоферол). Учитывая антиоксидантную активность витамина Е, в стоматологической практике его применяют в комплексной терапии воспалительных, эрозивно-язвенных и рубцовых поражений слизистой оболочки полости рта, воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта и костной ткани.

Витамин К. В стоматологии при кровоточивости слизистой оболочки полости рта, генерализованном пародонтите и перед стоматологическими операциями у пациентов с

пониженной свертываемостью крови используется водорастворимый аналог витамина К - викасол.

Витамин B_1 (тиамин). Первые признаки гиповитаминоза B_1 в полости рта (жжение и боль в языке, нарушение вкуса, ухудшение трофики слизистой оболочки полости рта, гиперестезия, сухость во рту и жажда) обосновывают его применение в стоматологии при парестезии слизистой оболочки полости рта, глоссалгии, глоссите, невралгии, неврите тройничного и лицевого нервов, стоматите, гингивите, пародонтите, заболеваниях слизистой оболочки полости рта, множественном кариесе. Длительное применение больших доз витамина B_1 может привести к передозировке, сопровождающейся дискоординацией ферментных систем печени и ее жировой дистрофией, нарушением функции почек, повышением активности ацетилхолина, который играет важную роль в патогенезе аллергии.

Витамин B_2 (рибофлавин). При гиповитаминозе B_2 появляются трещины в углах рта (ангулярный хейлит), воспаление слизистой оболочки полости рта, атрофия сосочков языка. В стоматологической практике витамин B_2 применяется при длительно незаживающих трещинах губ, хейлите, генерализованной форме пародонтита, глоссите, гингивите, красной волчанке. Витамин B_2 хорошо переносится и не зарегистрировано отрицательных последствий даже при его использовании в повышенных дозах.

Витамин B_6 (пиридоксин). Первичного гиповитаминоза B_6 у человека в обычных условиях не наблюдается, при вызываемом искусственно у добровольцев он сопровождается заболеваниями слизистой оболочки полости рта, языка и губ, явлениями периферического неврита и снижением иммунобиологической реактивности. Применяется витамин B_6 в стоматологии при невралгии и неврите тройничного нерва, глоссалгии, гингивите, хейлите, десквамативном глоссите, пародонтите, красном плоском лишае, множественном кариесе. Витамин B_6 хорошо переносится, но иногда вызывает аллергические реакции.

Витамин B_{12} (цианокобаламин). При дефиците витамина B_{12} появляется сухость полости рта, возникает жжение и саднение языка, он становится ярко-красным, полированным, болезненным, атрофируются вкусовые сосочки.

В стоматологии витамин B_{12} применяется при изменениях в полости рта на фоне анемий, вызванных токсичными лекарственными препаратами, лучевой болезнью, в комплексной терапии глоссита, хейлита, пародонтита, афтозного стоматита, красного плоского лишая, глоссалгии, невралгии тройничного нерва.

Фолиевая кислота (витамин B_C). При дефиците фолиевой кислоты развивается глоссит, язвенный стоматит, ангулярный хейлит, гингивит. В стоматологической практике фолиевая кислота применяется при тяжелых заболеваниях слизистой оболочки полости рта для нормализации процессов регенерации. У детей большие дозы фолиевой кислоты иногда вызывают диспепсию, повышение возбудимости ЦНС, приводят к гипертрофии и гиперплазии эпителиальных клеток почек. Длительное применение больших доз фолиевой кислоты не рекомендуется из-за возможности снижения в крови концентрации витамина B_{12}.

Витамин РР (никотиновая кислота, никотинамид). Первые признаки гиповитаминоза РР нередко проявляются в полости рта: глоссит (темно-коричневый налет на спинке, края и кончик - красные), маргинальный гингивит, язвы на межзубных сосочках, стоматит, исчезновение сосочков языка, усиление секреции, трещины губ. Поэтому витамин РР применяется при стоматите, гингивите, глоссалгии, глоссите, пародонтите, красном плоском лишае, многоформной экссудативной эритеме, вялотекущих эрозивно-язвенных поражениях и грибковых поражениях слизистой оболочки полости рта, множественном кариесе.

Однако длительное применение больших доз витамина РР может вызвать жировую дистрофию печени и усилить симптомы B_1-витаминной недостаточности. При длительном

применении витамина РР рекомендуется одновременно вводить фолиевую кислоту и витамин B_{12}.

Витамин С (аскорбиновая кислота) необходима для синтеза дентина зубов, оссеина костей, образования проколлагена и перехода его в коллаген, основного вещества соединительной ткани, эндотелия сосудов, костной и соединительной ткани, способствует нормальному процессу регенерации и заживления ран и язв, повышает устойчивость организма к стрессу, инфекции и холоду, способствует выработке организмом антител и стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов.

При недостаточном поступлении в организм витамина С наблюдается увеличение проницаемости сосудистых стенок, отечность и кровоточивость десневых сосочков, они становятся синюшными, нередко отмечается изъязвление десневого края, расшатывание и выпадение зубов, слизистая оболочка щек становится отечной, появляются петехиальные высыпания и геморрагии в местах механического раздражения, нарушается целостность опорных тканей мезенхимального происхождения (фиброзной, хрящевой, костной и дентина).

В стоматологической практике витамин С применяется в комплексной терапии воспалительных, аллергических и инфекционных заболеваний слизистой оболочки полости рта, десен, губ, заболеваний пародонта, при множественном кариесе, плохо заживающих язвах, переломах челюстей.

При длительном применении больших доз витамина С возможно появление возбуждения ЦНС, беспокойства, бессонницы, чувства жара, угнетение функции инсулярного аппарата поджелудочной железы, появление сахара в моче, повышение артериального давления и свертываемости крови, у беременных женщин возможен выкидыш, образующаяся щавелевая кислота оказывает неблагоприятное действие на почки, увеличивается выведение из организма витамины B_{12}, B_6, и B_2.

Витамин Р (рутин) - фактор проницаемости участвует в окислительно-восстановительных процессах, тканевом дыхании, тормозит активность гиалуронидазы, снижает проницаемость и ломкость капилляров, усиливает действие адреналина и аскорбиновой кислоты. В стоматологии применяется при воспалительных и аллергических заболеваниях слизистой оболочки полости рта.

Пантотеновая кислота (витамин B_5). В стоматологии пантотеновая кислота применяется при заболеваниях слизистой оболочки полости рта и пародонта, парестезиях, неврите тройничного и лицевого нерва, аллергических реакциях.

Побочные эффекты (тошнота, рвота, изжога) возникают редко и исчезают самостоятельно.

Витамин B_{15} (пангамовая кислота). Применяется в стоматологии при заболеваниях слизистой оболочки полости рта и пародонта на фоне атеросклероза.

Зная, какое влияние на обменные процессы оказывают различные витамины и что наблюдается при их сочетанном применении, врач может подобрать рациональные поливитаминные комплексы для каждого пациента и повысить эффективность комплексной терапии многих заболеваний челюстно-лицевой области.

ТЕМА: ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Введение в обмен веществ

Состав пищи человека

Пищевой рацион человека состоит из органических и минеральных веществ. К органическим компонентам пищи относятся белки, углеводы и липиды и составляют основных компонентов.

К минеральным компонентам относятся катионы и анионы различных солей и микроэлементов.

Различают также минорные компоненты. К ним относятся наряду с микроэлементами витамины.

Белки пищи содержат заменимые и незаменимые аминокислоты и выполняют пластическую функцию. Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме и недостаток или отсутствие их в пище приводит к отрицать азотистому балансу и различным заболеваниям. Полноценные белки должны содержать в достаточном количестве всех незаменимых аминокислот и хорошо перевариваются в пищеварительном тракте. К таким белкам относятся белки мяса, яйца птиц, рыб, молоко и другие. К неполноценным белкам, которые мало содержат незаменимые аминокислоты и плохо перевариваются относятся растительные белки и структурные белки.

В качестве эталона полноценного белка принят белок куриного яйца.

Норма белка в пищи для взрослых людей умственного труда равен 80 – 100гр белка. Людям физического труда назначают дополнительно по 10 гр белка на каждые 500 ккал затрачиваемой энергии. Норма белка в жарком климате несколько выше чем в умеренном климате.

Углеводы (крахмал, сахароза, глюкоза, лактоза) играют энергетическую роль. Суточная потребность 400 – 500 гр крахмала.

Липиды: тглицериды, фосфолипиды, холестерин играют энергетическую роль и участвуют в строении клеточных мембран. Суточная потребность 80 – 100гр.

Незаменимые компоненты пищи

К ним относятся:

1. незаменимые аминокислоты: три, лей, илей, вал, тре, лиз, мет, фен. Условно незаменимыми является арг и Гис, в ткани частично синтезируются
2. полиненасыщенные жирные кислоты: линолевая ($C_{18:2}$), линоленовая ($C_{18:3}$) и арахидоновая ($C_{20:4}$) кислоты.

Витамины

Они обеспечивают нормальное течение биолгических и физиологических функций организма. Они не синтезируются в организме, отсуствие или недостаток их в пище приводит к авитаминозном заболеваниям. Различают алиментарные авитаминозы, которые развиваются в результате отсутствия витамина в пище и вторичные авитаминозы, которые развиваются при плохом усвояемости витамина в желудочно-кишечном тракте.

Витамины называются заглавными латинскими буквами или по имени того заболевания, которое развивается при отсутствии в пище витамина или называется химическими названиями.

Витамины классифицируются по растворимости в воде или жирах или по физиологическому действию.

По растворимости витамины делятся на два класса (М.И.Смирнов, 1974)

1. витамины растворимые в жирах: A D E K
2. витамины растворимые в воде: B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_{12}, C, P и др.

По физиологическому действию витамины можно делить на следующие группы (П.И.Шилов и др 1960)

1. витамины повышающие общую резистентность орг-ма : B_1, B_2 PP A C
2. антигеморрагические: C, P, K
3. антианемические: B_{12}, фолиевая кислота и C
4. антиинфекционные: A, C
5. регуляторы зрения: A, B_2, C.

Функция витаминов наряду с перечисленными физиологическими эффектами заключается в выполнении каталитической функции, так как они входят в состав коферментов (коферментная функция).

Минеральные вещества и микроэлементы

В составе пищи человек получает Na, K, Ca, Fe, Cl, P и др минер веществава, а также микроэлементы: медь, железо, кобальт, фтор, йод и др.

К региональным патологиям, связанным с недостатком микроэлементов относится эндемический зоб (при недостатке соддержания солей йода в пище и воде), при котором увеличивается зобная железа путём перерождения. Относится также кариес зубов, который развиваетя в результате недостатка фтора в воде и пищи.

Строение клеточных мембран

В 1890 году Пфеффер сформулировал понятие клеточной или плазматической мембраны, окружающей всю клетку и создающей преграду с изменчивой проницаемостью (так называемый барьер проницаемости) – преграду, регулирующею поступление в клетку и выход из неё воды, солей и метаболитов.

Начиная с 1955года выяснился новый важный факт: в клетке содержатся системы внутренних субмикроскопических мембран – цитомембран, разделяющих клетку на камеры, очень различные по форме, объёму и содержимому. К этой системе цитомембран относятся: мембран митохондрии, ЭПТ сети, аппарата Гольджи лизосом, вакуолей, ядерных мембран. В определенных тканях и клетках существуют миелиновые мембраны, синаптические мембраны, мембраны эритроцитов, светочувствительных клеток и др.

Липидный состав мембран и строение липидного бислоя

Клетки окружены плазматической мембраной. Мембрана как стена отделяет клетку от окружающей среды. Каждый субклеточный органоид также изолирован мембраной.

Все мембраны построены из:

Липидов, белков 40-75%, углеводов 10%.

В состав мембран входят следующие липиды:

1. Глицерофосфолипиды : ФЭ, ФС, ФИ, кардиолипин, ФХ (лецитины)
2. Сфингофосфолипиды: сфингомиелин, церебразид
3. Холестерин и его эфиры

Липиды в самопроизвольно образуют двойные липидные слои – липидный бислой, который образуется путём определённого расположения молекул липидов.

Белки мембран

Различают 3 группы белков:

1. белки ферменты
2. рецепторные белки
3. структурные (неактивные) белки

- они обединяясь с липидами образует липопротеины.

В зависимости от местоположения в мембране белки разделяют 2 группы:

1. периферические белки – расположенные на поверхности мембран. Слабо связаны с мембраной - цитохром ц , спектрин , МАО.
2. внутренные белки: ферменты , антигены, транспортные белки, рецепторные белки, гликопротеины.

Прочно связаны с мембраной и взаимодействуют с мембранными липидами. Основная часть погружена в липидный бислой.

Углевод – белковые компоненты

1. гликопротеины
2. гликолипиды

В состав их входят следующие моносахариды:

N – ацетилглюкозамин

N - ацетилгалактозамин

N – ацетилнейраминовая кислота (сиаловая кислота)

Их всего 9 углеводов. Они связаны с белковой частью через ОН группы серина, оксилизина, оксипролина, треонина и др. Различают

1. периферические
2. интегральные гликопротеиды

Из них 1 легко экстрагируются из плазматической мембраны водными не содержащими ПАВ растворителями, в то время как интегральные гликопротеиды более тесно связаны с мембраной и легко могут быть солюбилизированы с помошью ПАВ, которые разрушают липидный бислой.

В настоящее время предложены несколько моделей биомембран:

- Бутербродная модель Даниели и Давсона (1931). Липидный бислой расположен между ломтя белками.
- Модель липопротеинного ковра. Молекулы липидов и белков переплетены в липопротеидный ковер.
- Мозаичная модель мембраны и др. Мембрана состоит из липидного бислоя в которым вкраплены молекулы белков. В настоящее время отсутствуют удовлетворительно объясняющая модель мембраны.

Общие свойства мембран

a) Жидкостность.

Мембраны являются подвижными и гибкими, что позволяет растягиваться, отделяться, сливаться друг с другом. Находится постоянно в движении, сворачиваться, образовать сферическую структуру клетки, могут сливаться друг с другом.

Структурный переход внутрь мембран играет роль триггерного механизма. Переключение клетки из одного метаболического состояния в другое. При этом изменяется липидный и белковый состав.

b) Поперечная ассиметрия

Наружная и внутренняя стороны имеют различный состав липидов и белков. Глюкопротеиды находятся на наружной стороне. На внутренней стороне находятся ферменты. Наружная поверхность мембран обогащена холинфосфотидами, а внутренняя – аминофосфатидами (ФЭ, ФС, и др.).

c) Избирательная проницаемость

Они очень четко регулируют поступление различных веществ в клетку и выход их из неё.

