

В. А. Костюк

ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Рекомендовано

*Учебно-методическим объединением
по естественнонаучному образованию в качестве пособия
для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальностям 1-31 01 01 «Биология
(по направлениям)», направления специальности 1-31 01 01-01
«Биология (научно-производственная деятельность)»,
1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)»,
1-31 01 02 «Биохимия»*

УДК 576.31(075.8)

ББК 28.05я73

К72

Рецензенты:

кафедра биохимии и биофизики

Международного государственного

экологического института им. А. Д. Сахарова

Белорусского государственного университета

(заведующий кафедрой кандидат биологических наук *С. Б. Бокуть*);

доктор медицинских наук, профессор *В. А. Кульчицкий*

Костюк, В. А.

К72 Основы клеточной физиологии : пособие / В. А. Костюк. – Минск : БГУ, 2016. – 143 с. : ил.

ISBN 978-985-566-355-4.

В пособии в краткой форме изложены основы витальных процессов, протекающих на уровне клетки и отдельных внутриклеточных структур. Рассматриваются важнейшие структурно-функциональные элементы клетки как потенциальные мишени фармакологической терапии.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направления специальности 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», 1-31 01 02 «Биохимия».

УДК 576.31(075.8)

ББК 28.05я73

ISBN 978-985-566-355-4

© Костюк, В. А., 2016

© БГУ, 2016

ПРЕДИСЛОВИЕ

«Основы клеточной физиологии» – одна из базовых, интегрирующих биологических (физиологических) дисциплин. Она предусматривает углубленное изучение витальных процессов, протекающих как на уровне клетки, так и на уровне отдельных внутриклеточных структур: плазматической мембраны, митохондрий, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, лизосом и цитоскелета. Большое внимание в пособии уделяется вопросам биосигнализации – новому, быстро развивающемуся разделу молекулярной физиологии клетки, предметом изучения которого являются механизмы межклеточной коммуникации и внутриклеточной передачи гуморальных сигналов. Рассматриваются классические пути сигнальной трансдукции и образования в клетках клеточных органелл, а также роль активных форм кислорода и азота в процессах биосигнализации. Изложены современные представления о механизмах клеточной гибели. Дана сравнительная характеристика морфофизиологических признаков апоптоза и некроза, описываются генетические и биохимические механизмы клеточной гибели и сигнальные пути, активирующие эти механизмы. В конце книги приводится список рекомендуемой литературы.

Пособие подготовлено в рамках учебного плана для студентов биологических факультетов специальности 1-31 01 01 «Биология» специализации «Физиология человека и животных».

Глава 1

КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

1.1. Молекулярная организация (жидкостно-мозаичная модель) и химический состав

Биологические мембраны образуют наружную оболочку всех животных клеток, участвуют в формировании многочисленных внутриклеточных органелл. Наружную оболочку клетки называют *клеточной* или *плазматической мембраной*. Часто используют еще один термин – *плазмалемма*. Если принять общую площадь всех мембран клетки, например гепатоцита (клетка печени), за 100 %, то плазматическая мембрана составит только 2 %. Наибольшую площадь (51 %) занимают мембраны эндоплазматического ретикулума. Мембраны митохондрий в сумме составляют 39 %, из них 32 % – внутренняя и 7 % – наружная. На мембраны аппарата Гольджи приходится около 7 %, а на долю ядерной мембраны – только 0,2 %. Примерно 0,4 % от площади всех мембран клетки составляют лизосомальные мембраны.

Клеточные мембраны представляют собой эластичные структуры *толщиной от 7 до 11 нм* и состоят в основном из липидов и белков. От 40 до 90 % всех липидов – это фосфолипиды, которые, в зависимости от входящего в их состав спирта, можно разделить на две группы: фосфоглицериды и фосфосфинголипиды (сфингомиелины). Фосфоглицериды (основная группа мембранных липидов) – это сложные эфиры глицерина, у которых в отличие от жиров (триацилглицеринов) одна из трех спиртовых групп глицерина связана не с жирной, а с фосфорной кислотой, а последняя, в свою очередь, – с так называемым *спиртовым компонентом*. В фосфоглицеридах клеточных мембран в качестве спиртовых компонентов наиболее часто встречаются холин, этаноламин и серин. Соответственно, фосфоглицериды, в состав которых входят эти группы, получили название *фосфатидилхолин*, *фосфатидилэтанолламин* и *фосфатидилсерин*. Значительно меньше в мембранах *фосфатидилинозитола* и *кардиолипина*, в их составе в качест-

ве спиртового компонента содержатся соответственно шестиуглеродный сахароспирт *инозитол* и *глицерин*. Среди жирных кислот в составе фосфоглицеридов обнаружены как насыщенные (пальмитиновая C₁₆, стеариновая C₁₈), так и ненасыщенные (олеиновая C₁₈₋₁, линолевая C₁₈₋₂, линоленовая C₁₈₋₃, арахидоновая C₂₀₋₄) кислоты. В природных фосфоглицеридах одна кислота является обычно насыщенной, другая – ненасыщенной.

В сфинголипидах ненасыщенный аминоспирт *сфингозин* связан с жирной кислотой амидной связью, формируя *церамид*, на основе которого образуются *сфингомиелины*, *цереброзиды* и *ганглиозиды*. В наиболее распространенном сфинголипиде – *сфингомиелине* – сфингозин связан с холином через остаток фосфорной кислоты.

Характерной особенностью фосфолипидов является то, что они *амфифильны*, т. е. имеют полярные *гидрофильные головки* и неполярные *гидрофобные жирнокислотные хвосты*. Благодаря амфифильности молекулы фосфолипидов, помещенные в водную среду, самопроизвольно образуют упорядоченные надмолекулярные структуры – *мицеллы* и *липосомы*. Мицеллы – это сферические образования, в которых молекулы фосфолипидов расположены таким образом, что их вытянутые жирнокислотные хвосты плотно прилегают друг к другу и направлены от периферии к центру, а полярные головки образуют внешнюю поверхность мицеллы. Липосомы также являются сферическими образованиями, имеющими внутри себя полость, ограниченную двойным слоем (бислоем) фосфолипидных молекул, ориентированных таким образом, что гидрофобные углеводородные хвосты упорядоченно контактируют друг с другом, а полярные головки направлены наружу, в водную фазу. Тип надмолекулярной структуры, образуемой фосфолипидами в водной фазе, зависит от условий среды (рН, ионная сила) и от количества физико-химических свойств фосфолипидных молекул. С пищей в организм человека поступает 1–2 г фосфолипидов в сутки; еще примерно 10–12 г изливается в тонкий кишечник с желчью, где все они подвергаются расщеплению и всасыванию. Больше всего фосфолипидов находится в нервной ткани, в два раза их меньше в печени, еще меньше – в почках и сердце.

Кроме фосфолипидов в мембранах всех клеток значительную часть составляют *стерины* (стеролы), в первую очередь *холестерин* (холестерол). Стерины представляют собой ярко выраженные неполярные гидрофобные соединения. Часто холестерин и фосфолипиды называют комплементарными, так как холестерин – такой же необходимый компонент в структуре мембраны, как и фосфолипиды.

Существует множество разных типов мембран, несущих различную функциональную нагрузку и отличающихся структурой и молекулярной

организацией. В настоящее время установлено, что структурной основой всех биологических мембран является *двойной слой фосфолипидных молекул* (рис. 1). Плотность упаковки фосфолипидных молекул в мембране зависит от их жирнокислотного состава. Наличие в остатках жирных кислот *цис*-двойных связей приводит к значительному увеличению объема мембраны и разрыхлению фосфолипидного бислоя. Если в состав фосфолипидов входят более насыщенные жирные кислоты, бислоем липидов более плотный. Наиболее плотным фосфолипидный бислоем становится благодаря наличию в мембране неполярных стероидов, которые внедряются между углеводородными хвостами и полярными головками мембранных фосфолипидов. Кроме фосфолипидов и стероидов в мембранах содержатся различные *гликолипиды*. Гидрофильная часть амфифильных молекул гликолипидов образована олигосахаридами. Гликолипиды всегда располагаются на наружной поверхности мембраны, а их олигосахаридный фрагмент выступает в окружающую среду.

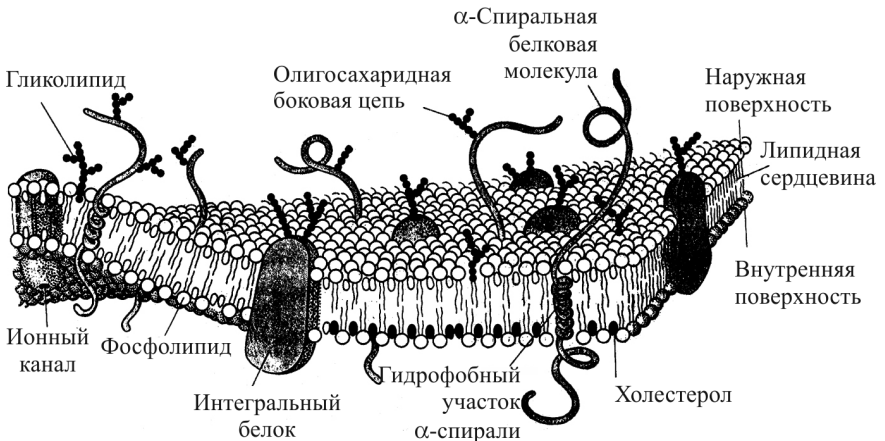


Рис. 1. Молекулярная организация клеточной мембраны

Двойной слой фосфолипидных молекул в биологических мембранах не является застывшим, фиксированным образованием. Во-первых, в мембранах постоянно происходит обновление жирнокислотных остатков – ацильных групп – фосфолипидов. Во-вторых, компоненты мембраны находятся в непрерывном движении. Например, молекулы фосфолипидов быстро перемещаются относительно друг друга. Этот процесс называется *латеральной диффузией*. Значительно реже в мембранах происходит перенос (транслокация) молекул фосфолипидов с одного слоя на другой, так называемое явление флип-флоп. В зависимости от температуры фосфолипиды могут

находиться в разных фазовых состояниях. При физиологической температуре основная часть мембранных фосфолипидов пребывает в жидкокристаллическом состоянии. С понижением температуры происходит фазовый переход в гелеобразное состояние. Температура фазового перехода зависит от состава липидного бислоя, pH и ионного состава среды. Следует отметить, что содержание некоторых фосфолипидов во внутреннем и наружном слое может различаться. Например, в плазматической мембране фосфатидилсерин обычно присутствует только во внутреннем липидном слое. Такое асимметричное распределение данного фосфолипида поддерживается в результате работы особой транспортной АТФ-азы, постоянно переносящей фосфатидилсерин из внешнего липидного слоя плазматической мембраны во внутренний. При серьезных нарушениях процессов жизнедеятельности в клетке работа фосфолипидного насоса прекращается, содержание фосфатидилсерина на внешней стороне липидного бислоя резко возрастает, и это является сигналом, указывающим на то, что клетка должна быть удалена путем апоптоза.

Проведенные исследования и расчеты показали, что содержание липидов в мембранах, в частности плазматической мембране эритроцитов, достаточно лишь для покрытия 75 % клеточной поверхности. Остальная площадь приходится на долю белков. Белки – важнейшие компоненты мембран, обуславливающие ферментативную активность, рецепторные свойства и *селективность* мембран (избирательная проницаемость, т. е. способность пропускать одни молекулы или ионы и задерживать другие). Мембранные белки являются в основном *глобулярными гликопротеидами*. Большинство мембранных белков амфифильны. Благодаря этому свойству они расположены в мембранах таким образом, что их гидрофобные группы погружены в липидный бислой, а полярные выступают над поверхностью мембраны, образуя гидрофильную поверхность из заряженных аминокислотных группировок в водной фазе. При этом белки могут пересекать мембрану, выступая как с внутренней ее стороны, так и с внешней, или быть только частично погруженными, удерживаясь благодаря гидрофобным взаимодействиям. В обоих случаях их называют *интегральными*. Белки, которые прикреплены к мембране, но внутрь липидного бислоя не проникают, называются *периферическими*. Как правило, периферические белки локализованы с внутренней стороны мембраны и обычно функционируют как ферменты, но способны выполнять и структурные функции. Интегральные белки могут быть поверхностными клеточными рецепторами, а также молекулами-переносчиками или трансмембранными каналобразующими белками, обеспечивающими селективный перенос ионов и гидрофильных молекул через мембраны. Некоторые из интегральных белков являются ферментами, например АТФ-азы.

1.2. Основные функции клеточных мембран

Наиболее очевидной функцией мембран является их участие в образовании изолированных отсеков – *компарментов*. Какие бы мембраны мы ни рассматривали, они всегда формируют замкнутые структуры. Самая крупная из них – собственно клетка – ограничена плазматической мембраной. Клетка содержит цитозоль и клеточные органеллы – ядро, митохондрии, лизосомы и другие везикулы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи. Эти образования представляют собой *субкомпарменты*, отделенные от цитозоля своей собственной поверхностной мембраной.

Ограничивая и разделяя различные участки клетки, мембраны исполняют роль барьеров, препятствующих свободной диффузии разных веществ. В результате в каждом компарменте устанавливается свой состав внутренней среды, и протекающие в них химические реакции пространственно разделяются. Кроме того, между клеткой и внеклеточной жидкостью создаются концентрационные градиенты и трансмембранный электрический потенциал. Если принять, что каждый клеточный *компармент* занимает не более 10 % объема клетки, то теоретически концентрация субстратов, а следовательно, и скорость химических превращений в нем может быть в 10 раз выше, чем в такой же клетке без компарментализации. Кроме участия в формировании изолированных отсеков в число функций, выполняемых мембранами, входят:

1) связывание внеклеточных сигнальных молекул интегральными рецепторными белками с последующей активацией соответствующих сигнальных путей;

2) катализ химических реакций ферментами, которые могут быть как периферическими, так и встроенными в мембрану интегральными белками. В этом случае диффузия субстратов к активным центрам ферментов происходит не в трехмерном пространстве цитоплазмы (трехмерная диффузия), а в плоскости мембраны (двухмерная диффузия). Благодаря этому вероятность субстрат-ферментного взаимодействия и скорость химических реакций увеличивается в десятки раз;

3) преобразование внешних стимулов в электрические сигналы;

4) проведение биоэлектрических импульсов;

5) участие в формировании межклеточных контактов;

6) эндоцитоз и пиноцитоз.

1.3. Трансмембранный транспорт

Простая и облегченная диффузия. Жизнедеятельность клетки зависит от непрерывного проникновения внутрь клетки и выхода из нее многочисленных разнообразных веществ. Липиды, сахара, аминокислоты и другие

питательные вещества поступают в клетку для удовлетворения потребностей, связанных с ростом и производством энергии, а удаляются продукты обмена и отходы. Кроме того, многие клетки производят и выделяют различные молекулы, а также надмолекулярные образования, которые необходимы для нормального функционирования других клеток и тканей. Это могут быть гормоны и иные сигнальные молекулы, белки внеклеточного матрикса, липопротеидные частицы. Через клеточные мембраны происходит постоянный трансмембранный перенос ионов, обеспечивающий ионный гомеостаз в клетке и внеклеточной среде.

Различают *пассивный* (т. е. не энергозависимый) и *активный* транспорт. Пассивный транспорт вещества или ионов происходит только в сторону их меньшей концентрации (*диффузия*) и осуществляется путем *простой диффузии* через липидный бислой, *диффузии через мембранные каналы* и *облегченной диффузии*.

Простая диффузия через липидный бислой или каналы в мембране и облегченная диффузия – это пассивные процессы, в которых используется только потенциальная энергия, запасенная в форме разности концентраций вещества на противоположных сторонах мембраны. В ходе диффузии концентрация вещества в двух компартментах стремится к равновесному значению, и по достижении равновесия суммарный диффузионный поток становится равным нулю, хотя одинаковые по величине и противоположные по направлению потоки по-прежнему существуют.

В случае простой диффузии через липидный бислой у диффундирующей молекулы разрываются все водородные связи с водой (на это нужно затратить энергии около 5 ккал на моль водородных связей), затем она погружается в липидную фазу, пересекает мембрану и переходит из липидного бислоя во внутреннюю среду клетки. При этом в соответствии с законами диффузии подвижность внутри мембраны нейтральных молекул (*неэлектролитов*) снижается при увеличении размера их молекул и увеличении вязкости мембраны. Поэтому путем простой диффузии через плазматическую мембрану в клетку проходят в основном небольшие, умеренно липофильные молекулы. Количественным параметром, характеризующим липофильность, а следовательно, и возможность транспорта нейтральных молекул в клетку путем диффузии через липидный бислой, является *коэффициент распределения (K)* в системе растворителей, содержащей липидную и водную фазы (например, оливковое масло и воду). Величина K определяется экспериментально для каждого конкретного вещества как отношение концентрации данного вещества в липидной фазе к его концентрации в воде. Спектр коэффициентов распределения для неэлектролитов весьма широк и различается на несколько порядков. Например, для трехатомного спирта глицерола (глицерина) этот коэффициент в 1000 раз мень-

ше, чем для уретана. Плохая жирорастворимость глицерина обусловлена наличием в его молекуле трех гидроксильных групп, образующих водородные связи с водой, а наличие одной водородной связи приводит к уменьшению величины коэффициента распределения примерно в 40 раз.

Простая диффузия через липидный бислой характеризуется *кинетикой без насыщения*, т. е. скорость переноса вещества монотонно увеличивается при увеличении его концентрации во внеклеточной жидкости. Эта пропорциональность между концентрацией и скоростью проникновения вещества в клетку, сохраняющаяся в диапазоне практически всех возможных концентраций, отличает простую диффузию от облегченной (рис. 2).

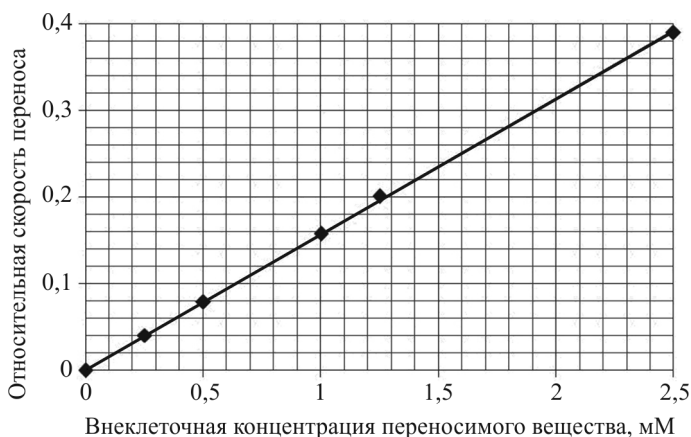


Рис. 2. Зависимость скорости поступления вещества в клетку путем простой диффузии от внеклеточной концентрации переносимого вещества

Облегченная диффузия. Транспорт некоторых веществ в клетку (как правило, гидрофильных или ионов) по градиенту концентрации через мембрану затруднен и осуществляется только после их соединения с молекулой специального переносчика. Такой процесс получил название «облегченная диффузия».

Транспорт вещества в клетку путем облегченной диффузии включает следующие этапы:

- *распознавание* – специфическое связывание переносчика с молекулой переносимого в клетку вещества и образование комплекса переносчика и транспортируемой молекулы;
- *транслокация* – перемещение образовавшегося комплекса от внешней стороны мембраны к внутренней;

- *высвобождение* молекулы переносимого вещества из комплекса с молекулой-переносчиком в цитозоль;

- *восстановление* – переносчик возвращается на внешнюю сторону мембраны.

Все переносчики – это белковые молекулы. Они не способны катализировать протекание биохимических реакций, но имеют ряд общих свойств с ферментами:

- способность специфически (избирательно) связываться с транспортируемыми молекулами;

- связывание переносчика с транспортируемыми молекулами может ингибироваться (блокироваться) специфическими ингибиторами.

При анализе зависимости скорости поступления вещества в клетку от его внеклеточной концентрации (т. е. кинетики поступления) в случае облегченной диффузии выявляется *кинетика с насыщением* (рис. 3). В этом случае крутизна графика, отражающего зависимость скорости поступления вещества в клетку от его внеклеточной концентрации, все время снижается, а при достижении определенной концентрации выходит на плато, и дальнейшее увеличение концентрации не приводит к росту поступления вещества в клетку. Скорость диффузии достигает максимума, когда все молекулы

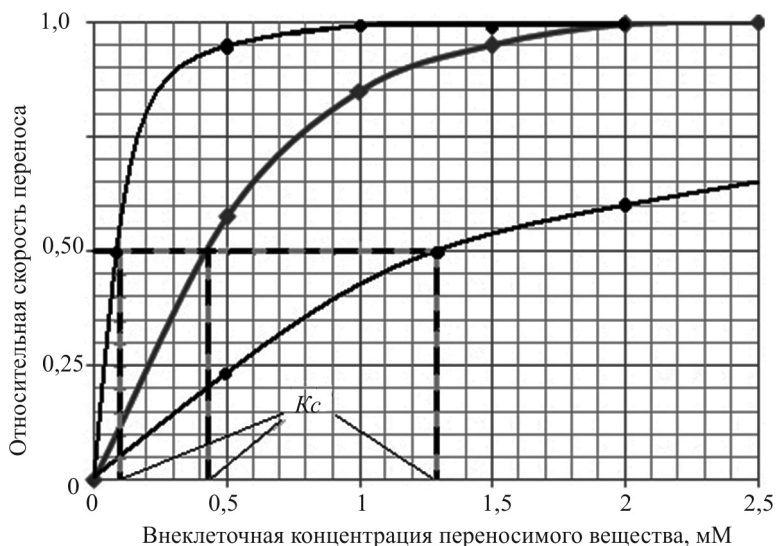


Рис. 3. Зависимость скорости поступления вещества в клетку путем облегченной диффузии от внеклеточной концентрации переносимого вещества

переносчика заняты переносимым веществом. При этом максимальная скорость переноса будет одинакова для всех молекул, способных связываться с данным переносчиком, но достигаться она будет при различных внеклеточных концентрациях переносимых молекул. Концентрация переносимого вещества, при которой скорость его транспорта через мембрану составляет половину максимальной, количественно характеризует специфичность молекулы переносчика по отношению к переносимому веществу и называется *константой связывания*. Чем меньше значение константы связывания, тем выше сродство молекулы переносчика и молекулы переносимого вещества. Например, константа связывания молекулы глюкозы с мембранным переносчиком равна 6,2 мМ. В то же время константа связывания этого переносчика с фруктозой, другим моносахаридом, близким по структуре к глюкозе, характеризуется константой связывания 2000 мМ. Именно поэтому при концентрации в крови 5,5 мМ глюкоза достаточно эффективно транспортируется в клетки, тогда как фруктоза с помощью данного переносчика туда практически не проникает. Таким образом, осуществляется избирательный трансмембранный перенос веществ. Кроме того, с помощью белков-переносчиков регулируется и скорость поступления веществ в клетки. Например, в жировых и мышечных клетках имеются два пула трансмембранных переносчиков глюкозы: непосредственно в плазматической мембране (функционирующие белки) и цитоплазматических везикулах (депонированные белки). Соотношение между пулами переносчиков регулируется гормоном инсулином. Повышение уровня инсулина в крови и связывание его с поверхностными инсулиновыми рецепторами является сигналом для начала движения цитоплазматических везикул к плазматической мембране, выхода из них белков-транспортёров, встраивания их в мембрану и резкого возрастания скорости поступления глюкозы в жировые и мышечные клетки.

Транспорт, при котором переносчик в результате одного транспортного цикла переносит через мембрану одну молекулу вещества, называется *унипорт*, например перенос в клетки глюкозы. *Симпорт* – переносчик транспортирует через мембрану одновременно две молекулы. При этом через мембрану одновременно могут перемещаться как две одинаковые, так и молекулы двух различных веществ. *Антипорт* – при движении переносчика от внешней стороны мембраны к внутренней переносится молекула одного вещества, а при движении в противоположном направлении – молекула другого вещества.

Диффузия через мембранные каналы. Еще один механизм, обеспечивающий возможность гидрофильным молекулам и неорганическим ионам Na^+ , K^+ , Cl^- проходить через липидный бислой, заключается в их трансмембранной диффузии по специальным заполненным водой каналам. Мембранные каналы находятся внутри так называемых каналобразующих

белков, пронизывающих насквозь клеточную мембрану. О существовании таких каналов и важной функции каналообразующих белков свидетельствуют результаты исследования искусственных липидных бислойных мембран. Эти мембраны имеют очень низкую проницаемость для неорганических ионов, однако при добавлении к ним небольшого количества каналообразующих белков, экстрагированных из клеточных мембран, наблюдается существенное увеличение ионной проницаемости: она становится близкой к проницаемости природных клеточных мембран. Диаметр мембранных каналов составляет не более 0,7–1,0 нм. Для обеспечения необходимого потока ионов в клетку достаточно, чтобы на долю ионных каналов приходилась лишь очень малая часть площади мембраны. Данный вывод подтверждает следующий пример. При добавлении к мембранам (природным или искусственным) антибиотика *нистатина* его молекулы образуют каналы в мембранах, через которые могут проходить нейтральные молекулы и анионы, чей диаметр не превышает 0,4 нм: вода, мочевины, ионы хлора. Катионы через эти каналы проходить не могут прежде всего потому, что вдоль стенок канала находятся фиксированные положительные заряды. Показано, что включение нистатина в искусственные мембраны, приводящее к увеличению их площади всего на 0,001–0,01 %, приводит к 100 000-кратному увеличению мембранной проницаемости для ионов хлора.

Сравнительно недавно установлено, что водообмен между клеткой и межклеточной средой осуществляется с помощью специальных каналообразующих белков, получивших название *аквапорины* или *водные каналы*. В 2003 г. за открытие аквапоринов Питер Эгр получил Нобелевскую премию по химии, а Родрик Маккиннон – за изучение структуры и механизмов работы калиевых каналов. Аквапорины содержатся в клеточных мембранах различных организмов от бактерий до человека. У млекопитающих описано 13 типов аквапоринов, из них 6 обнаружены в почках. Одни типы аквапоринов избирательно пропускают только молекулы воды, позволяя ей поступать в клетку и покидать ее. Другие аквапорины пропускают не только воду, но и глицерин, CO₂, аммиак и мочевины, в зависимости от диаметра и формы образуемой поры, однако все аквапорины совершенно непроницаемы для заряженных частиц, и это свойство позволяет им сохранять электрохимический мембранный потенциал.

Активный транспорт. В живых клетках и отдельных клеточных компартментах некоторые из растворенных веществ и ионов находятся в концентрации значительно большей, чем в окружающей среде, тогда как концентрация других веществ и ионов, напротив, меньше внутри компартмента, чем снаружи. Эта неравновесная трансмембранная разность концентраций поддерживается благодаря активным процессам трансмембранного переноса, постоянно потребляющим химическую энергию, запасенную в молекулах органических фосфагенов, главным образом АТФ. Системы, с помощью которых осуществ-

ляется активный транспорт веществ против их концентрационного градиента, обобщенно называют *мембранными насосами*. Если с помощью веществ-ингибиторов выключить такой насос, то активный транспорт прекратится, распределение вещества, для которого мембрана проницаема, начнет определяться пассивной диффузией, и концентрация вещества по обе стороны плазматической мембраны постепенно сместится к равновесному состоянию.

Активный транспорт имеет следующие основные особенности:

1) осуществляется против концентрационного градиента. Например, натриевый насос, перекачивающий ион Na^+ из клетки во внеклеточную среду, обеспечивает соотношение концентраций Na^+ в клетке и во внеклеточной жидкости 1 к 10;

2) требует энергии, которая в большинстве случаев получается в результате гидролиза АТФ АТФ-азами, присутствующими в мембранах. Метаболические яды, подавляющие синтез АТФ, замедляют и активный транспорт;

3) большинство мембранных насосов в высшей степени специфичны. Натриевый насос, например, не способен переносить ион лития, хотя по своим свойствам последний очень близок к натрию;

4) некоторые мембранные насосы откачивают из клетки одну разновидность молекул или ионов и закачивают в противоположном направлении другую (антипорт). Это свойство можно проиллюстрировать на примере натриевого насоса. Его рабочий цикл включает в себя обязательный обмен двух ионов калия, поступающих в клетку из внеклеточной среды, на три иона натрия, переносимых в обратном направлении. Если удалить из внеклеточного пространства ионы калия, то и ионы натрия не будут выводиться из клетки;

5) может избирательно подавляться блокирующими агентами. Сердечный гликозид *убаин*, введенный во внеклеточную среду, блокирует калий-натриевый насос, препятствуя связыванию ионов калия с соответствующим участком ионного насоса.

Транспорт в клетки белков, полисахаридов и других макромолекул осуществляется путем *эндоцитоза*.

1.4. Осмос и осмотическое давление

Два явления – *осмос* и *мембранный потенциал*, возникающие вследствие разделения растворов избирательно (селективно) проницаемыми мембранами, играют важную физиологическую роль в растительных и животных организмах.