Мембранный транспорт осуществляется следующими путями:
- пассивный транспорт
- активный транспорт

1. пассивный транспорт осуществляется путем диффузии: физической, облегченной и обменной диффузии.

В мембранах имеются «вороты» или поры, каналы, образованные из гидрофильных веществ или белков.

При облегченной диффузии участвуют специальные белковые переносчики, которые встраиваются в мембрану, образуя канал или выполняютчелночную функцию. При изменении конформации этих белков переносчиков открываются каналы или ворота в мембране. Не требуют затраты АТФ. Так осушвляется вход глюкозы в гепатоциты, эритроциты, мыщечные к-ки.

2. активный транспорт

Клеточные мембраны действуют подобно насосу и перекачивает вещество против градиента концентрации. Это явление называется активным транспортом.

В настоящее время хорошо изучены: калий – натриевый насос и кальциевый насос.

1ый насос выкачивает из клетки Na и накачивает ионы K.

2ой – накачивает ионы Ca в клетку.

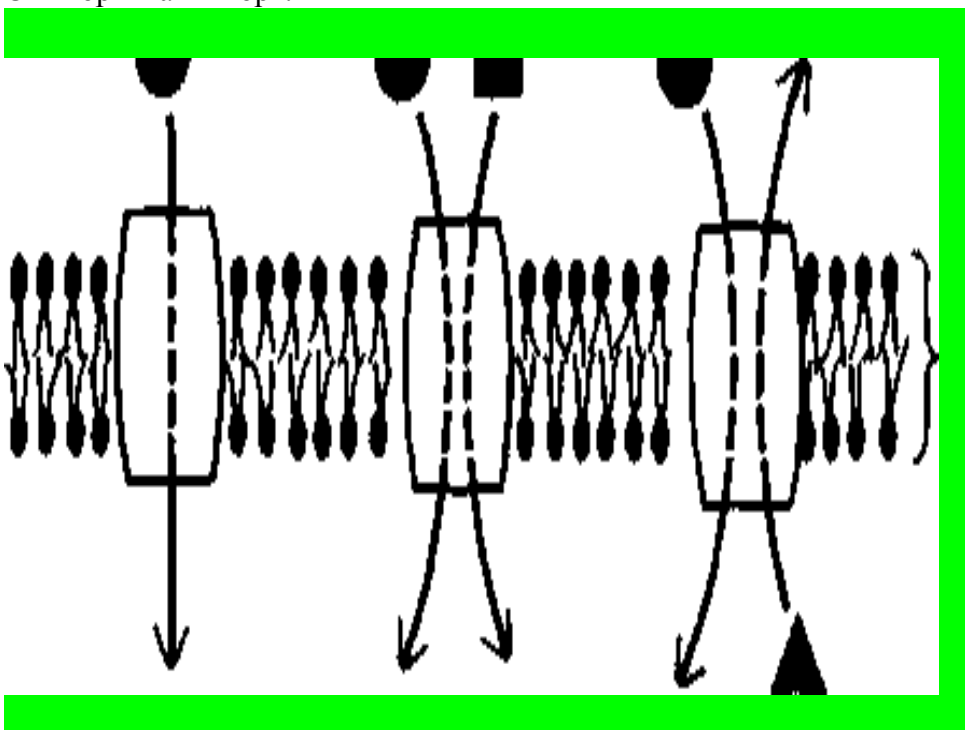
Молекулярной машиной насоса является фермент натрий-калий зависимая АТФаза, магний зависимая АТФаза, источником энергии насоса является АТФ.

Фермент пространственно ассимметричен, т.е. он стимулируется внеклеточным K^+ и внутриклеточным Na^+, добавка только Na^+ или только K^+ не влияет на ферментативную активность. При присутствии обоих ионов гидролиз АТФ заметно ускоряется.

Na^+ K^+ АТФаза имеет мол. массу ≈ 250000. Состоит из каталитической и гликопротеидной субъединицы. При гидролизе АТФ каталитическая субъединица

фосфорилируется. Она имеет место связывания для Na^+ K^+ и уабаина (сердечного гликозида) ингибирующего активный транспорт Na^+ K^+ во многих клетках. Предпологается: большая субъединица простирается через всю толщу клеточной мембраны, причём место связывания K^+ оказывются на наружной поверхности мембраны, а Na^+ и АТФ – на внутренней. Сахара гликопротеидной субъединицы представлены сиаловой кислотой, фруктозой, N-ацетилглюкозамином и лактозой.

Симпорт и антипорт.



Активный перенос веществ через мембраны осуществляется за счет энергии градиента концентрации другого вещества. Переносчик имеет специфические центры связывания для обоих веществ. Если концентрация X вещества снаружи больше, чем внутри оно может перемещаться путём облегченной диффузии. Переносчик имеет центр связывания и для веществ у которых переносятся попутно с веществом X. Это называется симпортом.

Антипорт – перемещение вещества против градиента концентрации в направлении противоположном перемещаюшего другого вещества по его градиенту концентрации.

Симпорт и антипорт может происходит за счет энергии градиента концентрации ионов Na^+ создаваемого Na K АТФазы (н-р, всасывание аминокислот из кишечника, глюкозы из первичной мочи).

Поступление К в клетку приводит к созданию разности потенциалов необходимая для передачи импульсов и сокращающие мышцы. Поступление ионов Са запускает многочисленные внутриклеточные процессы. Н-р, является сигналом для сокрашения мышц, деления клетки, движение клеточной мембраной, секреции и др.

Разнообразие мембранных структур. Начиная с 1955г установлено, что в клетке содержатся мембраны субклеточных органоидов – цитомембраны, которые разделяют клетки на отсеки (камеры). К этим цитомембранам относятся: мембраны МХ, ЭР, аппарата гольджи, лизосом, ядра.

Плазматическая мембрана. Она в определенных участках гладкая, в других покрыта микроворсинками. Плазматические мембраны обладают:

- системой рецепторов белковой природы, которые улавливают изменение окружающей среды, вызывает ответные реакции, которые приводит к изменению проницаемости мембран

Эффект многих гормонов осуществляется через специфических рецепторов. Эти гормоны активируют связанную с рецепторами фермента аденилатциклазу. Одни гормоны стимулируют активность аденилатциклазы, другие подавляют.

Рецепторы обеспечивают эффективность контроля внутриклеточных процессов при участии вторичных посредников (первичный посредник – гормон, вторичный посредник – цАМФ и др).

Межклеточные контакты. В клеточной мембране имеются участки обеспечивающие контакты с другими клетками. В этих участках имеются низкое электрическое сопротивление, более высокая проводимость (в10000 раз) по сравнению с остальными поверхностями. На поверхности плазм мембраны имеются особые «узнающие» участки. В этих участках содержатся гликопротеины и гликолипиды с углеводной детерминантной группой. Эти участки обеспечивают ответную реакцию клетки. Например, выработки антител на чужеродные клетки.

В межклеточных контактах важную роль играет заряд клеточной мембраны

Эндоцитоз и экзоцитоз

Клеточные мембраны обладают свойствами эндоцитоза и экзоцитоза.

Эндоцитоз – многие клетки могут пожирать чужие клетки, инородные тела, макромолекулы, жировые капли из окружающей среды. Это явление называют также пиноцитозом или фагацитозом.

Вещества попавшее в клетку путём эндоцитоза в конечном счете попадает в лизосомы и расщепляются ферментами лизосом.

Экзоцитоз – выделение секрета из клетки. Многие клетки секретируют макромолекулы на экспорт.

Например, секреция синтезируемых белков: синтез белков происходит в рибосомах ЭПС, затем синтезированные белки передаются в цистерны комплекса Гольджи. Здесь они подвергаются химической модификации (присоединению углеводных остатков, сульфатных групп и т.д.) и упаковываются в особые гранулы, эти гранулы хранятся некоторое время в цитоплазме вблизи плазматической мембраны. Экзоцитоз происходит в результате внутриклеточного сокращения, связанного с микротрубочками и микрофиламентами.

Мембраны митохондрии

Каждый гепатоцит содержит 1000-2000 митохондрии. Различают наружную и внутреннюю мембрану митохондрии.

Наружная мембрана гладкая, а внутренняя мембрана образует многочисленные складки (кристы) и отделена от наружной водным пространством.

В наружной мембране локализованы ферменты свободного окисления, а во внутренней мембране – ферменты тканевого дыхания с окислительным фосфорилированием
(дыхательная цень или ЦПЭ). ЦПЭ это окислительный конвейр – обеспечивающий перенос электронов, при котором возникает разность редокс потенциалов в разных участках цепи. Данная электрическая энергии трансформируются в метаболическую энергию АТФ. К числу ферментов дыхательной цепи относятся:

НАД, НАДФ-зависимые дегидрогенады, ФМН, ФАД-зависимые дегидрогеназы, цитохромы.

Внутренняя мембрана относятся к сопрегающим мембранам – сопрегает процессы окисления субстрата с фосфорилированием.

Наружная мембрана митохондрий содержит цитохром $в_5$, моноаминооксидазы и др. ферменты.

Мембрана клеточного ядра

Обеспечивает хранение генетического материала (хроматин). Она состоит из 2х мембран. Имеет поры, через которые проходят молекула ДНК (и РНК).

Мембрана клеточного ядра обеспечивает энергией внутриядерных процессов.

Мембрана служит передатчиком информации между ядром и остальными частями клетки.

Наружная мембрана усеяна рибосомами и составляет часть единой системы ЭПР. Это имеет большое значение для регуляции процесса синтеза макромолекул.

и незаменимые аминокислоты и выполняют пластическую функцию. Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме и недостаток или отсутствие их в пище

приводит к отрицать азотистому балансу и различным заболеваниям. Полноценные белки должны содержать в достаточном количестве всех незаменимых аминокислот и хорошо перевариваются в пищеварительном тракте. К таким белкам относятся белки мяса, яйца птиц, рыб, молоко и другие. К неполноценным белкам, которые мало содержат незаменимые аминокислоты и плохо перевариваются относятся растительные белки и структурные белки.

В качестве эталона полноценного белка принят белок куриного яйца.

Норма белка в пищи для взрослых людей умственного труда равен 80 – 100гр белка. Людям физического труда назначают дополнительно по 10 гр белка на каждые 500 ккал затрачиваемой энергии. Норма белка в жарком климате несколько выше чем в умеренном климате.

Углеводы (крахмал, сахароза, глюкоза, лактоза) играют энергетическую роль. Суточная потребность 400 – 500 гр крахмала.

Липиды: тглицериды, фосфолипиды, холестерин играют энергетическую роль и участвуют в строении клеточных мембран. Суточная потребность 80 – 100гр.

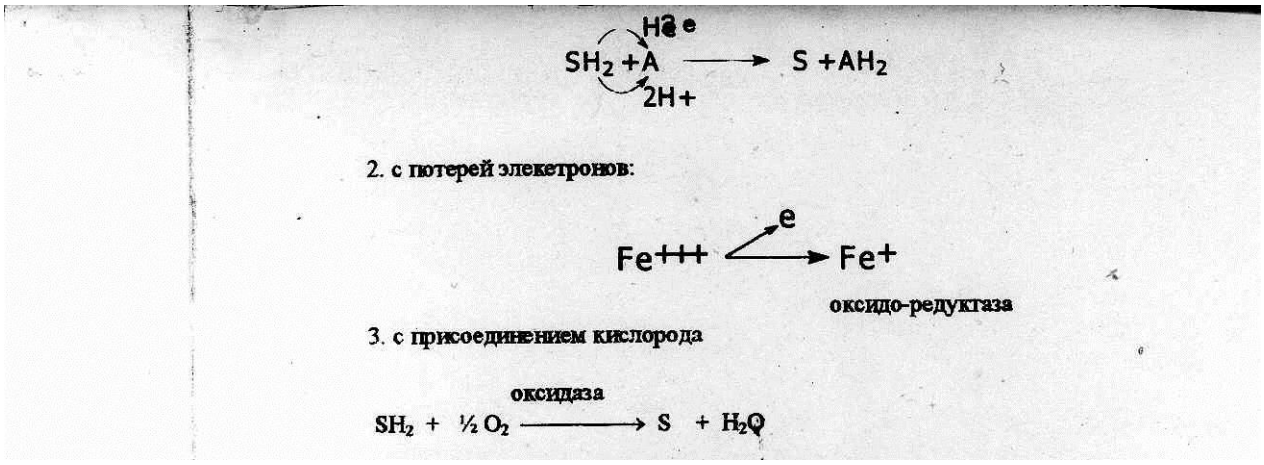
БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ.

Катаболизм органических веществ в тканях сопровождается потреблением кислорода и выделением CO2. Этот процесс называется тканевым дыханием. Кислород в этом процессе используется как акцептор водорода от окисляемых (дегидрируемых) веществ (субстратов), в результате чего синтезируется вода. Процесс окисления можно представить следующим уравнением: SH2 +1/2 O2 → S+ H2O. Окисляемые различные органические вещества (S субстраты), представляют собой метаболиты катаболизма, их дегидрирование является экзоргическим процессом. Энергия, освобождающаяся в ходе реакций окисления, либо полностью рассеивается в виде тепла, либо частично тратится на фосфорилирование ADP в энергию макроэргических связейATP. Большинство организмов в биосфере использует этот способ или очень сходный с ним (в качестве терминального акцептора водорода может быть не кислород, а другое соединение) как основной источник энергии, необходимый для синтеза внутриклеточной ATP. Таким путем клетка превращает химическую энергию питательных веществ, поступивших из вне, в утилизируемую метаболическую энергию. Реакция дегидрирования и способ превращения выделившейся энергии путем синтеза ATP – это энергетически сопряженные реакции. Целиком весь сопряженный процесс называется окислительным фосфорилированием ADP:

Реакции биологического окисления катализируются ферментами.

Окисление может быть связано:

1.с отцеплением водорода от окисляемого субстрата (дегидрирование)

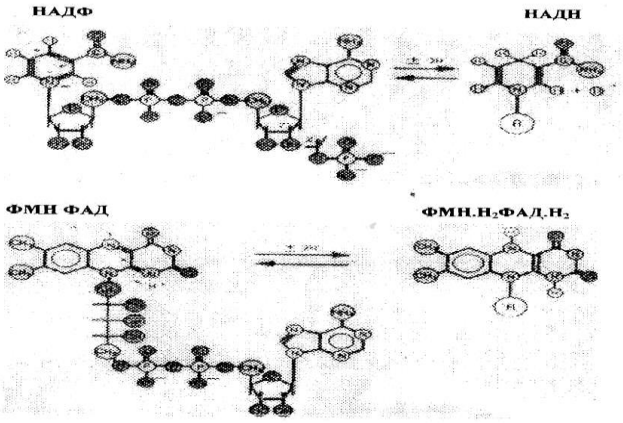


Все три типа реакций имеют место в живой клетке.

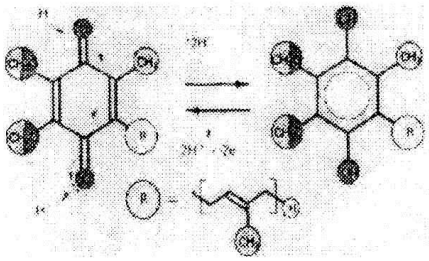
Наиболее распространенным типом биологического окисления является дегидрирование субстратов под влиянием ферментов дегидрогеназ. К ним относятся никотинамид зависимые ($НАД^+$) дегидрогеназы, где акцептором отщепляемого от субстратов водорода служат $НАД^+$ и $НАДФ^+$ и флавинзависимые дегидрогеназы, где акцептором водорода служат ФМН и ФАД.

Водород используется как главное топливо для образования энергии. В митохондриях поток электронов от водорода устремляется к их конечному акцептору – кислороду. При этом образуется молекула воды – которая является конечным продуктом тканевого дыхания.

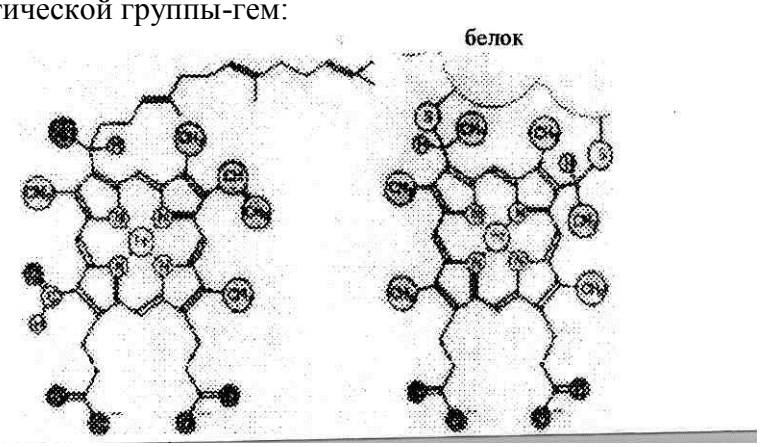
Ферменты дыхательной цепи.
Коферменты дегидрогеназ.



Убихинон (Кофермент Q) – производное изопрена:



Цитохромы – это гемопротеины – белки, содержащие в качестве прочно связанной простетической группы-гем:



Простетическая группа гемма в структуре цитохромов.

Следовательно, дегидрирование субстратов и окисление водорода с образованием воды является источником энергии.

На современном этапе известно, что тканевое дыхание представляет собой полиферментную цепь переноса электронов и протонов от субстрата к кислороду. Эта цепь переносчиков называется ЦПЭ или дыхательной цепью.

ДЦ – это конвейер по переносу протонов и электронов от НАДН2 и ФАДН2 к кислороду.

Символ $2H^+$ означает два электрона и два протона, обычно переносимые в виде гидрид иона. В этом случае вместо терминов «донор электронов» и «акцептор электронов» иногда используют термины «донор или акцептор водорода». ФАД – зависимая дегидрогеназа также выполняет функцию первичной дегидрогеназы. Коферментом является ФАД, который является акцептором водорода от субстрата. НАДН – дегидрогеназа катализирует окисление НАДН и восстановление убихинона (CoQ). Переносчиком водорода является кофермент - ФМН (комплекс 1). В процессе реакции водород сначала присоединяется к ФМН, соединенному с ферментом, а затем передается на убихинон. Флавиновые коферменты (ФАД и ФМН) прочно связаны с ферментом как простатические группы, поэтому ферменты, в состав которых они входят, называются флавопротеины. Флавинмононуклеотид (ФМН), или рибофлавин фосфат, неразрывно связан с белковой частью фермента. Строго говоря, ФМН не является нуклеотидом, так как флавиновая часть связана с рибитолом, а не с рибозой.

Название «убихинон» возникло из-за его повсеместной распространенности в природе. Кофермент Q действует как переносчик электронов на цитохромы

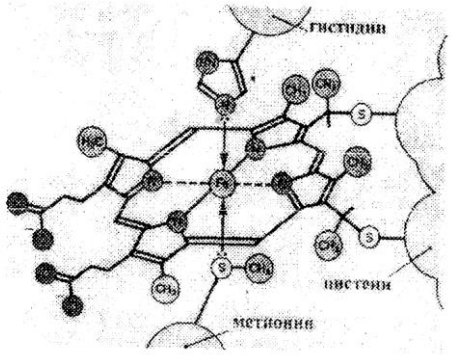
Атом железа в геме может менять валентность, присоединяя или отдавая электроны

$+e^-$

$Fe^{3+} \leftrightarrow Fe^{2+}$

$-e^-$

В дыхательной цепи цитохромы служат переносчиками электронов и располагаются соответственно величине окислительно-восстановительного потенциала следующим образом : B, C1, C, a, a_3. Гемовые группы цитохромов связаны с белковой частью донорно-акцепторными связями между ионом железа и соответствующими аминокислотными остатками:



Связывание гема с белковой частью цитохрома С.

В цитохромах С и С1 , дополнительные ковалентные связи формируются между тиогруппами цистеина и боковыми винильными группами гемма. $QH2^-$ дегидрогеназа (комплекс III) представляет собой комплекс цитохромов b и С1. Этот фермент катализирует окисление восстановленного кофермента Q и перенос электронов на цитохром С.Электроны последовательно переносятся атомами железа цитохромов b и С1, а затем поступают на цитохром С. Протоны после окисления QH2 освобождаются в раствор.

Цитохромоксидаза включает комплекс цитохромов **а** и $\mathbf{a_3}$ (комплекс IV). Цитохромоксидаза кроме гема содержит ионы меди, которые способны менять валентность и таким способом участвовать в переносе электронов:

$+e^-$

$Cu^{2+} \leftrightarrow Cu^+$

$-e^-$

Цитохромоксидаза переносит электроны с цитохрома С на кислород. В переносе электронов участвуют сначала ионы железа цитохромов **а** и $\mathbf{a_3}$, а затем ион меди цитохрома $\mathbf{a_3}$. Молекула кислорода связывается с железом в геме цитохрома $\mathbf{a_3}$. Следовательно, переход электронов на кислород с иона меди цитохрома $\mathbf{a_3}$, происходит на молекуле

фермента**.** Каждый из атомов молекулы кислорода присоединяет по два электрона и протона, образуя при этом молекулу воды.

Белки, содержащие негеминовое железо. Некоторое количество атомов железа в митохондриях связано не в геме цитохромов , а образуют комплексы с другими белками. Эти белки называют также железосерными, так как атомы железа связаны с атомами серы цистеиновых остатков. Белки**,** содержащие негеминовое железо, участвуют в переносе электронов на нескольких стадиях, однако, не совсем ясны их локализация и механизм действия.

Дегидногеназы и первичные акцепторы водорода.

1.НАД-зависимые ДГ, известно >150 НАД зависимых ДГ (напр. ЛДГ, ПДГ).

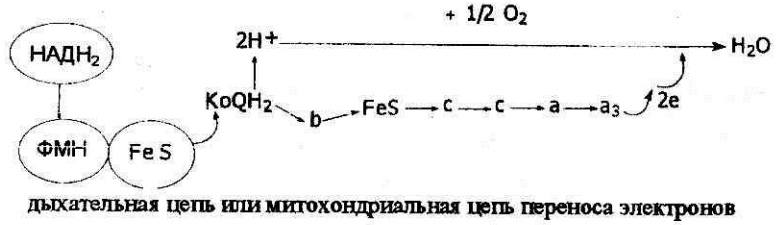
2.Флавин зависимые ДГ, (Фад зависимая ДГ→СДГ; ФМН-зависимая ДГ→НАДН - ДГ).

3.Железосерные белки, содержат негеминовое железо.

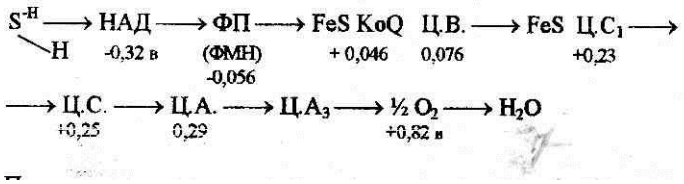
Участвуют в переносе электронов и протонов в двух участках ДЦ; между ФП и КоА и между цит в и с1.

4.Кофермент Q2 или убихинон (структурный аналог витамина К, филлохинона).

5.Цитохромы: в,c_1,с,а, $\mathbf{a_3}$, - простетическая группа – **железопорфириновое ядро.**

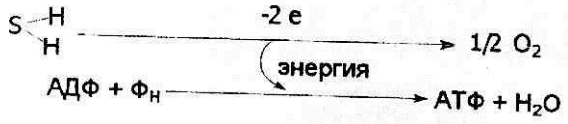


дыхательная цепь или митохондриальная цепь переноса электронов



Процессы окисления сопряженные с процессом фосфолирования. В результате этого синтезируется АТФ.

Важная роль внутренней имембраны МХ состоит в том, что она связывает (или сопрягает) процесс переноса электронов и фосфорлирования.



Направление переноса электронов и процессов определяют окислительно-восстановительным потенциалом (редокс-потенциалы), а именно от НАДН2 (Е0 = -0,32V) к кислороду (Е0=+0,81V).

Зная редокс-потенциал окислительно-восстановительных пар, можно рассчитать выход свободной энергии при переносе электронов по уравнению: □G =nF □E, где □ G – количество свободной энергии.

h-число электронов (2)

F-постоянная фарадея (95 кДж)

□E-разность потенциалов.

Для синтеза одной макроэргической связи АТФ требуется 40 кДж/моль энергии, при этом перепад редокс-потенциалов составляет:

$$\triangle E = \frac{\triangle G}{n \cdot F} = \frac{40}{2 \cdot 95} = 0{,}22\ v$$

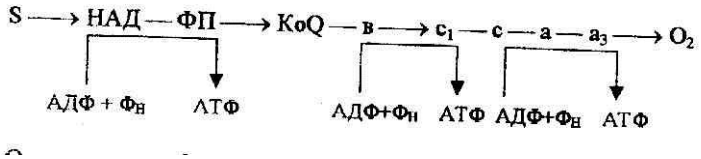
Ферменты ДЦ локализованы во внутренней мембране МХ, в кристах МХ. Установлено, что в ДЦ есть 3 участка, на которых происходит образование молекул АТФ.

В этих участках разность потенциалов выше 0,16V, которой вполне достаточно для синтеза одной молекулы АТФ.

1-ая молекула АТФ образуется при переносе пары электронов от восстановленных НАД на ФФ (флав.ферменты) или ФП.

2-ая молекула между ц.в. и ц.с.

3-ая между ц.с. и ЦХО (**aa_3**)



Окислительное фосфорилирование- ферментивное превращение АДФ в АТФ, сопряженное с переносом электронов от субстрата к молекулярному кислороду.

Биологическое окисление.

Катаболизм органических веществ в тканях сопровождается потреблением кислорода и выделением углекислого газа. Этот процесс называют тканевым дыханием. Кислород в этом процессе используется как акцептор водорода от окисляемых (дегидрируемых) веществ (субстратов), в результате чего синтезируется вода. Процесс **окисления** можно представить следующим уравнением: $SH_2 + 1/2O_2 \rightarrow S + H_2O$. Окисляемые различные органические вещества (S-субстраты), представляют собой метаболиты катаболизма, их дегидрирование является **экзоргическим** процессом. Энергия, освобождающаяся в ходе реакций окисления, либо полностью рассеивается в виде тепла, либо частично тратится на фосфорилирование ADP энергию макроэргических связей ATP. Большинство организмов в биосфере использует этот способ или очень сходный с ним(в качестве терминального акцептора водорода может быть не кислород, а другое соединение) как основной источник энергии, необходимый для синтеза внутриклеточной ATP. Таким путём клетка превращает химическую энергию питательных веществ, поступивших извне, в утилизируемую метаболическую энергию. Реакция дегидрирования и способ превращения выделившийся энергии путём синтеза ATP – это **энергически сопряжённые** реакции. Целиком весь сопряжённый процесс называется окислительным **фосфорилированием ADP:**

Реакции биологического окисления катализируются ферментами.

Окисление может быть связано:

1.с отщеплением водорода от окисляемого субстрата(дегидрирование):

$$SH_2 + A \rightarrow S + AH_2$$

2.с потерей электронов:

$$Fe^{+++} \xrightarrow{e} Fe^{+}$$

Оксидо-редуктаза

3.с присоединением кислорода:

$$SH_2 + 1/2O_2 \xrightarrow{\text{оксидаза}} S + H_2O$$

Все три типа реакций имеют место в живой клетке.

Наиболее распространенным типом биологического окисления является дегидрирования субстратов под влиянием ферментов дегидрогеназ. К ним относятся никотинамид зависимые ($НАД^+$) дегидрогеиазы, где акцептором отщепляемого от

субстратов водорода служат НАД$^+$ и НАДФ$^+$ и флавин-зависимые дегидрогеназы, где акцептором водорода служат ФМН и ФАД.

Водород используется как главное топливо для образования энергии. В митохондриях поток электронов от водорода устремляется к их конечному акцептору - кислороду. При этом образуется молекула воды - которая является конечным продуктом тканевого дыхания.

Следовательно, дегидрирование субстратов и окисление водорода с образованием воды является источником энергии.

На современном этапе известно, что тканевое дыхание представляет собой полиферментную цепь переноса электронов и протонов от субстрата к кислороду. Эта цепь переносчиков называется ЦПЭ или дыхательной цепью.

ДЦ - это конвейер по переносу протонов и. электронов от НАДН2 и ФАДН$_2$ кислороду.