Осмотическое давление – это важное коллигативное свойство живых систем. Коллигативными называются свойства растворов, зависящие только от концентрации растворенного вещества, но не от его химической структуры. Осмотическое давление появляется в случае разделения двух растворов мембраной, непроницаемой для растворенных веществ, и обусловлено *осмосом*, т. е. *движением воды вдоль ее концентрационного градиента*. Осмотическим давлением раствора называют наименьшее давление, которое необходимо приложить к раствору для предотвращения протекания к нему растворителя через полупроницаемую мембрану. Чем выше концентрация веществ в растворе, тем выше осмотическое давление. Однако следует учитывать, что, поскольку коллигативные свойства зависят от суммарного количества растворенных частиц, приходящихся на единицу объема растворителя, осмотическое давление 10 мМ раствора NaCl (электролита, диссоциирующего при такой концентрации на 90 %) и 20 мМ раствора сахарозы почти эквивалентны. Для учета эффекта диссоциации растворенных молекул осмотические свойства раствора в физиологии часто характеризуют такой величиной, как *осмолярность*. За один осмоль принята концентрация, при которой $6,022 \cdot 10^{23}$ частиц растворено в одном литре раствора. Для недиссоциирующего вещества один осмоль равен одному молю, а осмолярность – молярности. Осмолярность плазмы крови и внутренней среды организма в целом составляет в норме около 300 миллиосмоль/л. Два раствора, в которых создается одинаковое осмотическое давление, называются *изоосмотическими*. Если же в одном из растворов осмотическое давление меньше, то по отношению к другому он называется *гипоосмотическим*, а в противном случае – *гиперосмотическим*. Все растворы, содержащие в единице объема одинаковое количество частиц, являются *изоосмотическими*. Перемещение воды между двумя растворами, разделенными идеальной мембраной (т. е. пропускающей только воду), будет всегда направлено от *гипоосмотического* раствора к *гиперосмотическому*. Однако биологические мембраны не являются идеальными и в той или иной степени проницаемы для различных ионов.

Если мембрана разделяет два изоосмотических раствора различных веществ, например NaCl и KCl, и при этом пропускает только ионы K^+ , эти ионы, перемещаясь по концентрационному градиенту в раствор, содержащий первоначально NaCl, сделают его гиперосмотичным и приведет к перемещению воды от раствора KCl к раствору NaCl. Так, эритроциты крови, помещенные в раствор NaCl, изоосмотичный плазме крови, не меняются в объеме, но набухают в растворе мочевины, также изоосмотичном плазме. Это различие обусловлено значительно более высокой способностью мочевины проникать и накапливаться во внутренней среде эритроцитов по сравнению с NaCl. В результате по мере нагружения клетки мочевиной в нее под действием осмо-

тического давления проникает все больше молекул воды, она набухает и может даже разрушиться.

Для характеристики осмотического влияния конкретных растворов на живые клетки или ткани используют понятие *тоничность*. В отличие от осмотического давления тоничность раствора зависит не только от концентрации растворенного вещества, но и от скорости его проникновения ($V_{\text{пр}}$) внутрь клеток. Осмотичность раствора и его тоничность совпадают только в том случае, когда растворенное вещество плохо проникает в клетки или ткани ($V_{\text{пр}} = 0$).

Тоничность всегда определяется экспериментально по реакции клеток или тканей на погружение их в исследуемый раствор. Раствор называется *изотоническим* по отношению к данной клетке или ткани, если клетка или ткань, погруженные в него, не набухают и не сжимаются. Если ткань набухает, раствор называют *гипотоничным* по отношению к ткани, а если сжимается – *гипертоничным*. Таким образом, об изотоничности, гипотоничности и гипертоничности имеет смысл говорить лишь по отношению к системе «раствор – живые клетки (или ткань)». Свойство изотоничности особенно важно учитывать, изготавливая растворы для внутривенных инъекций, в противном случае может произойти набухание и лизис эритроцитов (гемолиз). Обычно при внутривенных инъекциях лекарственный препарат вводят в изотоническом для клеток крови 0,9% растворе NaCl на дистиллированной воде, получившем название «физиологический раствор». Поддержание постоянства осмотического давления является одним из важнейших элементов гомеостаза как организма в целом, так и составляющих его систем.

На клеточном уровне осмотический гомеостаз поддерживается благодаря активному транспорту и функционированию мембранных насосов, откачивающих из клетки ионы натрия и обеспечивающих поддержание осмотического равновесия между цитозолем и внеклеточной жидкостью. В норме содержимое клеток незначительно гипертонично по отношению к внеклеточной среде, что обеспечивает небольшое внутриклеточное давление, или *тургор*, поддерживающий форму клеток. Нарушение (ингибирование) активного транспорта ведет к возрастанию внутриклеточной концентрации натрия, внутриклеточное содержимое становится очень гипертонично по отношению к внешней среде. В клетку начинает интенсивно поступать вода, что ведет к ее набуханию, деформации и даже разрыву клеточной мембраны. На уровне организма важную роль в поддержании осмотического или водно-электролитного гомеостаза играют специальные осморорецепторы, способные определять существующее в организме и его составляющих осмотическое давление, и почки, через которые из организма выделяются как избыток воды, так и постоянно накапливающиеся осмоактивные вещества.

Глава 2

БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ

2.1. Энергетические процессы в цитоплазме, гликолиз

В цитозоле происходят наиболее древние в эволюционном плане процессы образования и утилизации химической энергии, получившие название *гликолиз* или *анаэробное окисление глюкозы*. Гликолиз – это последовательность реакций, в результате которых молекула глюкозы, содержащая шесть атомов углерода, расщепляется до двух трехуглеродных молекул молочной кислоты. (В водной среде молочная и другие органические кислоты диссоциируют с образованием соответствующих анионов, имеющих собственное название. В частности, анион молочной кислоты называется «лактат».) Для такого превращения требуется десять последовательных ферментативных реакций, т. е. химических реакций, катализируемых ферментами. Начальной реакцией является фосфорилирование глюкозы до *глюкозо-6-фосфата* в результате трансфосфорилирования с АТФ. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется *гексокиназа*. Другие реакции и катализирующие их ферменты подробно изложены во всех руководствах по биохимии. Здесь мы рассмотрим только вопрос об энергетике анаэробного окисления. Поскольку в результате гликолиза происходит уменьшение суммарной упорядоченности в системе, при окислении глюкозы имеет место и уменьшение свободной энергии, и эта величина составляет около 50 ккал (47,4 ккал) на моль утилизированной глюкозы. Приблизительно 50 % выделившейся энергии (22–26 ккал) расходуется на синтез в ходе гликолиза двух молекул АТФ, остальное количество рассеивается в форме тепла. Таким образом, *коэффициент полезного действия* анаэробного окисления превышает 50 %.

Несмотря на то что КПД гликолиза весьма высок, анаэробное образование АТФ относительно неэффективно, так как возникающие в процессе гликолиза конечные продукты все еще несут в себе значительное количество энергии, которая могла бы выделиться при более глубоком их окисле-

нии. Именно поэтому для большинства клеток животных гликолиз служит лишь поставщиком субстрата для аэробного пути окисления, проходящего в митохондриях. В этом случае гликолиз включает не 10, а 9 ферментативных реакций, и конечным продуктом является пировиноградная кислота (анион пировиноградной кислоты называется «пируват»). Образующийся пируват поступает в митохондрии, где полностью окисляется до CO_2 и H_2O в более молодом в эволюционном отношении энергетическом процессе – цикле трикарбоновых кислот. Тем не менее при некоторых условиях, например в работающей с максимальной нагрузкой мышце, гликолиз служит основным источником энергии. Рассмотрим более подробно физиологическую сторону этого феномена. Характерной особенностью мышц является наличие в них значительного количества *гликогена* – сильно разветвленного полисахарида, состоящего из остатков *D*-глюкозы. Гликоген используется исключительно в качестве резервного источника глюкозы для гликолиза и образования АТФ во время интенсивного мышечного сокращения. В этом случае он предварительно расщепляется ферментом фосфорилазой гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата. Затем глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, который и вовлекается в последующие реакции гликолиза. При физической нагрузке расщепление гликогена по гликолитическому пути многократно увеличивается, а поступление кислорода в клетки может даже снизиться из-за затруднения в кровоснабжении сильно сокращенной мышцы. В результате этого для процессов аэробного окисления пирувата в митохондриях становится недостаточно кислорода, и его количество в митохондриях и цитозоле значительно увеличивается. В этих условиях гликолиз в мышечных клетках переключается на анаэробный путь. Часть пирувата вовлекается в реакцию 10 гликолиза, катализируемую ферментом *лактатдегидрогеназой* и продуктом которой является молочная кислота. Поэтому при высоких физических нагрузках концентрация молочной кислоты в мышечных клетках сильно возрастает, она проникает в межклеточное пространство и даже в кровь. В результате ее диссоциации на лактат и H^+ развивается молочнокислый ацидоз, обуславливающий чувство утомления и боли в мышцах.

После того как мышца перестанет выполнять физическую работу и ослабится, интенсивность расщепления гликогена и гликолиза в мышечных клетках резко уменьшается, а их снабжение кислородом возрастает. Активируются процессы аэробного окисления пирувата в митохондриях, и его концентрация в цитозоле снижается. Направление реакции пируват – лактат меняется в противоположную сторону, и тот же фермент – лактатдегидрогеназа – превращает накопившуюся в мышце молочную кислоту в пируват. Кроме того, молочная кислота через кровь поступает в печень, где используется для синтеза глюкозы в анаболическом процессе, протекающем в направлении, противоположном гликолизу и получившем название *глюконеогенеза*.

Таким образом, соотношение процессов гликолиза и глюконеогенеза и их интенсивность в различных типах клеток, в частности мышцах и печени, существенно различаются. Органная и тканевая специфичность в полной мере касается и других метаболических реакций. Каждый тип клеток и тканей обладает своими характерными особенностями метаболизма и тесно взаимодействует друг с другом.

2.2. Энергетические процессы в митохондриях

Строение и молекулярная организация митохондрий. Митохондрии, число которых в клетке составляет несколько сотен (в гепатоцитах – 1700), занимают значительную часть цитоплазмы почти всех эукариотических клеток (в гепатоцитах – около 22 %). Обычно митохондрии скапливаются вблизи мест интенсивного потребления АТФ. Например, в сердечной мышце они располагаются между миофибриллами. Митохондрии достаточно велики (до 1 мкм и больше), и их можно увидеть в световой микроскоп как вытянутые и похожие на бактерии цилиндры. Микрокинсьемка живых клеток позволила установить, что митохондрии не являются жесткими образованиями, напротив, они очень подвижны и пластичны, постоянно изменяют свою форму и даже сливаются друг с другом, а затем вновь разделяются.

Детальное строение митохондрий, их ультраструктура были выяснены с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что каждая митохондрия (рис. 4) окружена двумя бислойными мембранами, играющими ключевую роль в ее функции. Мембраны образуют два изолированных митохондриальных компартмента: внутренний *матрикс* и узкое *межмембранное пространство*. Основная рабочая часть митохондрии – это матрикс и окружающая его *внутренняя мембрана*. Площадь внутренней мембраны в 4,5 раза больше внешней, так как она образует многочисленные складки – кристы, увеличивающие общую поверхность. На внутренней мембране локализована система окислительного фосфорилирования, включающая АТФ-синтазу и *дыхательную цепь* (*электрон-транспортная цепь митохондрий*). Важнейшим физиологическим свойством внутренней мембраны является ее непроницаемость для ионов.

Матрикс представляет собой высококонцентрированный раствор сотен различных ферментов, в том числе ферментов *цикла трикарбоновых кислот*. В матриксе находятся митохондриальная ДНК и митохондриальные рибосомы.

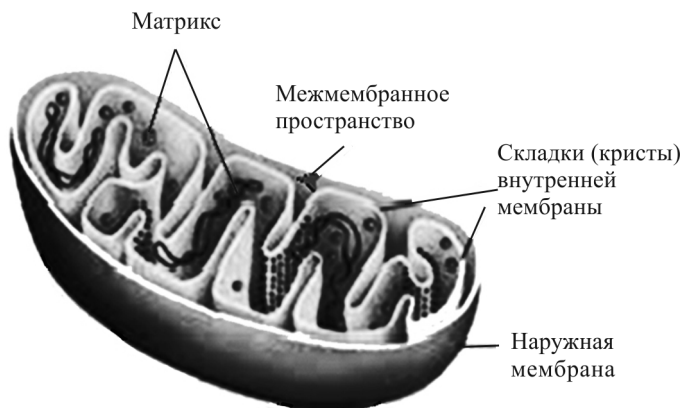


Рис. 4. Ультраструктура митохондрий

Цикл трикарбоновых кислот. В большинстве клеток и тканей аэробных организмов образующаяся в результате гликолиза пировиноградная кислота поступает в *матрикс митохондрий*, где она декарбоксилируется, т. е. от нее отщепляется молекула углекислого газа, а оставшаяся двухуглеродная *ацетильная группа* соединяется с *коферментом А (CoA)*, образуя *ацетил-CoA*. Энергия, выделяющаяся в результате этой реакции, расходуется на перевод специальной молекулы – переносчика водорода из окисленной в восстановленную форму. Переносчик водорода называется *никотинамидадениндинуклеотид (NAD)* или NAD^+ (окисленная форма) и $NADH$ или $NADH + H^+$ (восстановленная форма). Таким образом, молекулы NAD и сходного с ним по структуре и функции *флавинадениндинуклеотида (FAD)*, подобно фосфагенам, способны запасать и переносить энергию, но не в виде макроэргической фосфатной связи, а в виде активированных атомов водорода. Ацетил-CoA, образовавшийся из пировиноградной кислоты, подвергается дальнейшему окислению в *цикле трикарбоновых кислот* (рис. 5).