Символ 2Н$^+$ означает два электрона и два протона, обычно переносимые в виде гидрид иона. В этом случае вместо терминов «донор электронов» и «акцептор электронов» иногда используют термины «донор или акцептор водорода». ФАД - *зависимая дегидрогеназа* также выполняет функцию первичной дегидрогеназы. Коферментом является: ФАД, который является акцептором водорода от субстрата. НАДН - *дегидрогеназа* катализирует окисление НАДН и восстановление убихинона (CoQ). Переносчиком водорода является кофермент-ФМН (комплекс 1). В процессе реакции водород сначала присоединяется к ФМН, соединенному с ферментом, а затем передается на убихинон. Флавиновые коферменты (ФАД и ФМН) прочно связаны с ферментом как простатические группы, поэтому ферменты, в состав которых они входят, называются флавопротеинами. Флавиномононуклеотид(ФМН), или рибофлавин фосфат, неразрыно связан с белковой частью фермента. Строго говоря, ФМН не является нуклеотидом, так как флавиновая часть связана с рибитолом, а не с рибозой.

Название «убихинон» возникло из за его повсеместной распространённости в природе. Кофермент Q действует как переносчик электронов на цитохромы.

В дыхательной цепи цитохромы служат переносчиками электронов и располагаются соответственно величине окислительно-восстановительногопотенциала следующим образом: В, C_1, С, а, a_3. гемовые группы цитохромов связаны с белковой частью донорно-акцепторными связями между ионом железа и соответствующими аминокислотными остатками.

В цитохромах C_1 и С дополнительные ковалентные связи формируются между тиогруппами цистеина и боковыми винильными группами гемма. QH_2 – дегидрогеназа (комплекс III) представляет собой комплекс цитохромов b и C_1. Этот фермент катализирует окисление восстановленного кофермента Q и перенос электронов на цитохром С. Электроны последовательно переносятся атомами железа цитохромов b и C_1, а затем поступают на цитохром С. Протоны после окисления QH_2 освобождается в раствор.

Цитохромоксидаза включает комплекс цитохромов а и a_3 (комплекс IV). Цитохромоксидаза кроме гема содержит ионы меди, которые способны менять валентность и таким способом участвовать в переносе электронов:

$$\overset{+e^-}{\underset{-e^-}{\Longleftrightarrow}} \quad Cu^{2+} \qquad Cu^{+}$$

Цитохромоксидаза переносит электроны с цигохрома С на кислород. В переносе электронов участвуют сначала ионы железа цитохромов а и a_3, а затем ион меди цигохрома a_3. Молекула кислорода связывается с железом в геме цигохрома a_3. Следовательно, переход электронов на кислород с иона меди цитохрома аз, происходит на молекуле фермента. Каждый из атомов молекулы кислорода присоединяет по два электрона и протона, образуя при этом молекулу воды.

Белки,содержащие негеминовое железа. Некоторое количество атомов железа в митохондриях связано не в геме цитохромов, а образует комплексы с другими белками. Эти белки называют также железосерными, так как атомы железа связаны с атомами серы цистеиновых остатков. Белки, содержащие негеминовое железо, участвуют в переносе

электронов на нескольких стадиях, однако, не совсем ясны их локализация и механизм действия.

Дегидрогеназы и первичные акцепторы водорода.

1.НАД - зависимые ДГ, известно > 150 НАД зависимых ДГ (напр ЛДГ, ПДГ).

2.Флавин зависимые ДГ, (ФАД зависимая ДГ-» СДГ; ФМН - зависимая ДГ-»НАДН-ДГ).

3. Железосерные белки, содержат негеминовое железо.

Участвуют в переносе электронов и протонов в 2-х участках ДЦ; между ФП и Ко А и между цит и с1.

4. Кофермент Q_2 или убихинон. (структурный аналог витамина К, филлохинона).

5. Цитохромы: в, c_1, с, а, a_3 - простетическая группа- железопорфириновое ядро.

Процессы окисления сопряженные с процессами фосфорилирования. В результате этого синтезируется АТФ.

Важная роль внутренней мембраны МХ состоит в том, что она связывает (или сопрягает) процесс переноса электронов и фосфорилирования.

Направление переноса электронов и процессов определяют окислительно - восстановительные потенциалам (редокс - потенциалы), а именно от $НАДН_2$; E_0= -0,32 V) к кислороду (E_0 = + 0,81V).

Зная редокс - потенциал окислительно - восстановительных пар, можно рассчитать выход свободной энергии при переносе электронов по уравнению: $\Delta G = nF - \Delta E$ где - ΔG количество свободной энергии.

h- число электронов (2)

F- постоянная фарадея (95 к Дж)

ΔE - разность потенциалов.

Для синтеза одной макроэргической связи АТФ требуется 40 кДж/ моль энергии, при этом перепад редокс- потенциалов составляет:

Ферменты ДЦ локализованы во внутренней мембране МХ, в криетах МХ. Установлено, что в ДЦ есть 3 участка, на которых происходит образование молекул АТФ.

В этих участках разность потенциалов выше 0,16V, которая вполне достаточно для синтеза одной молекулы АТФ.

$I^{ая}$ молекула АТФ образуется при переносе пары электронов от восстановленных НАД на ФФ (флав. фер-ты) или ФП.

$2^{ая}$ молекула между ц.в. и ц,с.

$3^{ая}$ между ц.с.и. и ЦХО ($аа_3$).

Окислительное фосфорилирование - ферментативное превращение АДФ в АТФ, сопряженное с переносом электронов от субстрата к молекулярному кислороду.

МЕХАНИЗМ СОПРЯЖЕНИЯ ДЫХАНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

Существование такого сопряжения доказывается тем, что можно ингибировать образование АТФ, не нарушая процесса транспорта электронов. Это достигается добавлением химических веществ, названных разобщителями.

После удаления разобщителей синтез АТФ восстанавливается. Изучение механизма сопряжения даёт ответ на вопросы:

1.каким образом транспорт электронов служит источником энергии?

2.как эта энергия передаётся в реакцию АДФ+Pi АТФ?

Существует несколько гипотез, объясняющих механизм сопряжения. Одним из них является хемоосмотическая теория. Цепь транспорта электрнов функционирует как *протонная (Н) помпа,* осуществляя перенос протонов из матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. Эндоэргический процесс выброса протонов из матрикса возможен за счет экзоэргических окислительно-восстановительных реакций дыхательной цепи. Перенос протонов приводит к возникновению разности концентрации H^+ с двух сторон митохондриальной мембраны: более высокая концентрация будет снаружи и более низкая - внутри. Митохондрия в результате переходит в «энергизованное» состояние, так как возникает *градиент концентрации* H^+ и одновременно разность *электрических потенциалов* со знаком плюс на наружной поверхности.

Электрохимический потенциал способен совершать «полезную» работу, он заставляет протоны двигаться в обратном направлении, но мембрана непроницаема для них кроме отдельных участков, называемых протонными каналами. Обратный перенос протонов в матрикс является *экзоэргическим процессом,* высвобождающаяся при этом энергия используется на фосфорилирование АДФ. Эту реакцию катализирует фермент *H^+-АТФ-синтетаза,* располагающаяся в области протонных каналов на внутренней поверхности внутренней мембраны.

Протонный потенциал, или электрохимический градиент ионов H^+ обозначается $_{\Delta}\mu H^+$ и состоит из 2^x компонентов:

осмотического - разности концентраций ионов H^+ электрического - разности электрохимических потенциалов.

Осмотический компонент — изменяется в единицах РН и обозначется $_{\Delta}$РН.

Нарушения структурной целостности мембраны или повышение её проницаемости для прогонов делает невозможным образование протонного потенциала, что вызывает разобщение между дыханием и фосфорилирова-нием.

H^+ АТФ синтетаза осуществляет фосфорилирование АДФ, сопряжённый с обратной диффузией протонов (H^+) через мембрану. Внешне она имеет грибовидную форму и состоит из 2^x структурных частей: F_0 ножка гриба, представляет собой белковый цилиндр, или канал по которому ходят протоны.

F_1-«головка гриба»(шаровидная).

H^+ - АТФ - синтеза = F_o+ F,.

Строение, свойства и функции этих 2^x частей фермента разные:

F_o - сильно гидрофобный белок, состоит из 4^x п/п цепей.

F_1| - из 10 п/п цепей пять разных типов (по 2 каждого типа) соединяются F_o с F_1| через & - сигма цепи.

F_0 - выполняет функцию канала в мембране, через который проходят протоны.

F_1 - выполнят фосфорилирущую функцию.

Если срезать " F," то прекращается синтез АТФ из АДФ и через канал легко проходят по градиенту.

Черезь F_o доставляются протоны к активному центру F_1, где происходит синтез АТФ.

КОЭФФИЦИЕНТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ Р/О

Показатель сопряжнения дыхания и фосфорилирования. При поглощении одного атома кислорода поглощается три атома неорганического фосфата. Поэтому Р/о $\leq$ 3.

Субстраты, окисляющиеся НАД зависимыми ДГ, являются энергетически более ценными, чем окисляющиеся флавинзависимыми ДГ.

Отношение количества связанной фосфорной кислоты к количеству поглощенного кислорода (0) называют коэффициентом фосфорилирования Р/О.

Разность окислительно - восстановительных потенциалов кислорода и окисляемых субстратов - источник энергии окислительного фосфорилирования.

При ОФ потенциал переноса электронов, преобразуется в потенциал переноса фосфатной группы, присущей в потенциал переноса фофсфатной группы, присущей АТФ.

Окислительно - восстановительный потенциал (или редокс - потенциал) - это электрохимическая категория, которая образуется между окислительно - восстановительной парой напр.между НАДН и ФАД.

Редокс - потенциал можно определить, измеряя электродвижущую силу.

Сильный восстановитель (напр НАДН) обладает отрицательным -потенциалом, когда как сильный окислитель (O_2) имеет положительный редокс- потенциал

РП - НАДН/ НАД: - 0,32v

ФП:-0,06до-0,1v

Наиболее высок РП O_2 - + 0,82v

ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Скорость дыхания митохондрий может контролироваться концентрацией АДФ. Это объясняется тем, что окисление и фосфорилирование жестко сопряжены. Энергия, необходимая клетке для совершения работы, поставляется за счет гидролиза АДФ. Концентрация АДФ при этом увеличивается; в результате создаются условия для ускорения дыхания, что и ведет к восполнению запасов АТФ.

Зависимость дыхания митохондрий от концентрации АДФ называется дыхательным контролем (ДК).

ДК определяет потребность клетки в энергии (т.е. скорость синтеза АТФ): Напр, при увеличении расходования АТФ (биосинтетические процессы, транспорт ионов и др.) увеличивается концентрация АДФ, а это автоматически ведет к ускорению дыхания и фосфорилирования и следовательно генерации АТФ.

Ингибиторы, блокирующие дыхательную цепь, действуют в определенных местах, препятствуя работе дыхательных ферментов (KCN, барбитураты, ротенон). Существуют также вещества, ингибирующие окислительное фос-форилирование.

Обширную группу веществ, влияющих на дыхание и окислительное фосфорилирование можно по механизму действия разделить на 4 группы:

1. Ингибиторы ДГ
2. Ингибиторы дыхания
3. Разобщители окислительного фосфорилирования.
4. Ингибиторы фосфорилирования.

1. Ингибиторы ДГ (НАД и ФАД зависимые ДГ) - препятствуют окислению субстратов и снижают поступление водорода в дыхательную цепь

2. Ингибиторы дыхания - блокируют одну из 3 звеньев образования протонного (мембранного) потенциала, прерывая поток электронов по ЦПЭ.

Делятся на 3 групп:

Первая группа препаратов блокируют 1-ое звено (пункт) сопряжения между FeS и KoQ.

Вторая группа блокирует 2-ой пункт сопряжения между в $> FeS_2$ ----->с.

Третья группа блокирует цитохромоксидазу и делает невозможным сам процесс дыхания.

Эти препараты выключают образование $\Delta\mu H^+$ и связанного с ним фосфо-рилирования (ингибиторы a_3 являются сильными ядами, отравление ими вызывает гибель организма).

3. Разобщители окислительного фосфорилирования - эти вещества влияют на сопрягающее звено между дыханием и фосфорилированием (и не влияют на создание протонного потенциала). Энергия $\Delta\mu H^+$ расходуется в обход H+АТФ синтетазной реакции (в основном в виде тепла).

Механизм действия разобщителей заключается в том, что они являются переносчиками катионов (протонов или других ионов) через мембрану и вызывают короткое замыкание между разнозаряженными поверхностями МХ мембраны, переводя энергию $\Delta\mu H^+$ в теплоту.

Разобщители этой группы отключают фосфорилирование от дыхания. Дыхание усиливается, а фосфорилирование подавляется.

Убедительные экспериментальные доказательства в пользу описанного механизма сопряжения дыхания и фосфорилирования были получены с помощью *ионофоров.* Молекулы этих веществ, как правило, *липофильны* и способны переносить ионы через мембрану. Например, *2,4-динитрофенол (протонофор)* легко диффундирует через мембрану, в ионизированной и неионизированной форме, перенося протоны в сторону их меньшей концентрации в обход протонных каналов. Таким образом, 2,4-динитрофенол уничтожает электрохимический потенциал, и синтез АТР становится невозможным, хотя окисление субстратов при этом происходит. Энергия дыхательной цепи в этом случае полностью рассеивается в виде теплоты. Этим объясняется пирогенное действие разобщителей. Разобщающим действием обладают гормон щитовидной железы - тироксин, а также некоторые антибиотики, такие как валиномицин и грамицидин.

ИНГИБИТОРЫ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Действуют на H^+ АТФ синтетазу, препятствуя использованию $\Delta\mu H^+$ для синтеза АТФ.

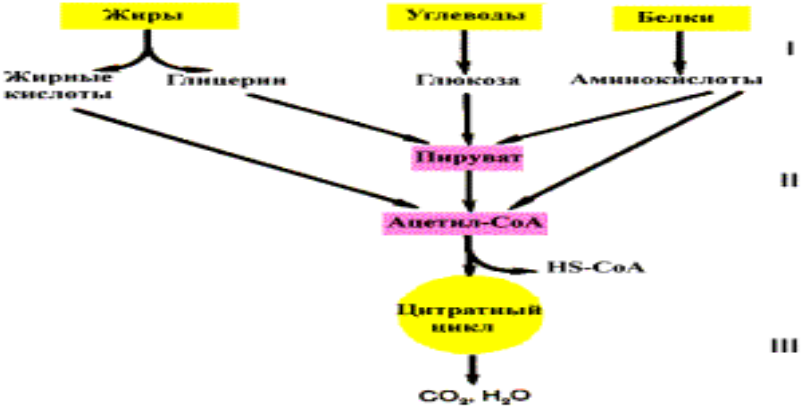
• Дициклокарбодиимид (ДЦКД) - «Запечатывает» протонный канал в F_0 H^+ АТФ синтетазы и фосфорилирование становится невозможным

• **Олигомицин - связывается с белковой субъеднннцей H^+ АТФ син тетазы** в месте соединения F_o с F_1 и «запечатывает» выход **канала** и прекращает поступление протонов к F_1 одновременно, ингиби-руя синтез АТФ в активном центере F_1.

Оба ингибитора подавляют и дыхание, т.к $\Delta\mu H^+$ не используется фос-форилированием, а расходуется на обращение потока электронов в ДЦ.

КАТАБОЛИЗМ

Если процесс катаболизма рассматривать с общей точки зрения, то можно выделить три основные его части:



Катаболизм основных пищевых веществ

1. **Расщепление в пищеварительном тракте**. Это гидролитические реакции, превращающие сложные пищевые вещества в относительно небольшое число простых метаболитов: глюкоза, аминокислоты, глицерин, жирные кислоты.

2. **Специфические пути катаболизма**. Простые метаболиты подвергаются специфическим реакциям расщепления, в результате которых образуется либо пировиноградная кислота, либо ацетил - СоА. Причем ацетил - СоА может образоваться из пирувата в результате окислительного декарбоксилирования. Могут также образоваться другие соединения, непосредственно включающиеся в цитратный цикл.

3. **Цитратный цикл и дыхательная цепь** завершают расщепление пищевых веществ до конечных продуктов - CO_2 и H_2O.

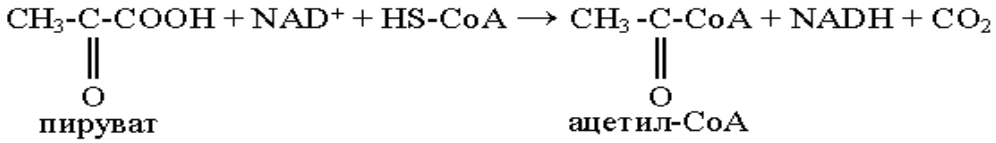
Следовательно, начиная со стадии образования пирувата происходит унификация путей катаболизма. Из большого числа исходных соединений образуется всего два - пируват и ацетил - СоА. Процесс, начинающийся от пирувата, называется **общим путем катаболизма** и в свою очередь включает:

- **окислительное декарбоксилирование пирувата**
- **цитратный цикл.**

Именно в общем пути катаболизма образуется основная масса субстратов для реакций дегидрирования. Совместно с дыхательной цепью и окислительным фосфорилированием общий путь катаболизма является основным источником энергии в форме АТР.

Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты

Суммарный результат многостадийной реакции выглядит следующим образом:



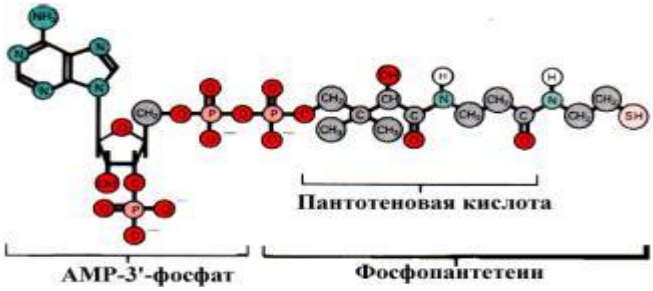
Реакция катализируется тремя ферментами, работающими в определенной последовательности и объединенными в **пируватдегидрогеназный комплекс.**

Этот комплекс ферментов работает подобно конвейеру, в котором продукт передается от фермента к ферменту. Такой принцип повышает эффективность работы ферментов, так как снижает случайность в контакте реагирующих веществ с ферментом. Далее приводятся названия ферментов и характеристика катализируемых реакций.

1. Пируватдекарбоксилаза (1). В качестве кофермента в реакции участвует тиаминдифосфат - производное витамина B_1. Фермент катализирует отщепление карбоксильной группы в виде CO_2, а ацетильный остаток присоединяет к липоевой кислоте - коферменту второго фермента. Получается ацетил-липоат.

2. Дигидролипоат-ацетилтрансфераза(2) - второй фермент комплекса. Катализирует перенос ацетильного остатка, соединенного с липоевой кислотой на второй кофермент HS-CoA с образованием ацетил-СоА. Таким образом, в этой реакции участвуют два кофермента: липоевая кислота, прочно соединенная с ферментом, и кофермент А, объединяющийся с ферментом в момент реакции. Водород остается связанным с липоевой кислотой, которая превращается в дигидролипоат.

3. Дегидрогеназа дигидролипоевой кислоты (3) отщепляет водород от липоевой кислоты и переносит его на NAD^+. Далее водород транспортируется дыхательной цепью



Строение HS-CoA

Главные продукты реакции - это $NADH+H^+$ и ацетил-CoA. $NADH+H^+$ далее окисляется в дыхательной цепи, где энергия используется на синтез 3 моль ATP, а ацетил-CoA окисляется в цитратном цикле. Пируватдекарбоксилазный комплекс находится на внутренней мембране митохондрий и соединен с ней со стороны матрикса.

Цитратный цикл

Цитратный цикл (цикл Кребса, цикл трикарбоновых кислот) - это система реакций, приводящая к полному окислению двухуглеродного ацетильного фрагмента, имеющего различное происхождение. Цитратный цикл является общим конечным путем окисления белков, жиров и углеводов. Все реакции цитратного цикла, как и окислительного декарбоксилирования пирувата, локализованы в митохондриях. В ходе одного полного цикла происходит:

- полное окисление ацетильного остатка до двух молекул CO_2;
- образование трех молекул восстановленного NAD^+ и одной молекулы $FADH_2$;
- образование одной молекулы GTP в результате субстратного фосфорилирования.

Реакции цитратного цикла, ферменты и их характеристика приведена на рисунке:

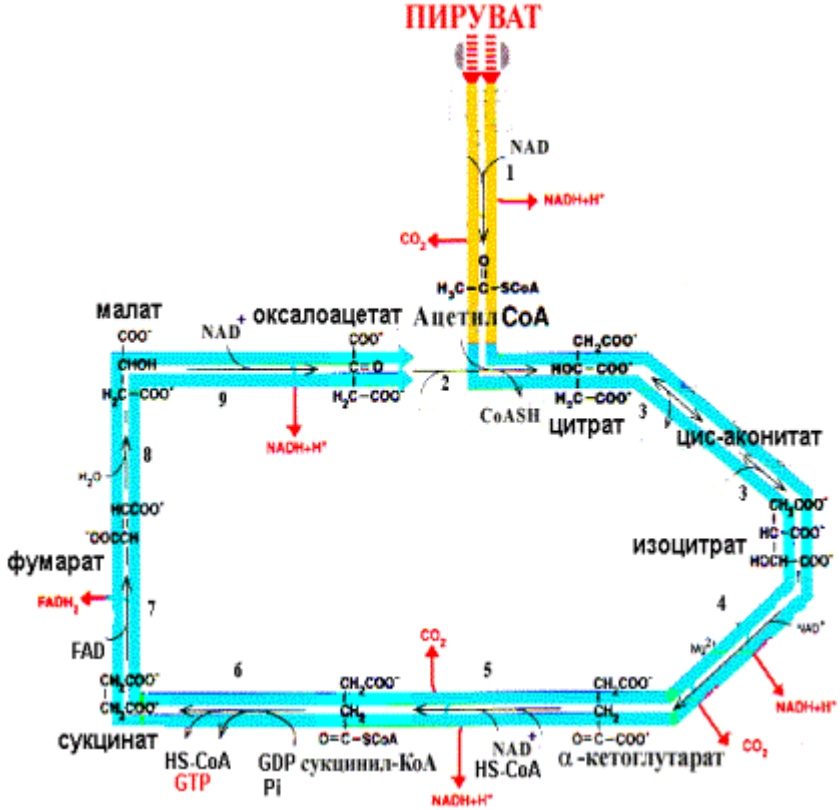


Схема цитратного цикла; ферменты: 1- пируватдегидрогеназный комплекс, 2- цитратсинтаза, 3- аконитаза, 4- изоцитратдегидрогеназа, 5- □ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, 6- сукцинил-КоА-тиокиназа, 7- сукцинатдегидрогеназа, 8- фумараза, 9- малатдегидрогеназа

Сопряжение общих путей катаболизма с дыхательной цепью

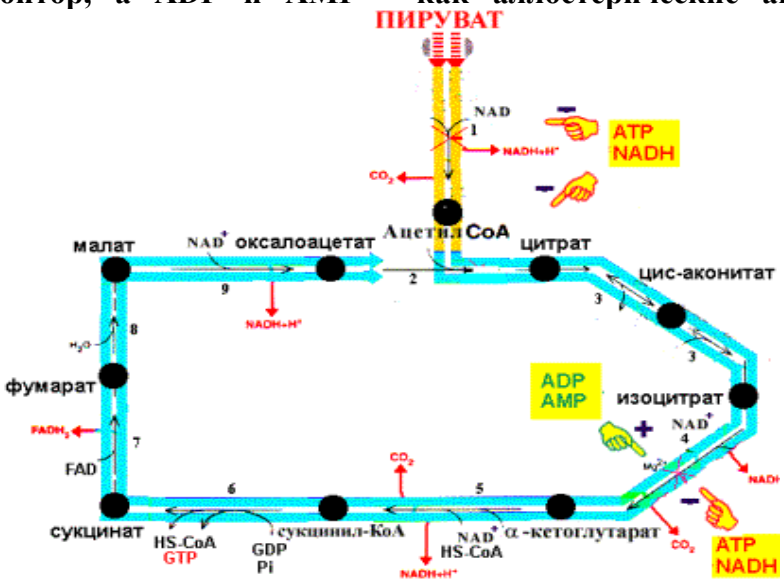
В общих путях катаболизма происходит пять реакций дегидрирования: одна на стадии окислительного декарбоксилирования пирувата и четыре в цитратном цикле. Все 10 атомов водорода переносятся на коферменты дегидрогеназ, которые в свою очередь окисляются в дыхательной цепи. Окисленные коферменты возвращаются в реакции общих путей катаболизма. **Регенерация коферментов - это обязательное условие для протекания реакции дегидрирования**. Таким образом, общий путь катаболизма и дыхательная цепь непрерывно связаны между собой и отдельно функционировать не могут.

Энергетика цитратного цикла и общих путей катаболизма

За один оборот цитратного цикла синтезируется **12 молекул АТР**. Девять из них образуются за счет энергии транспорта в дыхательной цепи трех пар водорода от трех молекул NADH + H^+. Две молекулы АТР синтезируются при окислении 1 молекулы $FADH_2$, так как в дыхательной цепи в данном случае действуют только два пункта сопряжения с окислительным фосфорилированием ADP. Кроме того, в цитратном цикле происходит одна реакция субстратного фосфорилирования, дающая 1 моль GTP (АТР). В общих путях катаболизма синтезируется 15 молекул АТР. Три из них при окислительном декарбоксилировании пирувата и 12 - в цитратном цикле.

Регуляция общих путей катаболизма

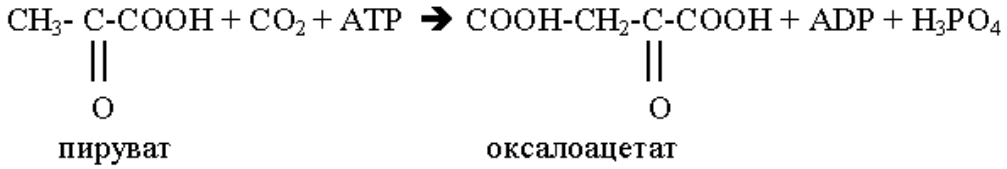
Главным фактором, регулирующим скорость дыхания и фосфорилирования, являются **энергетические потребности организма**. Основная масса восстановленных эквивалентов для дыхательной цепи поступает из общих путей катаболизма. Следовательно, **регуляция общих путей катаболизма и дыхательной цепи тесно связана**. Все контролирующие механизмы осуществляются на уровне ферментов и многие из них с помощью аллостерических эффекторов. Для оценки энергетического состояния клетки используют величину **энергетического заряда**, отражающего соотношение концентрации АТР к продуктам ее распада - ADP и AMP. При увеличении энергетического заряда в клетке (в состоянии покоя) скорость реакций общих путей катаболизма снижается, а при уменьшении энергетического заряда - увеличивается. Это достигается тем, **что АТР действует как аллостерический ингибитор, а ADP и AMP - как аллостерические активаторы некоторых ферментов:**



Реакции цитратного цикла и регуляция общего пути катаболизма

Другой механизм регуляции связан с необходимостью регенерации NAD^+ в дыхательной цепи. При уменьшении расхода АТР в клетке скорость дыхания митохондрий снижается (дыхательный контроль), уменьшается также скорость окисления NADH в дыхательной цепи и увеличивается концентрация NADH. В этом случае NADH ингибирует некоторые ферменты общих путей катаболизма, что приводит к замедлению реакций катаболизма и, следовательно, замедлению наработки восстановленных коферментов и

уменьшению синтеза АТР. При увеличении энергетических потребностей организма происходит все наоборот. Ряд промежуточных продуктов цитратного цикла служат предшественниками для синтеза необходимых организму веществ. Так сукцинил-СоА используется для синтеза гема, оксалоацетат и -кетоглутарат - для синтеза аспарагиновой и глутаминовой кислот. Очевидно, что выведение хотя бы одного метаболита нарушает работу цикла, так как уменьшает регенерацию оксалоацетата. Для компенсации концентрации метаболитов цикла в митохондриях происходит реакция карбоксилирования пирувата с образованием оксалоацетата. Таким образом, пируват включается в цитратный цикл двумя путями: окислительное декарбоксилирование с образованием ацетил-СоА, карбоксилирование с образованием оксалоацетата. Последнюю реакцию катализирует пируваткарбоксилаза, коферментом является **биотин:**



Гипоэнергетические состояния

Наиболее частой причиной гипоэнергетических состояний является **гипоксия,** возникновение которой в свою очередь связано с нарушением:

- **поступления кислорода в кровь**, что наблюдается при недостаточности O_2 во вдыхаемом воздухе или нарушении легочной вентиляции;
- **транспорта кислорода в ткани** при нарушении кровообращения или снижении транспортной функции гемоглобина;
- **функций митоходрий**, вызванное действием ядов, разобщителей.