В результате первой реакции цикла из ацетил-CoA и щавелевоуксусной кислоты (в водной среде существует в виде иона оксалоацетата), содержащей четыре атома углерода, образуется трикарбоновая шестиуглеродная *лимонная кислота* (цитрат). Поэтому цикл трикарбоновых кислот называют иногда *циклом лимонной кислоты*. Затем лимонная кислота превращается в *изолимонную* (изоцитрат). В результате следующей реакции – декарбоксилирования – шестиуглеродная молекула изолимонной кислоты превращается в пятиуглеродную *α -оксоглутаровую кислоту* (*α -оксоглутарат*), и происходит восстановление NAD в $NADH$. Далее *α -оксоглутаровая кислота* де-

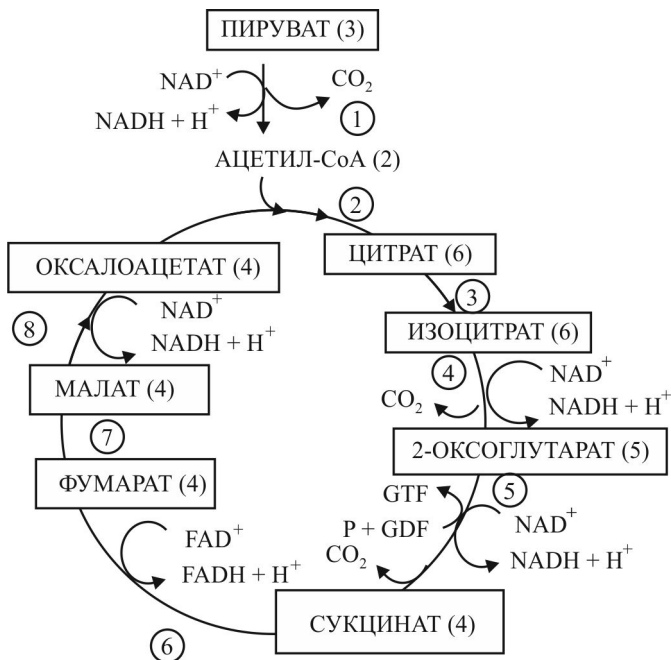


Рис. 5. Цикл трикарбоновых кислот

карбоксилируется до *янтарной* (сукцинат). При этом выделяющаяся энергия не рассеивается в виде тепла, а затрачивается на восстановление еще одной молекулы NAD в NADH и фосфорилирование *гуанозиндифосфата* (GDP) в *гуанозинтрифосфат* (GTP). В результате трех следующих реакций янтарная кислота последовательно превращается в *фумаровую кислоту* (*фумарат*), *яблочную* (*малат*) и *щавелевоуксусную* и восстанавливается по молекулам FAD и NAD . Таким образом, ферментативные реакции цикла трикарбоновых кислот протекают так, что субстрат первой реакции – *щавелевоуксусная кислота* – является и продуктом последней восьмой реакции, т. е. регенерируется после каждого оборота цикла, и процесс запускается вновь. В результате элементарного цикла два углеродных атома, имевшихся в ацетил- CoA , превращаются в CO_2 . Циклический характер последовательности реакции окисления ацетил- CoA и ее основные этапы в 1937 г. установил английский биохимик немецкого происхождения, лауреат Нобелевской премии (1953) Ханс Кребс. Поэтому процесс окисления ацетил- CoA имеет еще одно название – *цикл Кребса*. Благодаря тому, что окисление совершается постепенно, через серию относительно небольших изме-

нений свободной энергии, выделяющаяся энергия не рассеивается в виде бесполезного тепла, а затрачивается на восстановление трех молекул NAD в NADH, одной молекулы FAD в FADH и образование высокоэнергетической фосфатной связи. Эта связь образуется в результате фосфорилирования гуанозиндифосфата в гуанозинтрифосфат, который легко обменивается фосфатной группой с АДФ с образованием АТФ.

Следует иметь в виду, что источником ацетил-СоА для окисления в ЦТК наряду с гликолизом являются и другие биохимические процессы, протекающие в клетках, в частности окисление аминокислот и жирных кислот. Четыре молекулы NADH, включая и образовавшуюся при окислении пирувата в ацетил-СоА, и молекула FADH поступают в дыхательную цепь, где переносимые ими атомы водорода окисляются молекулярным кислородом до воды. Выделяемая при этом энергия затрачивается на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата в результате сложнейшего процесса, получившего название *окислительного фосфорилирования*.

Окислительное фосфорилирование: молекулярная организация дыхательной цепи. В основе механизма извлечения энергии в *дыхательной цепи* лежит принцип, характерный и для других метаболических процессов, а именно: сильно экзергоническая реакция $H_2 + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$ разбита на множество небольших шагов, так что высвобождаемая энергия может переходить в высокоэнергетические фосфатные связи, а не рассеиваться в виде тепла. Каким же образом такая простая реакция разбивается на отдельные этапы? Это происходит благодаря тому, что прежде чем поступить в дыхательную цепь, атомы водорода расщепляются на электроны и протоны. Электроны передаются через серию переносчиков, встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану, на кислород, а протоны поступают в матрикс. Прохождение электронов от одного переносчика к следующему сопровождается выделением энергии, которая используется на фосфорилирование АТФ. Дыхательная или электронтранспортная цепь (рис. 6) включает всего около 40 различных белков, объединенных в три больших ферментных комплекса, встроенных во внутреннюю мембрану митохондрий.

NADH-дегидрогеназный комплекс – самый большой из дыхательных ферментных комплексов – имеет молекулярную массу свыше 800 000 и содержит более 22 полипептидных цепей. Данный комплекс принимает электроны от NADH и передает их на убихинон – небольшую, подвижную жирорастворимую молекулу, восстанавливая ее до убихинола. Убихинол передает электроны на второй комплекс дыхательных ферментов – комплекс *b-c₁*, окисляясь при этом в исходный убихинон. Сокращенно убихинон обозначают Q, а убихинол – QH₂.

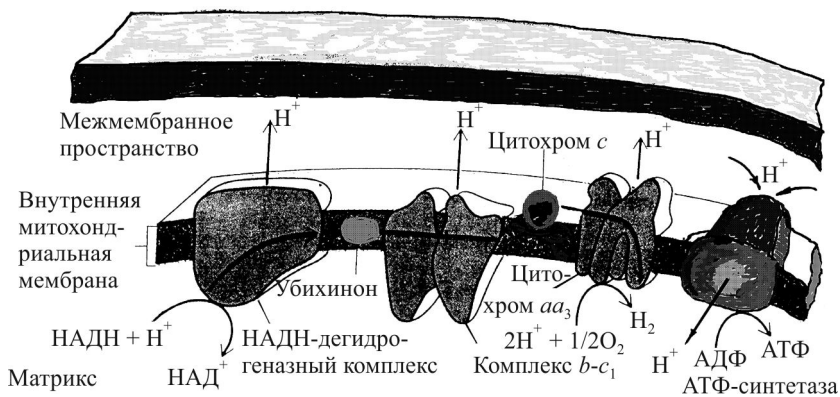


Рис. 6. Молекулярная организация и локализация системы окислительного фосфорилирования

Комплекс $b-c_1$ состоит из восьми разных полипептидных цепей и, вероятно, существует в виде димера с молекулярной массой 500 000. На этот комплекс электроны поступают с убихинола и передаются с него на *цитохром c* – небольшой периферический мембранный белок, переносящий их на цитохромоксидазный комплекс.

Цитохромоксидазный комплекс (цитохром aa_3) – наиболее изученный из рассмотренных выше комплексов. Он состоит из восьми различных полипептидных цепей, из которых формируется димер с молекулярной массой 300 000; каждый мономер содержит два атома меди. Данный комплекс – единственный компонент в дыхательной цепи, способный переносить электроны непосредственно на кислород. В большинстве клеток около 90 % всего поглощаемого клеткой кислорода взаимодействует с цитохромоксидазой. Токсичность таких ядов, как цианиды, обусловлена способностью прочно присоединяться к цитохромоксидазному комплексу и блокировать тем самым весь транспорт электронов.

В митохондриях на один NADH-дегидрогеназный комплекс приходится 3 комплекса $b-c_1$, 7 цитохромоксидазных комплексов, 50 молекул убихинона и 9 молекул цитохрома c . В отличие от большинства клеточных белков белки-переносчики, входящие в состав второго и третьего комплекса ДЦ, поглощают свет в видимой части спектра, и эта способность обуславливает наличие у них интенсивной окраски, причем характер окраски изменяется при переходе переносчиков из окисленного в восстановленное состояние. Наличие окраски послужило основанием для объединения белков-переносчиков в группу окрашенных белков – цитохромов. Окраска цитохромов обусловлена тем, что кроме апофермента – собственно белковой

части – в них присутствует и окрашенная небелковая простетическая группа – гем. Гем содержит порфириновое кольцо и атом железа. Именно последний принимает электрон от предыдущего переносчика, восстанавливаясь при этом из состояния Fe^{3+} в Fe^{2+} , а затем, вновь окисляясь, передает его на атом железа, входящий в состав последующего цитохрома. Кроме цитохромов гем входит в состав гемоглобина, где играет ключевую роль в транспорте кислорода и обуславливает красный цвет крови. Сходная с гемом структура, в которой атом железа замещен на атом магния, входит в состав хлорофилла и определяет зеленый цвет листьев.

Какие же силы заставляют электроны двигаться по дыхательной цепи и какова величина выделяемой при этом энергии? Чтобы разобраться в этом вопросе, рассмотрим его с позиции электрохимии. NADH и NAD, окисленные и восстановленные компоненты электронтранспортной цепи, H_2O и $1/2\text{O}_2$ являются *гальваническими*, или *окислительно-восстановительными парами*, так как один из членов такой пары превращается в другой при получении или удалении электронов. Каждая окислительно-восстановительная пара поддерживает определенное давление электронов, характеризующее величиной *восстановительного потенциала* (ВП), или *редокс-потенциала*. Все окислительно-восстановительные пары можно расположить в порядке возрастания их восстановительных потенциалов, определяемых по отношению к стандартному водородному полуэлементу или гальванической паре (2H^+ и H_2), потенциал которой произвольно принят за нулевой. Отрицательное значение восстановительного потенциала свидетельствует о высоком давлении электронов или способности конкретной пары отдавать электроны, и эта способность тем больше выражена, чем больше отрицательное значение восстановительного потенциала, и наоборот, положительный потенциал свидетельствует о преобладании способности принимать электроны. Величины восстановительных потенциалов основных компонентов дыхательной цепи митохондрий составляют:

NADH \rightarrow NAD	-0,32 в
FADH \rightarrow FAD	0,00 в
$\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}$	0,00 в
Комплекс $b-c_1$ ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)	+0,26 в
Цитохром aa_3 ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)	+0,53 в

Совокупность двух гальванических (окислительно-восстановительных) пар образует гальванический элемент. Разность потенциалов гальванического элемента (E), являющаяся движущей силой потока электронов (ЭДС), будет равна сумме ВП полуэлемента донора электронов, взятого с противоположным знаком, и ВП акцептора электронов. Именно ЭДС, возникающая благодаря разности потенциалов окислительно-восстановительных пар,

заставляет электроны двигаться по дыхательной цепи от полуэлемента с более отрицательным ВП к полуэлементу с менее отрицательным или положительным ВП. Рассматривая в качестве гальванических элементов митохондриальные дыхательные комплексы, можно вычислить следующие значения разности потенциалов в каждом комплексе:

Комплекс 1	Комплекс $b-c_1$	Цитохром aa_3
+0,32	0,00	-0,26
0,00	+0,26	+0,53
$E(в) = +0,32$	+0,26	+0,27

Величина E связана с величиной изменения свободной энергии ΔG окислительно-восстановительной реакции следующим уравнением:

$$\Delta G = -nEF,$$

где n – число переносимых электронов; F – число Фарадея, равное 23 060 кал/в. Зная, что от каждой молекулы NADH на кислород переносится два электрона, вычислим изменение свободной энергии на каждом комплексе:

Комплекс 1	Комплекс $b-c_1$	Цитохром aa_3
$\Delta G(\text{ккал}) = 2 \cdot 0,32 \cdot 23060 = -14,8$	-12	-12,4

Ввиду того что реакция фосфорилирования АДФ с образованием АТФ требует 11–13 ккал, можно сделать вывод, что при переносе пары электронов через каждый дыхательный комплекс изменение свободной энергии достаточно для сопряженного синтеза молекулы АТФ, а количества выделяемой свободной энергии за полный путь от NADH до кислорода (с образованием одной молекулы воды) достаточно для синтеза трех молекул АТФ. Если в качестве окисляемого агента используется FADH, электроны попадают в дыхательную цепь на уровне убихинона, минуя первый дыхательный комплекс. Поскольку ВП убихинона практически совпадает с ВП FADH, то уменьшения свободной энергии на этом этапе не происходит, и в результате при переносе электронов на конечный акцептор (кислород) образуются всего две молекулы АТФ.

Хемиосмотический механизм сопряжения дыхания и фосфорилирования. Одним из наиболее сложных и интригующих в биологии долгое время являлся вопрос о том, каким образом электрохимическая энергия переноса электронов трансформируется в энергию макроэргической связи молекул АТФ. Ответ на него дал в 60-е гг. XX в. английский биохимик Питер Митчелл. В соответствии с теорией П. Митчелла энергия, выделяющаяся при прохождении электронов от одного переносчика к следующему, используется на перекачивание протонов (H^+) из матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство (см. рис. 6). В результате по обе

стороны внутренней мембраны создается, во-первых, разность концентраций протонов, или химический градиент (потенциал), и, во-вторых, возникает асимметрия в распределении электрических зарядов: избыток положительных в межмембранном пространстве и избыток отрицательных зарядов в матриксе, т. е. электрический градиент.

По мере возрастания суммарного электрохимического градиента для закачивания протонов в межмембранное пространство интактной митохондрии требуется все больше энергии. И в момент, когда величины энергии, необходимой для перекачивания протонов и выделяющейся при переносе электронов в дыхательной цепи, сравниваются, устанавливается динамическое равновесие, при котором перекачивание протонов и суммарный перенос электронов от NADH на кислород прекращаются.

Наличие в митохондриях электрохимического протонного градиента обуславливает возможность утечки протонов обратно в матрикс, вниз по этому градиенту. Поскольку внутренняя мембрана непроницаема для ионов, это движение осуществляется через специальные мембранные каналы, перекрытые ферментом АТФ-синтетазой. Подобно потоку воды, протекающему через турбину генератора и заставляющего эту турбину вращаться, поток протонов заставляет АТФ-синтазу образовывать АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Очевидно, что любое нарушение целостности внутренней мембраны митохондрий, позволяющее протонам беспрепятственно проходить через нее, минуя мембранные каналы, будет приводить к разобщению дыхания и фосфорилирования.

Предложенный П. Митчеллом механизм получил название *хемиосмотического сопряжения*, поскольку процесс утилизации химической энергии (хеми) вместо образования промежуточных высокоэнергетических соединений, фосфорилирующих АДФ (как это происходит при гликолизе или ЦТК), включает стадию преобразования химической энергии в осмотическую.

Механизмы перекачивания протонов компонентами дыхательной цепи еще не вполне ясны. Считается, что каждый комплекс действует как энергопреобразующее устройство, направляя энергию, выделяющуюся при прохождении электронов, на перемещение протонов через мембрану.

Ключевым элементом в механизме использования протонного градиента для фосфорилирования АДФ является фермент АТФ-синтаза (*FoF1*- АТФ-аза). Этот фермент имеет молекулярную массу 500 000 дальтон и составляет около 15 % всего белка внутренней митохондриальной мембраны. АТФ-синтаза состоит из двух субъединиц: фактора *F1* (*F1*- АТФ-аза) и фактора *Fo* (олигомицинчувствительный фактор), который представляет собой интегральный белок, имеющий внутреннюю пору, или трансмембранный канал. Синтез АТФ происходит только тогда, когда протоны движутся через этот

канал из межмембранного пространства в матрикс по электрохимическому градиенту. Оба процесса взаимосвязаны: протоны не способны проскальзывать без сопутствующего синтеза АТФ, а последний происходит только при перемещении протонов через мембрану. Чем выше концентрация АТФ и ниже концентрация АДФ, тем меньше протонов будет проскальзывать через канал АТФ-синтетазы, что в свою очередь снижает скорость переноса электронов по дыхательной цепи.