Кроме того, причиной гипоэнергетических состояний могут быть гиповитаминозы, так как в реакциях общих путей катаболизма и дыхательной цепи участвуют коферменты, содержащие витамины. Так, витамин B_1 входит в состав тиаминдифосфата, B_2 является составной частью FMN и FAD, витамин РР в виде никотинамида входит в состав NAD^+ и $NADP^+$, пантотеновая кислота - в состав кофермента А, биотин также выполняет коферментную функцию активации CO_2.

ТЕМА: ПЕРЕВАРИВАНИЕ, ВСАСЫВАНИЕ УГЛЕВОДОВ. МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА

Питательные вещества поступают в виде углеводов, жиров и белков, в соотношениях широко варьирующих в разных группах населения. Алкоголь также может служить источником энергии.

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 минимально дневное потребление углеводов должно составлять 50-100 гр. Такая доза предотвращает кетоз и потерю мышечного белка у человека.

Некоторые углеводы входят в состав сложных липидов и образуют вместе с белками гликопротеины и протеогликаны. С нарушением обмена углеводов тесно связан ряд заболеваний – сахарный диабет, галактоземия, нарушения в системе запасания гликогена, нетолерантность к молоку.

Минимальные потребности в глюкозе имеют все ткани, но у некоторых из них (например, тканей мозга, эритроцитов) эти потребности весьма значительны. Гликолиз – главный путь утилизации глюкозы; он протекает во всех клетках. Это уникальный путь, поскольку он может использовать кислород, если последний доступен (аэробные условия), но может протекать и в отсутствии кислорода (анаэробные условия).

В химическом плане углеводы можно определить как производные полиатомных спиртов, при гидролизе которых образуются эти производные:

1. Моносахариды – углеводы, которые не могут быть гидролизованы до более простых форм.
2. Дисахариды – при гидролизе дают две молекулы моносахарида.
3. Олигосахариды при гидролизе дают 3-6 моносахаридов.
4. Полисахариды дают при гидролизе более б молекул моносахаридов.

В ротовой полости под действием амилазы слюны осуществляется гидролиз крахмала и гликогена до декстринов и мальтозы: этот процесс не играет важной роли в организме из-за кратковременности действия фермента на пищу.

Крахмалрасщепляющая активность секрета поджелудочной железы обусловлена панкреатической а – амилазой. Она сходна по действию с амилазой слюны и гидролизует крахмал и гликоген с образованием мальтозы, мальтотриозы [три α – глюкозных остатка, связанные α (1→4) связями], неразветвленных олигосахаридов и некоторого количества глюкозы.

Кишечный сок секретируемый железами Бруннера и Либеркюна, также содержит пищеварительные ферменты, в число которых входят: специфичсеские дисахаридаза и олигосахаридаза, также, как α – глюкозидаза (мальтаза), изомальтаза (α – декстриназа, β – галактозидаза) лактаза, сахараза и трегалаза.

Окончательный результат действия описанных пищеварительных ферментов заключается в редуцировании компонентов пищи до форм, которые могут всасываться и усваиваться. Этими конечными продуктами переваривания являются моносахариды (в основном глюкоза).

Продукты переваривания углеводов всасываются из тощей кишки в кровь портальной венозной системы с помощью двух механизмов: активного транспорта против градиенты концентрации и простой диффузией.

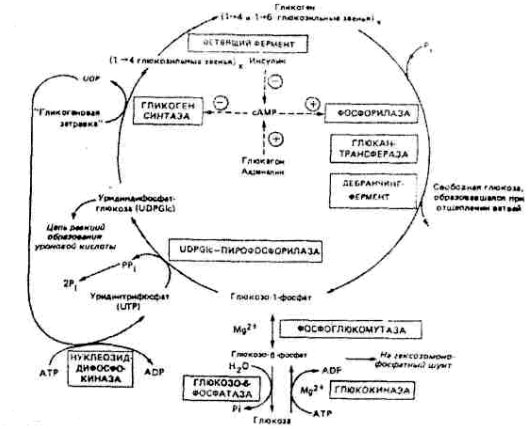
Однако всасывание некоторых Сахаров нельзя четко приписать действию одного из них. Фруктоза всасывается медленнее, чем глюкоза и галактоза Этот процесс, по-видимому протекает путем диффузии по градиенте концентрации. Существуют переносчики, способные связывать различными своими участками глюкозу и Na и переносить их через мембрану.

МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА

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

Функция мышечного гликогена состоит в том, что он является легкодоступным источником гексозных единиц, используемых в ходе гликолиза в самой мышце. Гликоген печени используется главным образец для поддержания физиологических концентраций глюкозы в крови, прежде всего в промежутках между приёмами пищи. Содержание мышечного гликогена заметно снижается только после продолжительной и напряженной физической работы.

Схема гликогенеза и гликогенолиза в печени

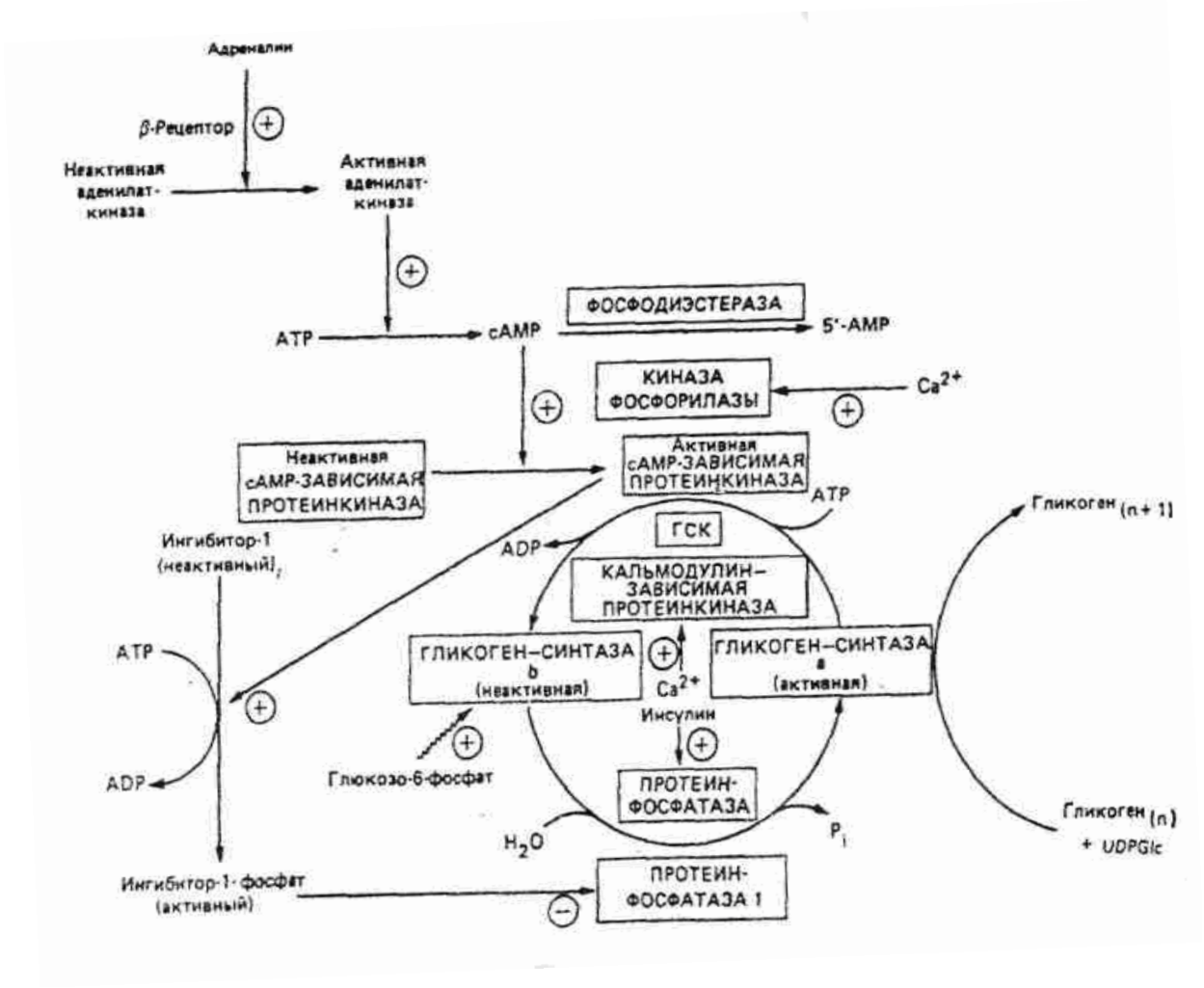


Гликогенелози. Стадией литирующей гликогенолиза является реакция, катализируемая фосфорилазой:

(C) +Pi → (C) + глюкоза-1 фосфат
гликоген гликоген

Фермент специфично катализирует фосфорилитическое расщепление (фосфоролиз) (1→4)-связей гликогена, продуктом является глюкозо-1 фосфат. Остатки глюкозы отщепляются от дальних концов молекулы гликогена до тех пор, пока на ветвях, идущих от точки ветвления [1→6]-связи не останется примерно по 4 остатка глюкозы.

Главный ферменты, контролирующие метаболизм гликогена гликогенфосфорилаза и гликогенсинтетаза – регулируются сложной суммой реакций, в которых используются как аллостерические механизм так и ковалентная модификация путем фосфорилирования и дефосфорилирования фермента.



БОЛЕЗНИ СВЯЗАННЫЕ С НАКОПЛЕНИЕМ ГЛИКОГЕНА «ГЛИКОГЕНОЗЫ»

Термин «гликогеноз» является общим для группы наследственных заболеваний характеризующихся отложением в тканях либо не нормальных больших количеств гликогена либо не обычных его видов.

Болезнь Гирке, клетки печени и извитых почечных кашальцев заполнена гликогеном однако эти запасы оказываются не доступными об этом свидетельствует гипогликемия а также отсутствия повышения уровня глюкозы в крови в ответ на адреналин и глюкагон. В печени в почках и тканях кишечника активность глюкоза-6-фасфатоза либо крайне низка либо вообще отсутствует.

Болезнь Помпа ведет к фатальным последствиям и характеризуется отсутствием лизосомальной α-(1→4) и(1→6) гликозидазы, функцией которой является деградация гликогена, предотвращающая его накопление в лизосомах.

Болезнь Форбса или болезнь Кори характеризуется отсутствием деветвящего фермента; в результате накапливается характерный разветвленный полисахарид «остаточный декстрин».

Синдром Мак-Ардля. У больных наблюдается пониженная выносливость к физическим нагрузкам хотя в их скелетных мышцах имеется аномально высокое содержание гликогена «2,5-4,1%», в крови после выполнения физической работы почти или вообще не обнаруживается лактат.

Катаболизм глюкозы.

В клетках человека глюкоза расщепляется по трем путям: аэробное (с участием кислорода) расщепление глюкозы, анаэробное (без участия кислорода) расщепление глюкозы и пентозофосфатный путь. При этом глюкоза в клетках в результате

взаимодействия АТФ фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата. Эту реакцию катализирует фермент гексокиназа. Глюкоза способна проходить через клеточные мембраны, в то время как для глюкозо-6-фосфатамембраны непроницаемы. Таким образом, в результате фосфорилирования глюкоза «запирается» в клетки.

Анаэробное расщепление глюкозы.

Десять цитозольных ферментов, превращающих глюкозу в пируват, совместно с лактатдегидрогеназой, катализирующей обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную, способны обеспечить синтез АТФ в отсутствии кислорода в анаэробных условиях.

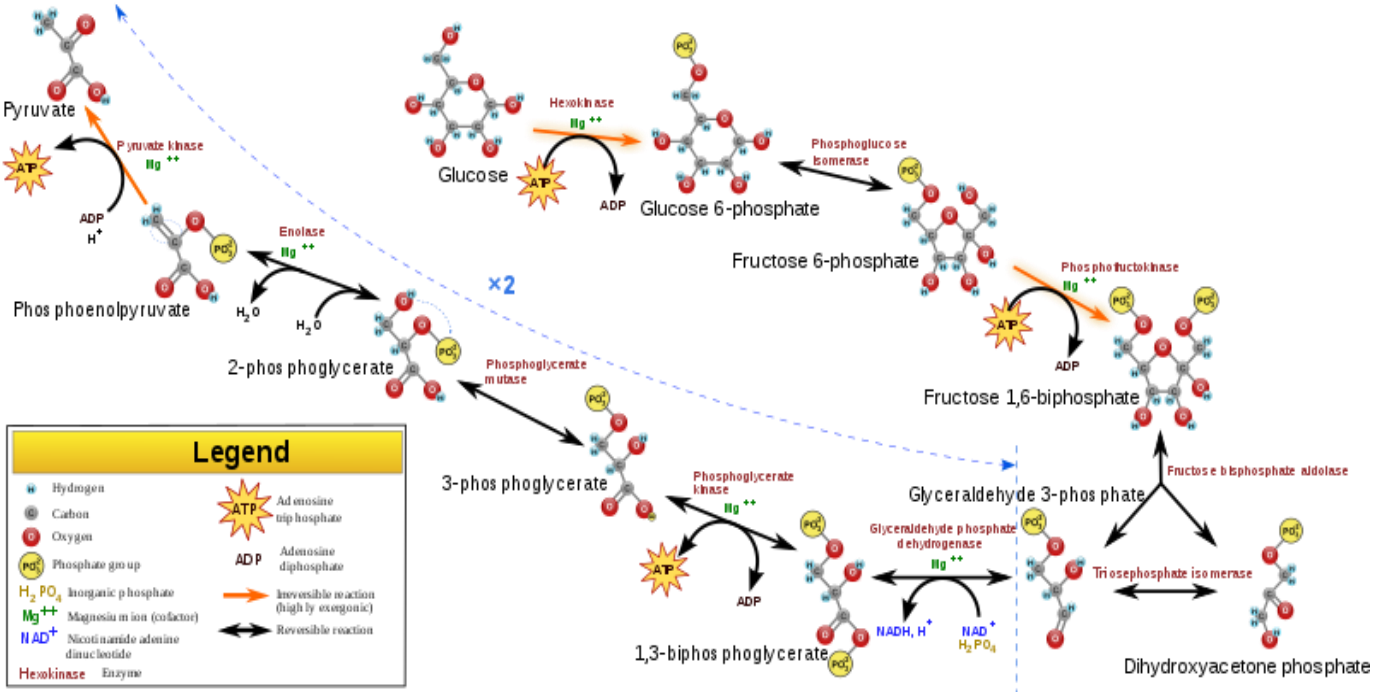
Это позволяет поддерживать интенсивную работу скелетной мышцы в условиях недостаточной эффективности аэробного окисления; ткани с повышенной гликолитической активностью способны сохранять активность в период кислородного голодания.