В реальной митохондрии энергия, требуемая на фосфорилирование АДФ, тем больше, чем выше концентрация АТФ и ниже концентрации АДФ и неорганического фосфата (т. е. чем больше величина коэффициента АТФ/АДФ). Протоны будут проходить через трансмембранный канал, а АТФ-синтетаза будет синтезировать АТФ до тех пор, пока величина коэффициента АТФ/АДФ не станет такой, что энергии, требуемой на фосфорилирование одной молекулы АДФ, понадобится больше, чем ее выделяется при движении протона по электрохимическому градиенту. Теоретически при таких условиях перенос протонов через трансмембранные каналы и синтез АТФ должны прекратиться, однако в митохондриях живых клеток величина коэффициента АТФ/АДФ постоянно уменьшается в результате использования АТФ для совершения различных видов работы.

При увеличении функциональной нагрузки возрастает использование АТФ. Снижение коэффициента АТФ/АДФ активирует процессы фосфорилирования, а следовательно, и ток протонов через трансмембранный канал АТФ-азы. Чем выше скорость этой реакции, тем больше протонов перетекает в матрикс, снижая при этом протонный электрохимический потенциал. Для восстановления электрохимического потенциала активируется транспорт электронов на кислород, т. е. усиливается дыхание. Благодаря наличию подобных молекулярных механизмов, получивших название *дыхательного контроля*, обеспечивается саморегуляция процесса окислительного фосфорилирования в клетке. Ключевую роль в дыхательном контроле играет коэффициент АТФ/АДФ.

2.3. Общий энергетический баланс окисления глюкозы в аэробной клетке

При расщеплении глюкозы в процессе гликолиза образуются две молекулы пировиноградной кислоты, две молекулы АТФ и две молекулы NADH. Последние в случае функционирования клетки в условиях анаэробного метаболизма используются для образования из пировиноградной кислоты молочной, а при аэробном метаболизме NADH транспортируется в митохондрии, где из каждой такой молекулы воспроизводятся три молеку-

лы АТФ. ПВК является субстратом ЦТК, и при его полном окислении образуется 1 молекула АТФ (ГТФ), 4 молекулы NADH или 12 молекул АТФ и 1 FADH, дающий в результате окислительного фосфорилирования 2 молекулы АТФ.

Общий баланс окисления глюкозы

● Образование АТФ:

гликолиз: $2 + 2 \cdot 3 = 8$;

ЦТК + окислительное фосфорилирование: $2 (1 + 14) = 30$;

всего: $8 + 30 = 38$.

● Изменение свободной энергии при окислении глюкозы до углекислого газа и воды: 686 ккал/моль.

● Изменение свободной энергии при синтезе молекулы АТФ из АДФ: 11–13 ккал.

● Общее изменение свободной энергии при синтезе 38 молекул АТФ: 418(494) ккал.

● КПД: $418(494)/686 \cdot 100 \% = 61 \% (72 \%)$.

Глава 3 КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ

3.1. Структура и функции эндоплазматического ретикулула

Все эукариотические клетки имеют *эндоплазматический ретикулум* (ЭР). Площадь его чрезвычайно извилистой мембраны обычно составляет более половины общего количества клеточных мембран. Хотя мембрана эндоплазматического ретикулума имеет многочисленные складки и изгибы, пронизывающие всю цитоплазму, полагают, что она образует непрерывную поверхность, ограничивающую единое внутреннее пространство. Это внутреннее пространство, называемое *полостью ЭР*, занимает 10 и более процентов от объема клетки. Чтобы отделить для последующего изучения ЭР от других компонентов клетки, ткани или отдельные клетки разрушают в специальных гомогенизаторах. В результате этой процедуры ЭР распадается на множество мелких пузырьков – *микросом*, которые относительно легко отделить от других клеточных органелл последовательным (дифференциальным) центрифугированием (рис. 7). Получаемый таким образом осадок, содержащий микросомы, называют *микросомальной фракцией*.

Морфологически различают *гладкий* и *гранулярный (шероховатый)* ЭР. Если сравнивать ферментативную активность и полипептидный состав гладкого и шероховатого ЭР, то оказывается, что эти параметры достаточно сходны, хотя и неидентичны. Гранулярность ЭР обусловлена наличием на его поверхности, обращенной к цитозоллю, рибосом, на которых происходит синтез всех секретируемых клеткой белков, а также белков, входящих в состав различных клеточных мембран. Рибосомы представляют собой нуклеопротеидные частицы (1:1) диаметром 200–250 Å (20–25 нм) и молекулярной массой 5–10⁶, состоящие из большой и малой субъединиц. Следует отметить, что в цитоплазме кроме рибосом, связанных с мембранами ЭР, имеются рибосомы, не прикрепленные к каким-либо внутриклеточным мембранам и образующие популяцию «свободных» рибосом. Все рибосомы совершенно идентичны, а их локализация в клетке определяется природой взаимодействующих с ними в данный момент времени

молекул информационной (матричной) РНК и синтезируемого белка. Если с рибосомой связалась информационная РНК, кодирующая синтез белка, поступающего в ЭР, то вначале синтезируется сигнальный фрагмент, благодаря которому весь белоксинтезирующий комплекс присоединяется к ЭР. Сигнальный фрагмент проникает в полость ЭР и по мере дальнейшего синтеза белковой молекулы протягивает ее за собой подобно тому, как иголка тянет нитку через ткань. Если сигнальный фрагмент не синтезируется, то рибосома и образующийся белок остаются в цитозоле. Вновь синтезированные белки сортируются по мере того, как они продвигаются от места синтеза через полость ЭР к аппарату Гольджи. Судьба каждого белка в процессе сортировки определяется все тем же сигнальным участком или связанным с белком сигнальным пептидом. Кроме синтеза белков ЭР играет важнейшую роль и в липидном синтезе. На мембранах ЭР производится большинство липидов для мембран митохондрий, аппарата Гольджи, лизосом, пероксисом, плазматической мембраны.

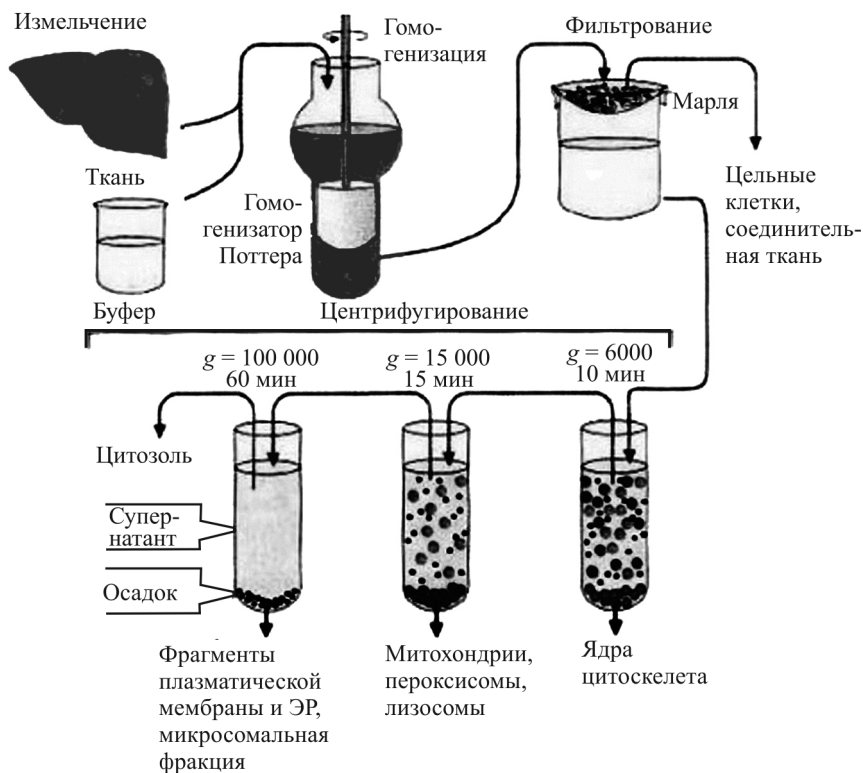
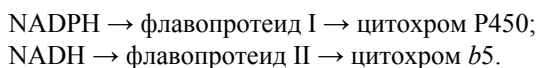


Рис. 7. Выделение отдельных органелл (субклеточных фракций) методом дифференциального центрифугирования

Участки ЭР, не несущие связанных рибосом, т. е. *гладкий ЭР*, как правило, присутствуют в клетках в очень небольших количествах. Однако существуют типы клеток, в которых гладкий ЭР хорошо развит и выполняет особые функции. В частности, он преобладает в клетках надпочечников и половых желез, специализирующихся на производстве стероидных гормонов из холестерина (холестерина).

Клетки печени, или *гепатоциты*, также богаты гладким ЭР. Здесь гладкий ЭР – основное место, где образуются липопротеиновые частицы (частицы, образованные белковыми и липидными молекулами), предназначенные на экспорт, т. е. для транспорта с током крови в другие ткани и органы. На этих же мембранах расположены ферменты, катализирующие реакции детоксикации липофильных соединений. В результате таких реакций обезвреживаются как ксенобиотики (т. е. вещества, не образующиеся в организме, а поступающие извне), так и вредные соединения, возникающие в процессе метаболизма. Большинство лекарств являются ксенобиотиками и вовлекаются в реакции детоксикации, протекающие в ЭР клеток печени. Наиболее изучены реакции детоксикации, катализируемые так называемой системой микросомального окисления. Эта ферментная система включает две короткие электронтранспортные цепи, осуществляющие перенос электронов от доноров электронов, которыми являются NADH и химически очень сходный с ним NADPH, на молекулярный кислород. Каждая цепь включает фермент, окисляющий соответствующий донор и конечный цитохром; в случае использования NADPH – цитохром P450, а при использовании NADH электрон попадает на цитохром b5:



Выделяющаяся в результате переноса электронов энергия затрачивается не на образование макроэргических связей, как это происходит в митохондриях, а используется на активацию молекулярного кислорода и разрыв связи между атомами в молекуле. Один из атомов кислорода внедряется в молекулу потенциально вредных липофильных соединений, аккумулирующихся в мембранах ЭР с образованием гидроксильной группы (–ОН), а второй восстанавливается до воды. В результате реакции гидроксирования нерастворимый в воде лекарственный препарат или другой ксенобиотик, который мог бы накапливаться в мембранах, становится достаточно полярным, чтобы выйти из мембраны и оказаться в цитоплазме. (За счет гидроксильных групп образуются водородные связи между молекулой ксенобиотика и водой, а наличие одной водородной связи уменьшает коэффи-

циент распределения в системе «липид – вода» в 40 раз.) Реакции, катализируемые при участии микросомальных систем переноса электронов, относятся к первому этапу детоксикации. Второй этап детоксикации протекает уже в цитоплазме, где фермент *глутатион-S-трансфераза* катализирует реакции конъюгации гидроксилированных ксенобиотиков с водорастворимыми молекулами глутатиона. В итоге образующиеся продукты становятся настолько гидрофильными, что могут быть удалены из организма через почки с мочой.

Многokратное и в большом количестве введение в организм ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ, подвергающихся биотрансформации в гепатоцитах, приводит к усилению синтеза ферментов микросомального окисления и увеличению поверхности гладкого ЭР. Этот феномен получил название *индукция*. Способность ксенобиотиков к индукции варьирует в широких пределах. У одних веществ она может быть незначительной, тогда как другие соединения, получившие название *индукторы*, могут вызвать двукратное увеличение поверхности гладкого ЭР за несколько дней. Индукция ферментов микросомального окисления повышает эффективность первого этапа детоксикации и увеличивает скорость детоксикации ксенобиотиков. После прекращения поступления индукторов в организм и выведения их из печени избыток мембран гладкого ретикулума разрушается с помощью лизосом в процессе аутофагии (этот процесс будет подробно рассмотрен в следующей главе), и через 5 дней гладкий ЭР приобретает нормальный объем. Очень эффективными индукторами являются барбитураты – группа веществ, обладающих снотворным действием. Применение барбитуратов совместно с другими лекарственными препаратами может снизить эффективность использования последних, поскольку вследствие индукции ферментов микросомального окисления лекарственные препараты будут окисляться и выводиться из организма значительно быстрее, чем обычно (в норме).

В настоящее время установлено, что в гепатоцитах человека имеется широкий изоферментный спектр важнейшего элемента системы микросомального окисления цитохрома P450. Цитохромы P450 делят на семейства, при этом формы одного семейства имеют около 40 % подобия аминокислотного состава. Семейства подразделяют на подсемейства, члены которых должны обладать как минимум 65 % подобия аминокислотного состава. В соответствии с классификацией цитохрома P450 обозначаются аббревиатурой СYP. В названии формы первая цифра после аббревиатуры означает номер семейства. Буква после цифры характеризует подсемейство (А, В, С и т. д.), например СYP3А, СYP5С. Следующая цифра означает индивиду-

альный ген. Таким образом, «полное имя» для некоторых из наиболее важных в клиническом отношении изоформ выглядит, например, как CYP3A4 или CYP2D6.

Доказано, что индивидуальная чувствительность к лекарственным препаратам в значительной степени зависит от особенностей системы микросомального окисления, которые в свою очередь определяются соотношением изоферментов цитохрома P450. Выявление индивидуальных особенностей системы детоксикации и учет их при дозировке лекарственных препаратов – важная задача, которая должна быть решена практической медициной в недалеком будущем.

Одним из парадоксов процесса детоксикации ксенобиотиков в системе микросомального окисления является так называемый эффект метаболической активации, или *токсификации*. Оказывается, некоторые ксенобиотики, например бензпирен или галогензамещенные углеводороды, в процессе микросомального окисления образуют продукты значительно более токсичные, чем исходные соединения. Так, метаболизм четыреххлористого углерода в печени сопровождается образованием высокоактивных радикальных промежуточных соединений (интермедиатов), например $\text{CCl}_3\cdot$ и $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$, которые инициируют в гепатоцитах чрезвычайно опасные свободнорадикальные реакции, приводящие к развитию цирроза и рака печени. Следует отметить, что свободнорадикальные реакции являются ключевым механизмом, запускающим развитие патологических процессов в организме не только под действием токсичных ксенобиотиков, но и других факторов внешней среды: радиации, минеральной пыли, в первую очередь волокон асбеста, смога, повышенного или пониженного поступления кислорода.