Суммарное уравнение гликолиза, завершающегося образованием лактата, следующее:

Глюкоза+2АДФ+2Рн→2L-Лактат+2АТФ+2НО

Все ферменты гликолитического пути во внемитохондриальной растворимой клеточной фракции. Они катализируют реакции превращения глюкозы в пируват и лактат, которые протекают в следующей последовательности.

Гликолиз и окисление пирувата.



Поскольку на каждую молекулу глюкозы, участвующей в гликолизе, образуются две молекулы триозы, то в стадиях:

1. ***1,3 биофосфоглицерат+АДФ→3-фосфоглицерат+АТФ***
   АДФ
2. ***Фосфоенолпируват→пируват+АТФ***

Образуется по две молекулы АТФ.

Хотя большая часть гликолитических реакций обратима, три из них носят выраженныйэкзорганический характер и поэтому могут рассматриваться как физиологически необратимые. Это реакции, катализируемые гексокиназой (и

глюкокиназой), фосфофруктокиназой и пируваткиназой; они служат главными участниками, на которых происходит регуляция гликолиза.

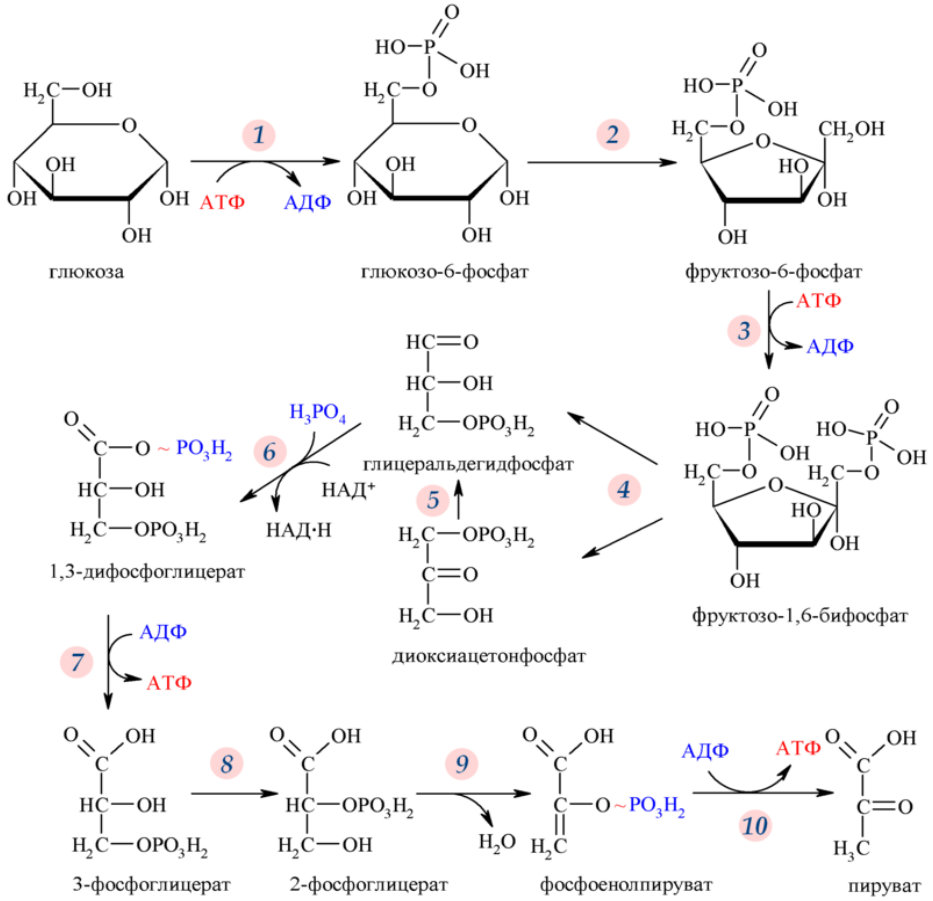
В зависимости от окислительно-востановительного состояния ткани дальнейший процесс может идти по одному из двух путей. В анаэробных условиях НАДН восстанавливает пируват в лактат, эту реакцию катализиурует лактатдегидрогеназа. Это обеспечивает возможность протекания гликолиза в отсутствии кислорода..

Аэробное расщепление глюкозы и ее физиологическое значение.

При аэробном расщеплении глюкозы конечным продуктом реакции являются CO2, H2O и энергия. Это основной путь расщепления глюкозы и он протекает в три стадии:

I. Гликолитическая стадия окисления глюкозы завершается образованием пирувата.
II. Окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием Ацетил-КоА.
III. Цикл Кребса и митохондриальная цепь переноса электронов.

Глюкоза.



Окисление пирувата в ацетил-КоА.

Окислительное декарбоксилирование пирувата и образование ацетил КоА протекает внутри митохондрий при участии различных ферментов, работающих в определенной последоваетельности и объединенных в мультиферментный пируватдегидрогеназный комплекс.

Пируват в присутствии тиаминдифосфата (ТПФ) декарбоксилируется, при этом происходит перенос гидроксиэтильной группы на тиозольное кольцо связанного с ферментом тиаминдифосфата; долее эта гидроксиэтильное производное вступает в реакцию с окисленным липоамидом с образованием с ацетиллипоамида. В присутствии дигидролипоилтрансферазы ацетиллипоамид реагирует с коферментом А, образуя ацетил КоА и восстановленный липоамид. Завершается цикл реокислением липоамида в реакции с флавопротеином в присутствии дигидролипоилдегидрогеназы. Восстановленный

флавопротеин окисляется НАД, который в свою очередь предает восстановительные эквиваленты на дыхательную цепь.

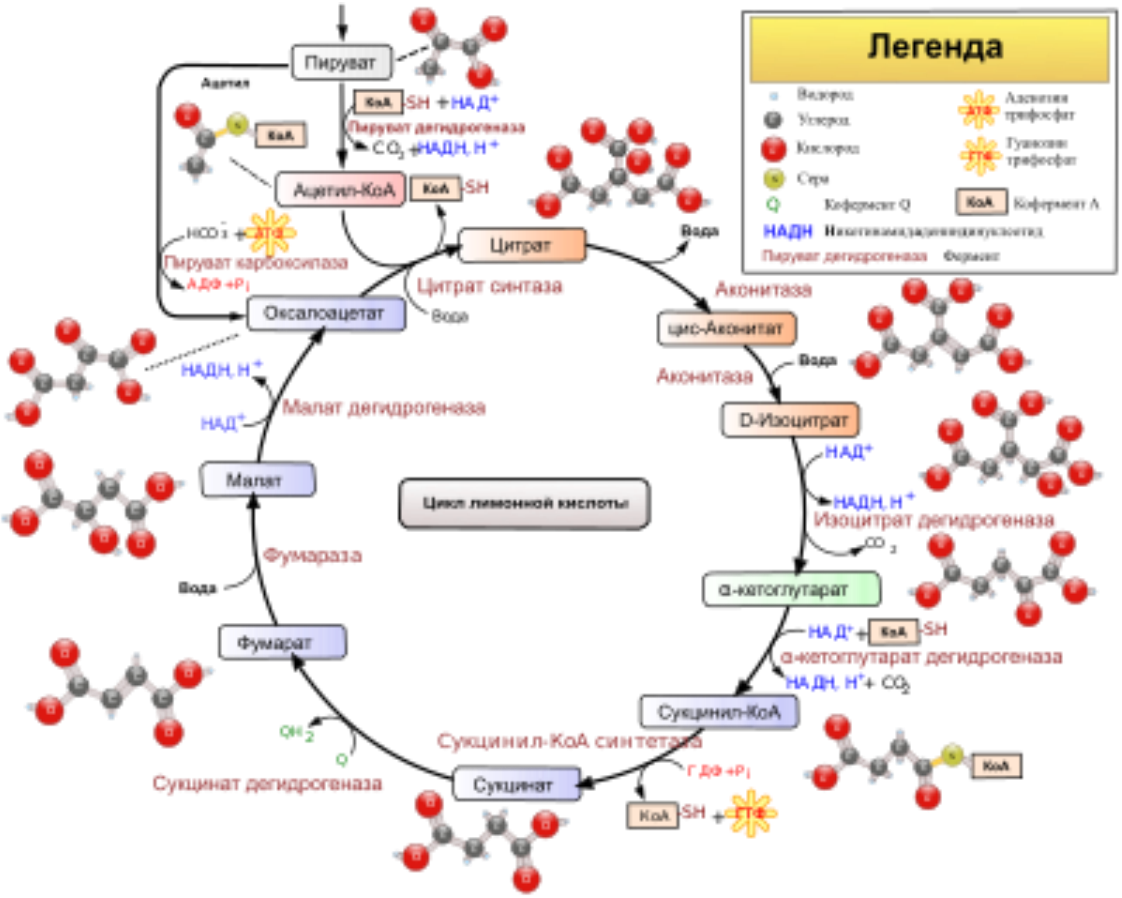
В пируватдегидрогеназный комплекс входит примерно 29 молекул пируватдегидрогеназы, около 8 молекул дигидролипоилдегидрогеназы и 1 молекула трансацетилазы.

Цикл лимонной кислоты. Катаболизм ацетил КоА.

Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса) представляет собой серию реакций, протекающих в митахондриях, в ходе которых осуществляется катаболизм ацетильных групп и высвобождение водородных эквивалентов; при окислении последних поставляется свободная энергия топливных ресурсов тканей. Ацетильные группы находятся в составе ацетил КоА.

Главная функция цикла лимонной кислоты состоит в том, что он является общим конечным путем окисления углеводов, липидов, белков, поскольку в ходе метаболизма глюкозы, жирные кислоты и аминокислоты превращаются либо в ацетил КоА, либо в промежуточные соединения рассматриваемого цикла. Цикл лимонной кислоты играет также важную роль в процессах глюкогенеза, переаминирования, дезаминирования и липогенеза. Хотя ряд этих процессов протекает во многих тканях, печень – единственный орган, в котором идут все перечисленные процессы. Поэтому повреждение большого числа клеток печени или замещение их соединительной тканью, как это имеет место при остром гепатите или циррозе, вызывает серьезные последствия.

Цикл лимонной кислоты: катаболизм ацетил-CoA.



ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ И ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ.

Глюконеогенез включает все механизмы и пути, обеспечивающие образование глюкозы и гликогена из неуглеводных компонентов.

Главными субстрактами глюконеогенеза служат глюкогенные аминокислоты, лактат, глицерол. Гликонеогенез происходит главным образом в печени и в почках, поскольку

именно в этих органах имеется полный набор необходимый при тяжелой гипогликемии ферментов.

Глюконеогенез обеспечивает потребности организма в глюкозе в тех случаях, когда диета содержит недостаточное количество углеводов. Постоянное поступление глюкозы в качестве источника энергии особенно необходимо для нервной системы и эритроцитов. При понижении концентрации глюкозы в крови ниже определенного критического уровня нарушается функционирование мозга; при тяжелой гоппогликемии возникает коматозное состояние и может наступить летальный исход. Глюкоза также необходима для жировой ткани как источник глицерола, , входящего в состав глицеридов; она играет, вероятно, существенную роль в поддержании эффективных концентраций интермедиатов цикла лимонной кислоты во многих тканях. Из этого следует, что даже в условиях, когда большая часть потребностей организма в калориях обеспечивается за счет жира всегда сохраняется определенная потребность в глюкозе. Кроме того, глюкоза служит единственным видом топлива для работы скелетной мышцы в анаэробных условиях. Она является предшественником молочного сахара (лактозы) в молочных железах и активно потребляется плодом в период развития. Механизм глюконеогенеза дает возможность удаления из крови продуктов тканевого катаболизма, например лактата, образующегося в мышцах и эритроцитах, глицерола непрерывно образующегося в жировой ткани.

Пентозофосфатный путь- является альтернативным путем окисления глюкозы. Он включает несколько циклов в результате которых из 3-х молекул глюкозы-6-фосфата образхуется 3-молекулы CO2 и 3-молекулы пентоз.

Пентозофосфатный цикл не приводит к синтезу АТФ, он выполняет 2 главные функции: 1) Образование НАДФН2 для восстановительных синтезов, таких, как синтез жирных кислот и стероидов; 2) обеспечение рибозой синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Недостаточность ряда ферментов пентозофосфатного пути является причиной гемолиза эритроцитов. Например: одна из форм гемолитической анемии обусловлена недостаточностью глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

Ферменты пентозофосфатного пути локализованы во вне митохондриальном пространстве клетки – цитозе. Как и в гликолизе, окисление осуществляется путем дегидрирования, однако, акцептором водорода в этом случае служит не НАД, а НАДФ.

Последовательность реакций пути можно разделить на две фазы: окислительную и не окислительную. В реакциях первой фазы глюкозо-6-флсфат дегидрогенируется и декарбоксилируется с образованием рибулозо-5-фосфата. В ходе второй фазы рибулозо-5-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат в результате серии реакций, в которых главную роль играют 2 фермента: транскетолаза и транссальдолаза.

ОБМЕН ФРУКТОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ

Гликолиз – это не только главный путь метаболизма глюкозы, ведущий к образованию ацетилКоА и его окислению в цикле лимонной кислоты, но также и главный путь метаболизма фруктозы и галактозы, поступающих с пищей.

Фруктоза в организме фосфолируется во фруктозо-6-фосфат ферментом гексокиназой. Однако средство этого фермента к фруктозе гораздо меньше чем к глюкозе, поэтому мало вероятно, что этот путь является главным петум усвоения фруктозы.