3.2. Аппарат Гольджи, его структура и физиологическая роль

Аппарат Гольджи (комплекс Гольджи) – клеточная органелла, обычно расположенная около клеточного ядра. Состоит из набора окруженных мембраной уплощенных цистерн, упакованных наподобие стопки тарелок. Каждая стопка Гольджи обычно содержит от четырех до шести цистерн, имеющих диаметр около 1 мкм. Число стопок Гольджи в клетке зависит от ее типа: некоторые клетки содержат одну большую стопку, тогда как в других имеются сотни очень маленьких стопок. У аппарата Гольджи есть две морфологически и функционально различающиеся стороны: *формирующаяся*, или *цис*-сторона, и *зрелая*, или *транс*-сторона (рис. 8).

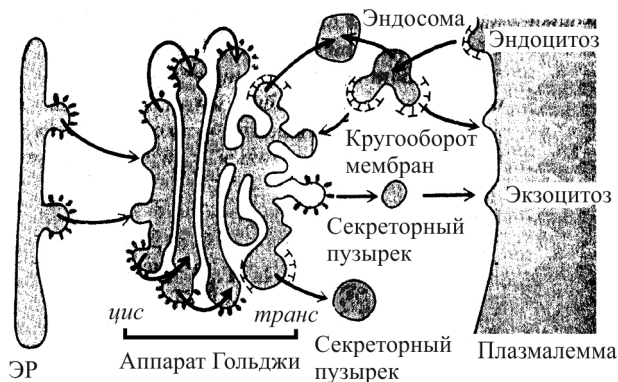


Рис. 8. Образование транспортных (секреторных) пузырьков в аппарате Гольджи

Белки и липиды переносятся путем везикулярного транспорта (включенные в небольшие пузырьки) из ЭПР на *цис*-сторону аппарата Гольджи, а покидают его включенными в пузырьки, формирующиеся на *транс*-стороне. Через аппарат Гольджи проходят два основных потока белков, синтезированных на мембранах ЭПР: гидролитические ферменты лизосом и секреторные белки. Последние разделяются на две группы: белки, выделяемые клеткой постоянно, и белки, выделяемые только после получения клеткой соответствующих сигналов. Каким образом происходит разделение белков, попадающих в аппарат Гольджи? Установлено, что еще в полости ЭПР все белки гликозилируются с помощью стандартного олигосахариды, а в *цис*-цистернах начинается вторичная модификация олигосахаридных цепей. В результате олигосахариды на гидролитических ферментах, предназначенных для лизосом (богатые маннозой олигосахариды), фосфорилируются, а олигосахариды других белков, направляемых в секреторные гранулы или к плазматической мембране, подвергаются дальнейшим превращениям, в ходе которых присоединяют галактозу, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты. Таким образом, белки, предназначенные на экспорт, и лизосомальные белки, получают различные «метки», что позволяет сортировать их на два класса и концентрировать в *транс*-цистернах аппарата Гольджи. Транспортные пузырьки от *транс*-стороны аппарата Гольджи направляются в различные компартменты клетки и к плазматической мембране, где их содержимое секретируется, т. е. выделяется после слияния мембраны транспортных пузырьков с внутриклеточной или плазматической мембраной. Пузырьки могут сливаться только с определенными мембранами, что обеспечивает направленный перенос макромолекул. Процесс, когда транспортные

пузырьки сливаются с плазматической мембраной и их содержимое выделяется во внеклеточное пространство, получил название *экзоцитоз*. Аппарат Гольджи особенно развит в секреторных клетках, таких как бокаловидные клетки эпителия кишечника, выделяющие большое количество слизи, главным компонентом которой являются гликопротеины.

3.3. Лизосомы

Структура, пути образования в клетке и классификация. Лизосомы представляют собой гетерогенную (разнородную) группу цитоплазматических вакуолеподобных структур размером 1–3 мкм, отличительной особенностью которых является наличие в них кислой среды и большого количества различных гидролаз – ферментов, способных расщеплять основные типы макромолекул. Наличие в клетках вакуолеподобных структур было известно почти со времени изобретения микроскопа. Однако только в середине XX в. (1955 г.) бельгийский цитолог и биохимик Кристиан Рене де Дюв выявил присутствие в лизосомах гидролаз и определил их основную функцию в клетке – расщепление макромолекул и более крупных образований как поступающих в клетку из внеклеточного пространства, так и имеющих внутриклеточное происхождение. В 1974 г. за открытия структурной и функциональной организации клетки де Дюв получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине. В настоящее время известны три возможных пути образования лизосом в клетке (рис. 9). В каждом случае образуются морфологически различные структуры, в которых расщепляется материал из различных источников.

В первом случае расщепляемый материал – белки, полинуклеотиды или полисахариды – попадает в клетку путем *эндоцитоза*. В ходе этого процесса молекулы, имеющие достаточно крупные размеры и неспособные проникать через мембраны, постепенно окружаются небольшим участком плазмалеммы, который сначала впячивается (инвагинируется), а затем отщепляется вовнутрь клетки, образуя пузырек, содержащий захваченный клеткой материал. Пузырьки, образующиеся в результате эндоцитоза, получили название *эндосомы*. По мере движения эндосомы от клеточной мембраны вовнутрь клетки она многократно взаимодействует с транспортными пузырьками, доставляющими от *транс*-поверхности аппарата Гольджи гидролитические ферменты и мембранные белки. В результате эндосома превращается в *эндолизосому*. Процесс образования и трансформации эндосомы длится около 15 мин и сопровождается закислением внутренней среды благодаря закачиванию ионов H^+ из цитозоля вовнутрь эндосомы АТФ-зависимым протонным насосом, интегральным белком, синтезируемым на

мембранах шероховатого ЭР и попадающим в лизосомы, как и другие белки, в составе транспортных пузырьков. Протонный насос функционирует подобно АТФ-азе внутренней мембраны митохондрий, но в обратном направлении, т. е. перекачивает ионы H^+ против электрохимического градиента, используя энергию АТФ. Для попадания лизосомальных ферментов (кислых гидролаз) в лизосомы на них должна присутствовать специальная метка – остатки маннозо-6-фосфата на концах олигосахаридных цепей. Эта метка наносится в два этапа. Вначале в *цис*-цистернах аппарата Гольджи фермент N-ацетилглюкозаминфосфотрансфераза присоединяет к олигосахаридным фрагментам будущих лизосомальных гидролаз остатки N-ацетилглюкозаминфосфата, а затем в *транс*-цистернах аппарата Гольджи второй фермент отщепляет N-ацетилглюкозамин. Метка наносится только на те белки, которые имеют специфические черты третичной структуры – «сигнальный бугорок» (signal patch). Затем маннозо-6-фосфаты распознаются специфическим рецептором, расположенным на мембранах *транс*-цистерн. Происходит образование белок-рецепторных комплексов и, как следствие, концентрация будущих лизосомальных гидролаз в определенных локусах мембран *транс*-цистерн. При формировании транспортных визикул эти локусы включаются в их состав и переносятся в эндосомы. В эндосомах при понижении рН гидролазы отделяются от рецепторов, которые в составе специальных пузырьков доставляются обратно в аппарат Гольджи.

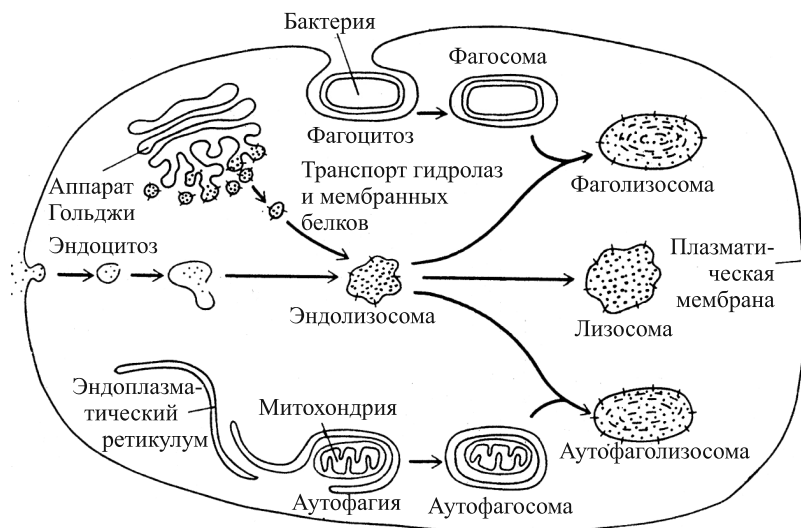


Рис. 9. Пути образования лизосом в клетке

Второй путь формирования лизосом называется *аутофагией*. В процессе аутофагии происходит разрушение отработанных частей самой клетки. Известно, например, что в клетках печени среднее время жизни одной митохондрии составляет около 10 дней, после чего она должна быть утилизирована в лизосомах. На электронных микрофотографиях нормальных клеток можно увидеть лизосомы, содержащие митохондрии на разных стадиях деградации. Как уже отмечалось выше, путем аутофагии из клеток печени удаляется избыток гладкого ЭР после прекращения поступления и выведения из организма ксенобиотиков-индукторов. Процесс аутофагии, по-видимому, начинается с окружения органеллы мембранами, поставляемыми из ЭР, в результате чего образуется *аутофагосома*. Затем, полагают, что аутофагосома сливается с эндолизосомой, образуя аутофаголизосому, в ней и происходит процесс деградации фрагмента ЭР или другой органеллы.

Существует также шаперон-опосредованный механизм аутофагии, в результате которого осуществляется направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы сквозь мембрану аутофаголизосомы в ее полость. Этот тип аутофагии индуцируется стрессом и существует только в клетках млекопитающих и птиц. Трансмембранный транспорт поврежденных цитоплазматических белков происходит после их связывания с цитоплазматическими белками-шаперонами семейства hsp70. Образовавшийся комплекс шаперона и белка, подлежащего транспорту в лизосому, распознается и связывается с белком-рецептором LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein 2), расположенным в лизосомальной мембране. LAMP2 является интегральным трансмембранным белком, при этом более 90 % белковой молекулы находится во внутреннем пространстве лизосомы, а короткий цитозольный фрагмент белка служит рецептором для белков, которые должны быть доставлены в лизосому из цитоплазмы. Кроме рецепторной функции LAMP2 защищает лизосомальную мембрану от протеолитических ферментов лизосомы.

Третий путь формирования лизосом имеется только у клеток, специализированных для *фагоцитоза* больших частиц и микроорганизмов. Такие клетки-фагоциты, а к ним относятся клетки крови – нейтрофилы и моноциты, могут поглощать из внеклеточного пространства крупные объекты, образуя *фагосомы*. Далее фагосома превращается в *фаголизосому* тем же путем, что и аутофагосома, т. е. сливаясь с эндолизосомой.

Эндосомы, аутофагосомы и фагосомы часто называют общим термином – *прелизосомы*, а эндолизосомы, аутофаголизосомы и фаголизосомы – *лизосомы*. В зрелых лизосомах происходит деградация поглощенного материала до отдельных молекул, например аминокислот, которые поступают в

цитозоль и вовлекаются в последующие биохимические реакции. Нерасщепленные продукты остаются и накапливаются в лизосомах, постепенно теряющих гидролитические ферменты и превращающихся в *постлизосомы*, или *остаточные тельца*. С возрастом в клетках человека и животных увеличивается количество остаточных телец, содержащих большое количество *липофусцина*, или пигмента старения. Липофусцин представляет собой фрагменты биополимеров различной природы, неподдающиеся дальнейшему расщеплению лизосомальными ферментами, поскольку химические связи между отдельными мономерами в таких фрагментах образовались не в нормальных биохимических реакциях, а в результате спонтанных окислительных процессов, главным образом свободнорадикальных. Различные заболевания, воздействие радиации и других негативных факторов внешней среды инициируют свободнорадикальные реакции и ускоряют процесс накопления пигмента старения.

Ферментная организация лизосом. В настоящее время обнаружено более шестидесяти лизосомальных ферментов, общим свойством которых является низкое значение оптимума pH (менее 5). Почти все лизосомальные ферменты относятся к *кислым гидролазам*. В зависимости от типа биополимеров, на которые воздействуют лизосомальные ферменты, их можно объединить в следующие семейства, или комплексы:

- гидролазы, расщепляющие липиды (различные эстеразы и липазы);
- гидролазы, расщепляющие олиго- и полисахариды (гидролазы гликозидов);
- гидролазы, расщепляющие белки (катепсины);
- гидролазы, расщепляющие нуклеиновые кислоты (кислые ДНК-аза и РНК-аза).

Важнейшими особенностями действия лизосомальных комплексов следует считать:

- во-первых, последовательное действие ряда кислых гидролаз на субстрат, приводящее к глубокому расщеплению биополимеров и надмолекулярных структур, вплоть до низкомолекулярных продуктов;
- во-вторых, сравнительно широкую *субстратную специфичность* действия большинства лизосомальных ферментов;
- в третьих, устойчивость к действию собственных лизосомальных гидролаз (за счет гликозилирования олигосахаридными фрагментами).

Физиологические функции лизосом. Наиболее древняя функция лизосом – *внутриклеточное пищеварение*. Эта функция особенно важна для одноклеточных организмов, у которых она является главным путем в ассимиляции сложных пищевых веществ. В ходе эволюционного развития (фи-

логенез) значение внутриклеточного пищеварения постепенно снижается по мере возникновения и усложнения системы специализированных пищеварительных органов и секреторных тканей, осуществляющих внеклеточное расщепление биополимеров. Обычно квота пищевых веществ, получаемых клетками высших позвоночных и расщепляемых в лизосомах, незначительна, и роль внутриклеточного пищеварения заключается, как уже отмечалось, в разрушении отработанных клеточных органелл и денатурированных белков, что важно для поддержания структурно-функциональной целостности клетки. Однако при голодании или в условиях резкого увеличения потребностей организма, связанных с высокой степенью активации метаболических процессов (при репарации и регенерации тканей, экстремальных физических нагрузках и беременности), первостепенная роль в обеспечении клетки пищевыми веществами и энергией принадлежит лизосомальной системе.

Лизосомы играют важную роль в процессах эмбрионального и постнатального (послеродового) развития. Это проявляется уже на стадии оплодотворения. Считают, что лизосомы сперматозоидов ответственны за процесс *пенетрации* (проникновения) сперматозоидов в яйцеклетку. При дальнейшем развитии оплодотворенной яйцеклетки, т. е. эмбриогенезе, лизосомы вовлекаются в процессы морфогенеза, а именно в процессы, связанные с регрессией и реконструкцией некоторых эмбриональных органов (наиболее известный пример – деструкция хвоста при развитии головастика). Запрограммированные деструктивные процессы с участием лизосом продолжаются и в зрелом возрасте при *инволюции* (обратном развитии) некоторых органов и тканей (зобной и молочной желез, яичников). Наконец, посмертная дегенерация тканей – *аутолиз* – также обусловлена действием лизосомальных ферментов, выходящих в результате массового разрушения лизосом в цитоплазму и расщепляющих не только содержимое клеток, но и межклеточный материал.