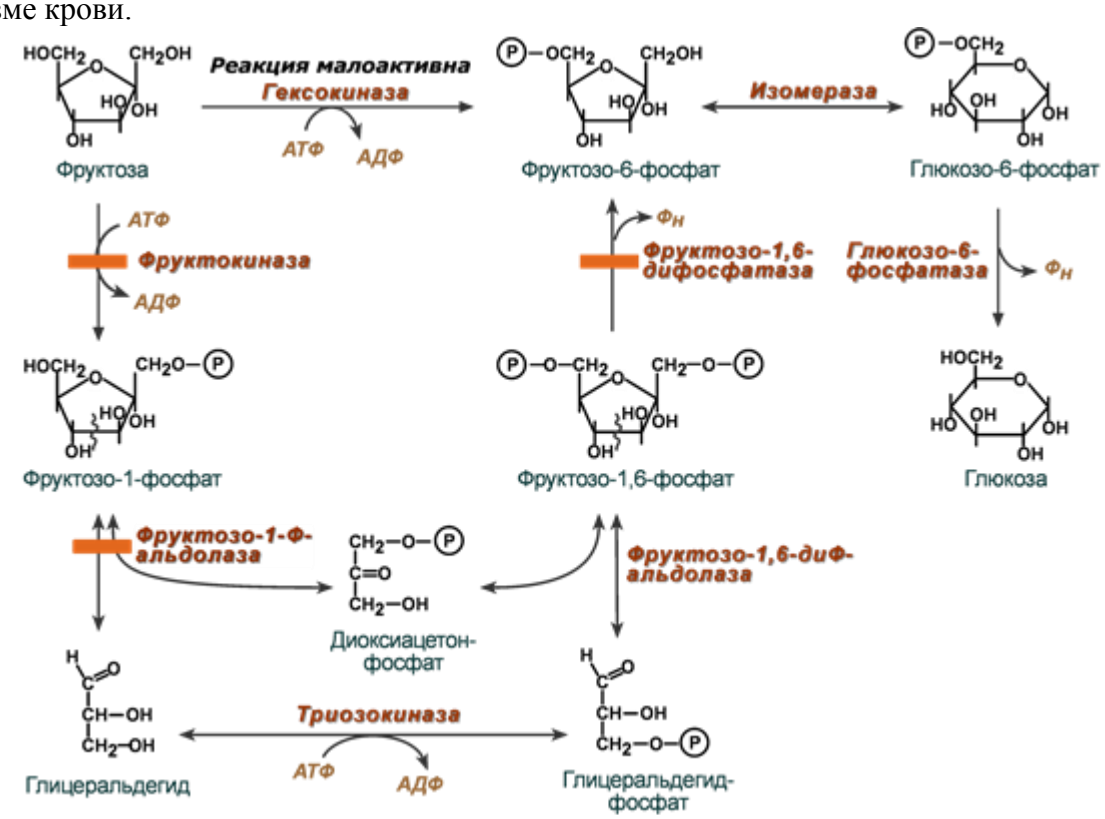
В печени имеется другой фермент, называемый **фруктиназой,** который катализирует перенос фосфата от АТФ на фруктозу с образованием фруктозо-1-фосфата. Этот фермент не катализирует фосфорилирование глюкозы и на его активность (в отличие от активности глюкокиназы) не влияют ни голодание, ни инсулин; это позволяет понять, почему у больных диабетом выведение фруктозы из крови происходит с нормальной скоростью. При отсутствии в печени фруктокиназы наблюдается идиопаптическая фруктозурия.

Фру ктозо-1-фосфат расщепляется на Д-глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат **альдолазой В**, которая присутствует в печени и способна также расщеплять фруктозо-1,6-бисфосфат. Отсутствие этого фермента **вызывает наследственную нетолерантность к фруктозе.** Д-глицеральдегид фосфорилируется с образованием глицеральдегид-3-фосфата.

Два триозафосфата-дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат могут далее превращаться по гликолитическому пути, либо конденсироваться под действием альдолаз с последующим превращением в глюкозу.

При генетически обусловленных не толерантности к фруктозе или недостаточной активности фруктозо-1,6-дифосфатазы наблюдается индуцируемая фруктозой гипогликемия, возникающая несмотря на наличие больших запасов гликогена. Вероятно, фруктозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат ингибируют фосфарилазу печени и аллстерическому механизму.

У человека в отличие от крыс значительное наличие фруктозы, образующейся при расщепление сахарозы, прежде чем поступить в систему воротной вены превращаются в глюкозу в клетках стенки кишечника. Метаболизм фруктозы в печени по гликолитическому пути происходит гораздо быстрее, чем метаболизм глюкозы. Это объясняется тем, что фруктоза минует стадию, характерную метаболизма глюкозы, катализируемую фосфофруктокиназой. На этой стадии осуществляется метаболический контроль скорости катаболизма глюкозы. Это позволяет фруктозе интенсинфицировыать в печени процессы метаболизма ведущие к синтезу жирных кислот, их этерификацию секрецию липопротеинов очень низкой плотности; в результате может увеличиться концентрация триацилглицеролов в плазме крови.



ОБМЕН ГАЛАКТОЗЫ

Галактоза образуется при гидролизе в кишечнике дисахарида лактоза (молочного сахара). В печени она легко превращается в глюкозу. Способность печени осуществлять это превращение может быть использована в качестве функциональной пробы-теста на толерантность к галактозе.

Пути превращения галактозы в глюкозу показан на рисунке. Глюкоза может превращаться в галактозу, и последняя не является незаменимым компонентом пищи.

Галактоза необходима для образования не только лактозы но и гликолипидов (церебризидов), протеогликанов и гликопротеинов.

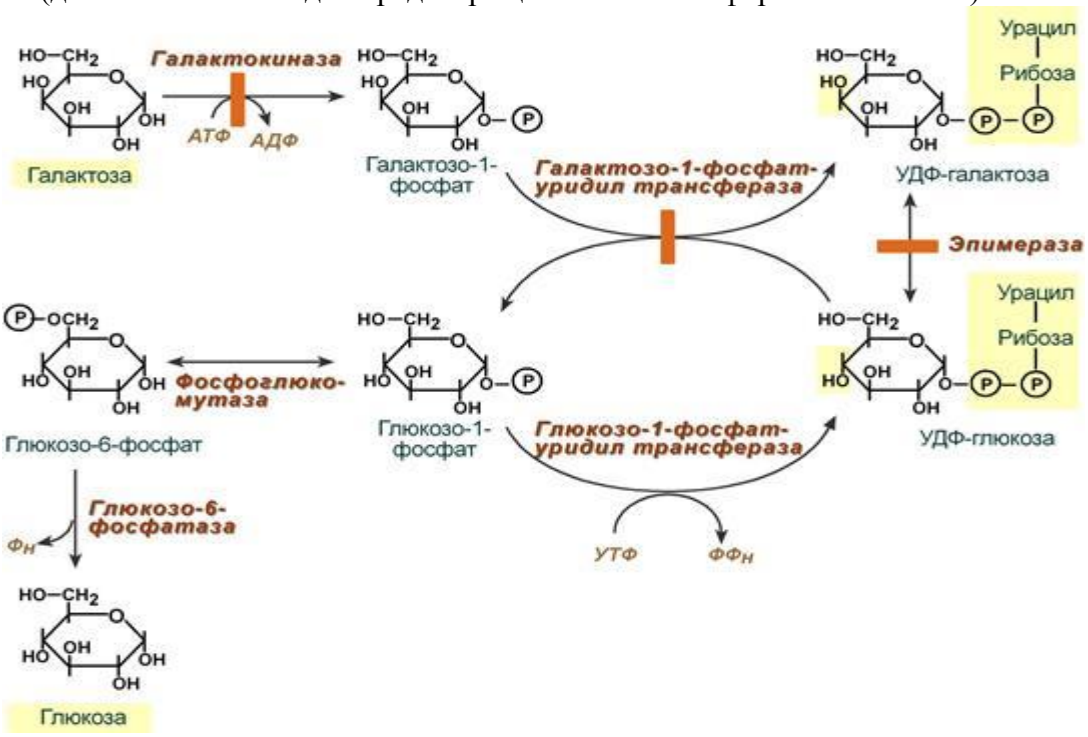
Нарушение метаболизма галактозы наблюдается при галактоземии, которая может быть вызвана наследственными дефектами одного из трех ферментов:

галактокиназы: галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы; УДФ-галактозо-4-эпимеразы.

При увеличении концентрации галактозы в крови повышается её концентрация в тканях. В тканях глаза она восстанавливается **альдозоредуктазой** в **галактитол,** накоплению которого способствует развитию катаракты.

Очень тяжелые последствия наблюдаются при дефиците уридилтрансферазы: в печени происходит накопление галактозо-1-фосфата, при этом соответственно снижается концентрация неорганического фосфата. В результате возникает нарушение функции печени, а затем расстройство психики.

Если при наследственном дефиците **галактозо-1-фосфагуридилтранс-феразы,** приводящем к нарушению метаболизма галактозы в печени и красных кровяных тельцах **эпимеразы** присутствует в достаточном количестве, то у больных может происходить образование УДФ-галактозы из глюкозы. Это объясняет, почем дети с таким заболеванием могут нормально расти и развиваться при назначении диеты, из которой исключена галактоза (диета назначается для предотвращения тяжелых форм заболевания).



Путь превращения галактозы в глюкозу и путь синтеза лактозы

РЕГУЛЯЦИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Регуляция метаболических путей, снабжающих организм «топливными» молекулами, необходима, поскольку они должны поступать постоянно при различных условиях и при возникновении патологических состояний, что направленно на поддержание как принято говорить, «энергетического гомеостаза».

Энергетический гомеостаз обеспечивает энергетические потребности различных тканей, используя при необходимости альтернативные виды «топлива». Он включает транспорт различных субстратов в организме, а также реализацию механизмов осуществляющих регуляцию уровня субстратов в крови. Эти механизмы обеспечивают непрерывную поставку тканям глюкозы между приемами пищи и при голодание.

Регуляция скорости протекания реакции определенного металлического пути часто осуществляется путем изменения скорости одной или возможно двух ключевых реакций катализируемых **«регуляторными ферментами»** некоторые физико-химические факторы, контролирующие скорость ферментативной реакцией, например, концентрации субстрата

имеют первостепенное значении при регуляции общей скорости образование продукта данного пут метаболизма.

В организме существуют механизмы, с помощью которых можно изменить активность ферментов, его количество: 1) равновесные и неравновесные реакции; 2) изменение количество фермента «регуляция биосинтеза белка»; 3) аллостерическая регуляция; 4) частичный протеолиз; 5) фосфорилирование дефосфорилирование; 6) ретроингибирование. Регуляция и адаптация ферментов, в основном печени приведена в таблице.

Регуляция метаболизма углевода

Регуляторные и адаптивные ферменты крысы
(главным образом ферменты печени)

Ферменты	Активность при		Индуктор	Репрессор	Активатор	Ингибитор
	прием пищи богатой углеводами	Голода-ние и диабет				
Ферменты гликолиза и кликогенеза						
Гексикиназа						Глбюкозо-6-фосфат
Глюкокиназа	↑	↓	Инсулин			
Гликошенсинтаз-ная система	↑	↓	Инсулин		Инсулин	Глюкагон (жирные кислоты, кетоновы тела)
Фосфосруктоки-наза-1	↑	↓	Инсулин		AMP, фруктозо-6-фосфат, Р., фруктозо-2,6-биофосфат	Цитрат (жирные кислоты, кетоновые тела), ATP, глюкагон (cAMP)
Пируваткиназа	↑	↓	Инсулин, фруктоза		Фруктозо-1,6-биофосфат	ATP, аламии, глюкагон (cAMP), адреналин
Пируватдегидро-геназа	↑	↓			CoA, NAD, инсулин, ADP, пируват	Ацетил-CoA, NADH, ATP (жирные кислоты, кетоновые тела)
Ферменты глюконеогенеза						
Пируваткарбок-силаза	↓	↑	Глюкокор-тикоиды, глюкогон, адреналин	Инсулин	Ацетил-CoA	ADP
Фосфоенолпиру-ват-карбоксикиназа	↓	↑	Глюкокор-тикоиды, глюкогон, адреналин	Инсулин	Глюкагон	
Фруктозо-1,6-фосфатаза	↓	↑	Глюкокор-тикоиды, глюкогон, адреналин	Инсулин	Глюкагон (cAMP)	Фруктозо-1,6-биофосфат,

						AMP, фруктозо-2,6-биофосфат
Глюкозо-6-фосфатаза	↓	↑	Глюкокортикоиды, глюкогон, адреналин	Инсулин	Инсулин	
Ферменты пентозофосфатного пути и липогенеза						
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	↑	↓	Инсулин			
6-форсфоглюконатдегидрогеназа	↑	↓	Инсулин			
«Яблочный» фермент	↑	↓	Инсулин			
АТР-цитрат-лиаза	↑	↓	Инсулин			ADP
Ацетил-СоА-карбоксилаза	↑	↓	Инсулин		Цитрат, инсулин	Длинно-цепочечный ацил-СоА, cAMP, глюкагон
Синтаза жирных кислот	↑	↓	Инсулин			

Гликопротеины и протеогликаны

В клетках и биологических жидкостях олигосахариды (сахароза, лактоза, мальтоза, тригалоза) находятся как в свободном виде, так и в составе смешанных углевод-белковых комплексов – гликопротеинов, соединенных с белком ковалентными связями. Биологическое значение олигосахаридов еще подробно не изучено. Возможно, что олигосахариды, входящие в состав гликопротеидов клеточной мембраны, являются своеобразными «локаторами», с помощью которых клетки узнают друг-друга.

Полисахариды или гликаны – высокомолекулярные соединения содержащие более десяти моносахаридных звеньев, соединенных гликозидными связями. Чаще всего их мономером является Д-глюкоза, но могут встречаться галактоза, манноза, фруктоза.

Различают гомополисахариды (гомогликаны) и гетерополисахариды (гетерогликаны). Например, крахмал гомополисахарид, состоящий из остатков глюкозы, а шалуроновая кислота – гетерополисахарид (в нее вхдят чередующиеся звенья Д-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-Д-глюкозамина).

Кислые гетерополисахариды представляют собой сильно гидратированные, желеподобные вещества, которые находятся в связанном с белками состоянии – протеогликана или глюкозаминпротеогликаны, поскольку основные свойства этих макромолекул определяются их углеводной частью.

В зависимости от структуры цепей кислые гетерополисахариды делятся на семь основных типов: шалуроновая кислота, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дермостансульфат, ипарин, гепарансульфат и кератансульфат.

Наиболее важные функции полисахаридов: энергетическая, опорная, защитно-механическая, связующая (структурная), гидроосмотическая и ионрегулирующая, кофакторная.

На практике гепарин и сульфатированные синтетические полисахариды (гепариноиды) широко применяют как антикоагулянты и противоатеросклеротические (прерятствующие отложению липидов в сосудах) препараты.