Защитная функция лизосом связана в первую очередь с их участием в лизисе микроорганизмов и вирусов, поглощаемых путем фагоцитоза, некоторыми типами белых кровяных телец и тканевых макрофагов (физиологические функции и типы этих клеток более подробно будут рассмотрены далее).

Роль лизосом в патологии и терапии. Лизосомальные болезни. Значение лизосом в патологии столь многогранно и существенно, что в настоящее время трудно представить патологический процесс, в который не был бы вовлечен лизосомальный аппарат клетки. Следует выделить два аспекта этой проблемы. Во-первых, *вовлечение лизосом в развитие таких общих*

патологических процессов, как воспаление и некроз. В этом случае участие лизосом является одним из проявлений их защитной функции организма в ответ на возникновение очага инфекции. Во-вторых, *развитие ряда патологий связано с нарушением структуры и функций самих лизосом.*

Нарушения в лизосомах выступают пусковым, первичным звеном в развитии двух типов патологических процессов. Для первого из них характерно возникновение патологической дестабилизации лизосомальной мембраны и выход в клеточный матрикс кислых гидролаз. Установлено, что проницаемость лизосомальных мембран значительно увеличивается при *гипоксии (недостаток кислорода), изменении кислотно-щелочного равновесия, после травм и хирургических вмешательств, голодании, при заболеваниях суставов и инфекционных заболеваниях, воздействии некоторых химических агентов и ионизирующей радиации.* Последнее нашло практическое применение. Так, направленное повреждающее воздействие некоторых фармакологических агентов и ионизирующей радиации на мембраны лизосом опухолевых клеток используется при лекарственной и радиотерапии онкологических заболеваний. Однако установлено, что значение повреждения лизосомальной мембраны в механизмах радиотерапии не столь значительно, а основную роль отводят инициированию в облученных клетках процессов апоптоза. Из патологических состояний, связанных с повреждением лизосомальных мембран и высвобождением гидролаз, наиболее изучены болезни суставов – *острый и ревматоидный артриты, подагра.* При этих заболеваниях в результате воздействия лизосомальных ферментов наблюдаются эрозия хрящей и деструкция суставов. Аналогичные изменения могут быть получены у экспериментальных животных при введении в область сустава веществ, обладающих дестабилизирующим действием на лизосомальные мембраны, например *стрептолизина S.* И наоборот, вещества, стабилизирующие лизосомальные мембраны (к ним относятся многие противовоспалительные препараты, например салициловая кислота, более известная как аспирин, глюкокортикостероид – кортизон), значительно уменьшают воспалительную реакцию.

К другой сравнительно редкой группе заболеваний, обусловленных нарушением функции лизосом, относят врожденные генетические нарушения в системе синтеза лизосомальных ферментов. Эти нарушения приводят к развитию так называемых *лизосомальных болезней накопления.* Такие болезни вызываются главным образом мутацией в гене, кодирующем ту или иную гидролазу, что выражается либо в полном подавлении синтеза ферментного белка, либо в синтезе белковых молекул, обладающих резко сниженной биокаталитической активностью. Кроме этого генетически обусловленными могут быть нарушения, при которых ферментный белок син-

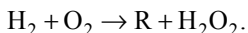
тезируется без сигнальных участков и по этой причине не распознается транспортной системой. В результате блокируется его доставка из аппарата Гольджи в лизосомы. Нерасщепленный субстрат такой гидролазы накапливается в лизосомах, что приводит к переполнению клеток разбухшими лизосомами, клетки приобретают пенистый вид (*пенистые клетки*), утрачивают вследствие этого свои функциональные свойства и в результате погибают, что ведет к развитию тяжелых заболеваний, заканчивающихся во многих случаях смертельным исходом.

3.4. Микротельца

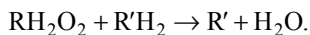
Микротельца – это цитоплазматические органеллы в клетках позвоночных, высших растений и простейших, представляющие собой небольшие пузырьки (диаметр 0,3–1,5 мкм), окруженные одинарной мембраной. Первые микротельца были обнаружены в почке мышей в 50-е гг. XX в. В настоящее время к микротельцам относят *пероксисомы*, *гликосомы* и *глиоксисомы*. Пероксисомы и гликосомы встречаются как в животных, так и растительных клетках. Наличие глиоксисом характерно для растительных клеток, но они отсутствуют у высших позвоночных.

Пероксисомы (лат. *peroxysoma*) – обязательная органелла эукариотической клетки, содержащая большое количество ферментов-оксидаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции (оксидазы D-аминокислот, пероксидазы и каталазы). Пероксисомы были открыты бельгийским цитологом Кристианом де Дювом в 1965 г. Набор функций пероксисом различается в клетках разных типов. Среди них: окисление жирных кислот (β -окисление), синтез желчных кислот, холестерина, разрушение токсичных соединений, а также участие в построении миелиновой оболочки нервных волокон и т. д. Наряду с митохондриями пероксисомы являются главными потребителями O_2 в клетке.

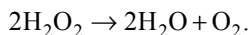
В пероксисоме обычно присутствуют ферменты, использующие молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от некоторых органических субстратов (R) с образованием пероксида водорода (H_2O_2):



Другие ферменты – пероксидазы – используют H_2O_2 для окисления множества субстратов, например фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида и этанола:



Этот тип окислительных реакций особенно важен в клетках печени и почек, пероксисомы которых обезвреживают множество ядовитых веществ, попадающих в кровоток. Почти половина поступающего в организм человека этанола окисляется до ацетальдегида этим способом. При образовании избытка пероксида водорода в пероксисомах протекает реакция его детоксикации, катализируемая таким ферментом, как каталаза:



Длительность жизни пероксисом незначительная – всего 5–6 суток. Чаще всего они образуются в результате деления более крупных органелл, таких как митохондрии и хлоропласты. Однако пероксисомы могут формироваться и *de novo* из эндоплазматического ретикулума. Все ферменты, находящиеся в пероксисоме, синтезируются на цитоплазматических рибосомах. Для их избирательного переноса из цитозоля внутрь органеллы мембраны пероксисом имеют систему распознавания и трансмембранного транспорта.

Глава 4 ЦИТОСКЕЛЕТ

4.1. Общие представления о структуре, функции цитоскелета

Все клетки представляют собой ячейки, заполненные жидким содержимым и ограниченные мембраной, подобной стенке мыльного пузыря. Что же обуславливает жесткость клеток, способствует поддержанию их формы и позволяет совершать направленные и координированные движения? Эту функцию выполняет *цитоскелет* – сложная сеть белковых нитей, пронизывающих всю цитоплазму. Однако цитоскелет – это не только каркас или скелет, а одновременно и *цитомускулатура* – гибкая и сложная система, состоящая из структурных элементов, способных передвигаться друг относительно друга, и только некоторые из них являются истинными фиксаторами. Более того, элементы цитоскелета обладают удивительной способностью быстро распадаться на крошечные строительные блоки и вновь собираться в структуры различной формы, что позволяет осуществлять направленные и координированные передвижения как клетки в целом, так и отдельных внутриклеточных оргanelл. Цитоскелет формируется из *микротрубочек* и двух типов *микрофибрилл* – *актиновых* и *промежуточных филаментов*.

4.2. Актиновые филаменты

В эукариотических клетках белок актин содержится в больших количествах (до 5 % и более от общего белка клетки) и представляет собой полипептидные цепочки из 375 аминокислот, свернутые в глобулярную (шарообразную) структуру – *глобулу*. Примерно половина всех молекул актина находится в виде индивидуальных субъединиц, называемых *G-актином*. Другая половина молекул актина соединена последовательно друг с другом посредством специальных участков (сайтов) связывания, образуя длинные

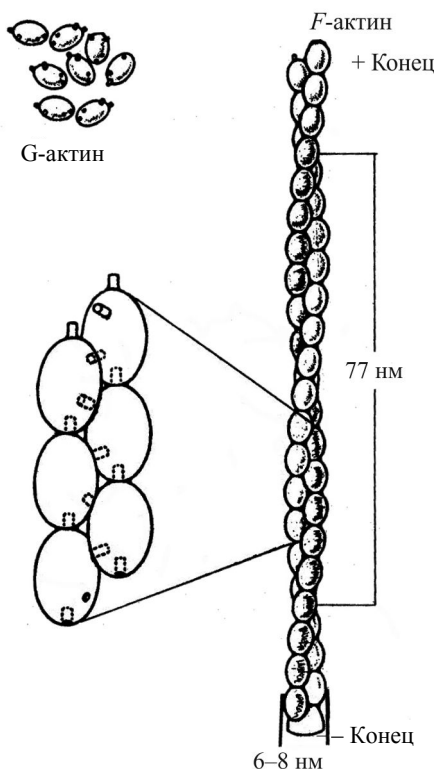


Рис. 10. Структура актиновых микрофиламентов

на примерно на 50 молекул G-актина). На обоих концах молекулы филамина имеются участки связывания, с помощью которых филамин соединяется с актиновыми филаментами, фиксируя их друг относительно друга. Плазматическая мембрана настолько плотно связана с актиновым кортексом, что обе структуры могут рассматриваться как единый комплекс. Соединение кортекса и плазмалеммы обеспечивается специальными белками, которые расположены как в мембране, так и в непосредственной близости от нее. Впервые такие белки – *спектрин* и *анкирин* – были выявлены в эритроцитах.

Структура кортекса может быть различной как у разных клеток, так и в разных участках одной и той же клетки. Иногда это плотная трехмерная сеть, в которую не могут проникать органеллы и иные крупные частицы. В других случаях кортекс заметно тоньше и больше похож на двухмерную структуру. Плотная трехмерная сеть актиновых филаментов под некоторы-

актиновые *филаменты* (англ. filamentous – нитевидный), или волокна, называемые *F-актином* (рис. 10). Полимеризация актина не требует энергии и в экспериментальных условиях может быть вызвана в результате повышения концентрации соли до уровня, близкого к физиологическому. При этом раствор актина лишь немного более вязкий, чем вода, быстро густеет по мере образования филаментов. Актиновые филаменты представляют собой плотную двойную спираль толщиной 6–8 нм (длина шага около 77 нм). Располагаясь в виде пучков волокон, соединенных поперечными сшивками непосредственно под плазматической мембраной, актиновые филаменты образуют однородную трехмерную сеть. Эта сеть, или *клеточный кортекс*, придает механическую прочность поверхностному слою клетки. Наиболее распространенным сшивающим элементом клеточного кортекса является длинная, димерная молекула белка *филамина*. В клетках содержание этого белка может составлять до 1% от всего клеточного белка (один димер филамина

ми участками плазматической мембраны может быстро распадаться при действии специальной внутриклеточной системы, которая не только устраняет поперечные сшивки между актиновыми филаментами, но и частично их деполимеризует. В частности, локальная деградация кортекса наблюдается, когда фагоцитирующий лейкоцит вступает в контакт с микроорганизмом. Это позволяет поверхностному слою цитоплазмы окружить и поглотить микробную клетку. На поверхности многих животных клеток небольшие пучки из 20–30 параллельных актиновых филаментов отходят под прямым углом от наружной стороны кортекса и заполняют продолговатые (длина около 1 мкм) и тонкие (ширина около 0,08 мкм) выпячивания клеточной поверхности, называемые микроворсинками. Особенно много микроворсинок на поверхности эпителиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность тонкого кишечника. Важнейшей функцией этих клеток является всасывание. Благодаря микроворсинкам, количество которых достигает нескольких тысяч, значительно (в 20 раз) увеличивается всасывающая поверхность клетки.

Кроме актина в кортексе присутствует другой основной белок – *миозин*. Волокна миозина имеют боковые выросты – ножки, благодаря колебательным движениям которых одни актиновые филаменты способны подтягиваться и передвигаться относительно других (подобно тому, как это происходит при мышечном сокращении), вследствие чего клетка способна двигаться и изменять свою форму. Актиновые филаменты и миозин формируют при делении клетки *сократимое кольцо*, которое, сокращаясь, тянет за собой плазматическую мембрану, разделяя клетку на две части. Принципиально другой механизм движения клеток связан со способностью актиновых волокон непрерывно удлиняться за счет постоянно идущей полимеризации на так называемом *плюс-конце*. При этом на *минус-конце* идет постоянная деполимеризация филамента. Хотя общая его длина при этом не меняется, актиновая нить перемещается в направлении минус – плюс, подталкивая плазматическую мембрану, что приводит к образованию выростов на мембране и даже перемещению всей клетки. В отличие от простой сборки актиновых волокон из субъединиц в растворе этот процесс, получивший название *тредмиллинг*, требует энергии гидролиза АТФ.

Вследствие тредмиллинга на поверхности клеток постоянно возникают динамические выступы – *микрошипы*, благодаря которым клетки могут мигрировать и изменять свою форму. Например, растущий конец аксона, длинного отростка нервной клетки, выпускает длинные микрошипы – *филоподии*, длина которых может достигать 50 мкм. Внутри микрошипы содержат рыхлые пучки примерно из 20 актиновых филаментов, ориентированных плюс-концами наружу. Эти выступы клеточной поверхности очень подвижны и могут быстро появляться и исчезать. Предполагают, что они

действуют подобно щупальцам, которыми клетка исследует окружающую среду. По-видимому, микрошипы, прочно прикрепившиеся к какому-либо субстрату, направляют движение клетки в этом направлении. Микрошипы, которым прикрепиться к субстрату не удалось, втягиваются обратно.

Некоторые природные вещества, например *цитохалазины*, выделяемые различными плесневыми грибами, избирательно влияют на процессы полимеризации и деполимеризации актина. Они способны специфически связываться с плюс-концами актиновых волокон и блокировать присоединение к ним новых мономеров актина, тем самым ингибируя тредмиллинг. С помощью этих веществ было экспериментально доказано, что механизм тредмиллинга лежит в основе различных типов клеточных движений. В частности оказалось, что цитохалазины подавляют такие формы подвижности клеток позвоночных, как цитокинез, фагоцитоз, образование выростов и шипов. В то же время эти вещества не влияют на деление клеток в результате сокращения сократимого кольца, в котором участвуют стабильные актиновые филаменты и миозин, не подвергающиеся сборке и разборке, и на расхождение хромосом в митозе, зависящее в основном от функции *микротрубочек*.

4.3. Структура и функции микротрубочек

Микротрубочки образуются путем полимеризации молекул белка *тубулина*. Молекула тубулина является гетеродимерной, поскольку состоит из двух различных субъединиц – α - и β -тубулинов. Тубулин присутствует практически во всех эукариотических клетках. Особенно много этого белка в нейронах головного мозга позвоночных – до 10–20 % от всего растворимого белка клетки. В ходе сборки молекулы тубулина укладываются бок о бок по спирали вокруг центральной области, которая на электронных микрофотографиях кажется пустой, образуя длинные, полые структуры диаметром 24 нм (рис. 11). На один шаг спирали затрачивается 13 молекул тубулина. Подобно актиновым филаментам, микротрубочки являются полярными структурами, у которых есть плюс-концы, растущие быстро, и минус-концы, растущие медленно.

Микротрубочки формируют в цитоплазме систему транспортных волокон. Она зарождается в начале интерфазы из области *центросом*, в так называемых центрах организации микротрубочек, и растет за счет процессов полимеризации вдоль длинной оси клетки, поддерживая тем самым удлиненную форму клетки в целом. Система цитоплазматических микротрубочек является своеобразными рельсами, по которым транспортируются раз-

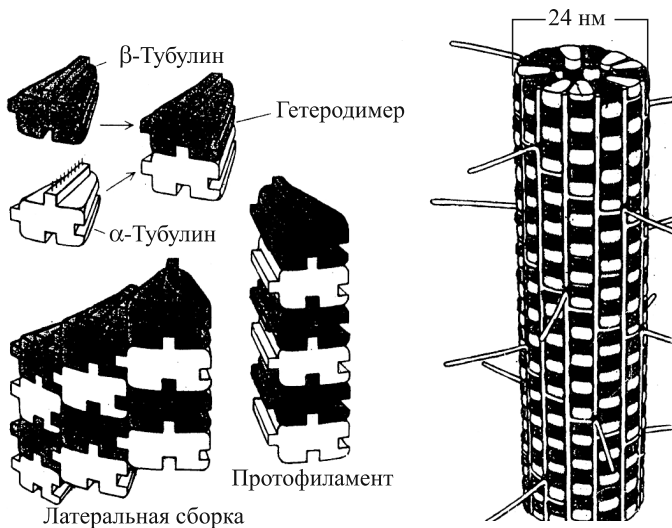


Рис. 11. Структура микротрубочек

личные пузырьки и органеллы. Благодаря транспортной системе микротрубочек вещества, включенные в пузырьки, переносятся из одной области клетки в другую. Особенно интенсивно эти процессы протекают при так называемом быстром аксонном транспорте, в ходе которого транспортные пузырьки с большой скоростью переносятся на десятки сантиметров от тела клетки к нервному окончанию и обратно. Высокая концентрация тубулина в нервных клетках как раз и обусловлена наличием в них большого количества микротрубочек, связанных с системой быстрого аксонного транспорта.

Кроме транспортной функции микротрубочки определяют (фиксируют) местоположение в клетке ЭР и аппарата Гольджи. В часто делящихся (недифференцированных) клетках система цитоплазматических микротрубочек очень лабильна и видоизменяется в зависимости от состояния клетки. В начале митоза она распадается и перестраивается в микротрубочки *митотического веретена*, которые соединяются с хромосомами в области центромеры и перемещают их сначала в область экватора делящейся клетки, где они образуют метафазную пластинку, а затем разводят их в дочерние клетки. Движущая сила в первом случае возникает за счет АТФ-зависимой полимеризации молекул тубулина и удлинения микротрубочек; во втором случае, напротив, активируются процессы деполимеризации, укорачивающие микротрубочки.

В недифференцированных клетках микротрубочки митотического веретена пребывают в состоянии необычайно быстрой сборки и разборки, и это объясняет крайнюю чувствительность веретена к различным препаратам, способным связываться с тубулином. К таким веществам относится *колхицин* – один из алкалоидов безвременника осеннего, который применялся в лечебных целях еще древними египтянами. Колхицин прочно связывается с молекулами тубулина и препятствует тем самым их полимеризации. В зависимости от используемой концентрации он может задержать деление клетки в митозе или заблокировать процесс расхождения хромосом, что приводит к образованию клеток с диплоидным (двойным) набором хромосом. Действие колхицина обратимо, и удаление препарата во многих случаях дает возможность веретену образоваться, а митозу завершиться. Вещества, блокирующие рост микротрубочек, называются *антимитотическими агентами*. Поскольку нарушение роста микротрубочек митотического веретена особенно пагубно для быстро делящихся клеток, и в первую очередь раковых, некоторые антимитотические препараты, в частности винбластин и винкристин, широко используются в лечении опухолей.

Многие клетки имеют реснички, а некоторые – жгутики. Структурной основой ресничек и жгутиков являются цилиндрические пучки из девяти так называемых *дублетов*. Дублеты, каждый из которых образован двумя слившимися микротрубочками, способны за счет энергии гидролиза АТФ перемещаться относительно друг друга аналогично тому, что происходит в случае актиновых филаментов, только передвигает дублеты друг относительно друга не миозин, а другой белок – *денеин*. Синхронное скольжение дублетов преобразуется в изгиб реснички или жгутика. В организме человека огромное количество ресничек ($10^9/\text{см}^2$) имеют клетки эпителия бронхов и других влажных поверхностей. Каждая такая клетка содержит на поверхности до нескольких сотен ресничек длиной 5–15 мкм. Реснички изгибаются синхронно, при этом циклы колебаний соседних рядов ресничек едва заметно сдвинуты во времени, вследствие чего на поверхности клетки образуются однонаправленные бегущие волны. В бронхах волнообразные движения ресничек со скоростью 6 мм/мин непрерывно перемещают из легких к полости носа, а затем наружу слизь с частицами пыли.

4.4. Структура и функции промежуточных филаментов

Промежуточные филаменты – это жесткие и прочные белковые волокна в цитоплазме большинства клеток высших эукариот. Их структура напоминает переплетенные канаты, а толщина составляет 8–10 нм. В отличие от мономеров актина и тубулина, которые представляют собой глобу-

лярные белки, субъединицы промежуточных филаментов, в частности различные *кератины*, являются вытянутыми фибриллярными белками. Они объединяются в продольные пучки, где перекрываются по длине, образуя длинные нити с высокой химической и механической прочностью (рис. 12).

Фактически термин *цитоскелет* был первоначально введен именно для обозначения этих чрезвычайно стойких и нерастворимых волокон. Особенно много промежуточных кератиновых филаментов там, где клетки подвергаются механическим нагрузкам, например в *эпителиях*. Здесь эти нити участвуют в соединении клеток друг с другом (при помощи десмосом). Более разнообразны кератины в эпидермисе кожи, представляющем собой плотный многослойный эпителий, клетки которого производят кератин по мере своего старения в возрастающем количестве за счет массивной аутофагии (самопо-

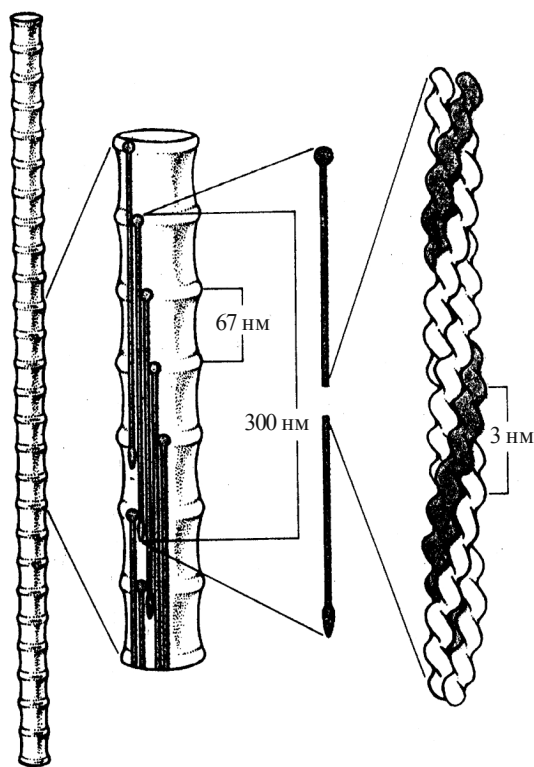


Рис. 12. Структура промежуточных филаментов

жирания) других внутриклеточных структур. Одновременно кератиновые волокна начинают интенсивно связываться между собой посредством поперечных дисульфидных связей. К тому моменту, когда клетки становятся высохшими и безжизненными, кератины из разных клеток формируют единый чрезвычайно плотный защитный пласт, из которого образуются чешуя, ногти, когти, рог или клюв, а также волосы и перья.

4.5. Внеклеточные структуры, коллаген

Ткани состоят не только из клеток. Значительную часть объема ткани занимает *внеклеточное пространство*, или *внеклеточный матрикс*. Он заполнен сложной сетью макромолекул, главным образом разнообразными полисахаридами и белками. Внеклеточный матрикс способствует поддержанию многоклеточных структур, создавая каркас, внутри которого клетки мигрируют и взаимодействуют друг с другом. Животные ткани можно разделить на две главные группы, в которых роль матрикса и межклеточных соединений существенно различается, – *эпителиальные* и *соединительные*. Эпителиальные клетки выстилают различные внутренние полости, например кишечник, и свободные поверхности тела. Внеклеточного матрикса в эпителии мало, а клетки плотно прилегают друг к другу, образуя пласты, воспринимающие большую часть нагрузок на орган. Благодаря запирающим соединениям между клетками (десмосомам) эти пласты могут служить барьерами для передвижения воды и солей и разделяют жидкости различного химического состава. Эпителии почти всегда располагаются на подложке из соединительной ткани, которая может связывать их с другими тканями (например, мышечной), не имеющими явно выраженной эпителиальной или соединительнотканной организации. В соединительных тканях имеется обширный внеклеточный матрикс, в котором клетки располагаются весьма свободно. Матрикс богат волокнистыми полимерами, армирующими его подобно тому, как железные прутья армируют железобетон, и поэтому матрикс, а не клетки, берет на себя большую часть нагрузок, которым подвергается ткань. Главным фибриллярным белком внеклеточного матрикса является *коллаген*. Название его произошло от греческого слова *kolla* – клей, поскольку коллаген – вещество, промышленным способом извлекаемое из костей и используемое для получения желатина и клея. К настоящему времени выявлено около 20 различных типов коллагена, каждый из них кодируется отдельным геном. Другой белок внеклеточного матрикса – *эластин*. Обширная сеть волокон эластина придает коже, кровеносным сосудам и легким способность возвращаться к исходному состоянию после растяжения или сжатия. Благодаря различиям в соотношениях разных ти-

пов макромолекул и в способе их организации существует необычайное разнообразие форм внеклеточного матрикса, каждая из которых очень хорошо приспособлена к функциональным потребностям данной ткани. В сухожилиях матрикс может принимать форму каната, что придает им огромную прочность на разрыв. Матрикс может обызвествляться, образуя твердые, как камень, структуры кости или зуба. Из матрикса формируется прозрачное вещество роговицы глаза.

На границе между эпителием и соединительной тканью матрикс образует *базальную мембрану* – тонкую, но плотную прокладку, состоящую в основном из параллельно уложенных волокон коллагена – электронно-прозрачного и электронно-плотного слоев. Функции базальной мембраны чрезвычайно разнообразны. В почечных клубочках необычно толстая базальная мембрана работает как молекулярный фильтр, регулируя переход молекул из крови в мочу. Ключевую роль играют базальные мембраны в создании гисто-гематологических барьеров, т. е. барьеров для переноса веществ из крови в ткани. Одним из наиболее совершенных и интересных с точки зрения фармакологии молекулярных фильтров является *гемато-энцефалический барьер*: именно этот барьер служит непреодолимым препятствием для большинства лекарственных препаратов на пути из крови к клеткам головного мозга.

Глава 5

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ

5.1. Основные типы гуморальной коммуникации и классификация гуморальных сигналов

Существует несколько видов гуморальной коммуникации между клетками. Во-первых, клетка может выделять вещества, которые оказывают специфическое действие на эту же клетку. Такой механизм называют *аутокринной* регуляцией. В тех случаях, когда секретируемый агент действует на соседние клетки, имеет место *паракринная* регуляция. Сигнальные молекулы, воздействующие на собственные или рядом расположенные клетки, получили название *локальные медиаторы*, хотя часто их называют *тканевые гормоны*. Наконец, в многоклеточных организмах функционирует *эндокринная* система. Как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных существуют специализированные *эндокринные железы* (железы внутренней секреции). Химические посредники, выделяемые такими железами и доставляемые с кровью к удаленным тканям-мишеням, называются гормонами. Если при этом посредник секретируется в кровь нервными клетками, то речь идет о *нейроэндокринной* системе.

Клетки дрожжей в период полового размножения «общаются» друг с другом посредством нескольких типов небольших пептидных молекул. Напротив, у высших многоклеточных организмов в процессы межклеточной коммуникации вовлечены сотни типов сигнальных молекул. Химическая структура гуморальных сигналов, найденных у многоклеточных животных, очень разнообразна. Это могут быть аминокислоты, небольшие *пептиды* и белки, различные *амины* (*катехоламины*), производные жирных кислот (*простагландины*, *лейкотриены*), *стероиды* и *ретиноиды*, простые неорганические молекулы, например *пероксид водорода*, и даже растворенные газы – *монооксиды азота* и *углерода*. Большая часть сигнальных

молекул секретируется сигнализирующими клетками в межклеточное пространство. Секреция может осуществляться путем экзоцитоза или в результате диффузии через плазматическую мембрану. Некоторые сигнальные молекулы переносятся на внешнюю поверхность клетки и выполняют сигнальную функцию, оставаясь прикрепленными к клеточной мембране. Любая сигнальная молекула воздействует на клетку-мишень только через взаимодействие со специальным структурным образованием, называемым *рецептор*. Важнейшей функцией рецептора является способность к высокоспецифичному связыванию со своим лигандом (сигнальной молекулой). Образование лиганд-рецепторного комплекса инициирует ответ клетки-мишени. Сигнальные молекулы в системе межклеточной гуморальной коммуникации действуют в очень низких концентрациях – 10^{-8} М и меньше. Поэтому рецепторы, чтобы узнать и связаться со своими лигандами, должны обладать по отношению к ним высокой аффинностью (константа связывания $K_a \geq 10^8$). Таким требованиям соответствуют крупные белковые молекулы. Благодаря наличию третичной структуры они в наибольшей степени обеспечивают специфическое связывание рецептора с сигнальной молекулой. Поэтому все рецепторы являются белками. В большинстве случаев это интегральные, трансмембранные белки.

5.2. Различия в сигнальной трансдукции посредством гидрофобных и гидрофильных молекул, каскадный механизм

Взаимодействие рецепторной молекулы с ее лигандом (сигнальной молекулой) приводит к активации рецептора. По расположению в клетке все рецепторы можно разделить на две группы – поверхностные и внутриклеточные, или ядерные. Для того чтобы внеклеточная сигнальная молекула смогла связаться с внутриклеточным ядерным рецептором, она должна легко проходить через плазматическую мембрану. Поэтому лиганды внутриклеточных рецепторов – это сравнительно небольшие (молекулярная масса около 300) липофильные молекулы: стероидные и тиреоидные гормоны, ретиноиды (витамин А и его структурные аналоги) и витамин Д. Несмотря на то что эти соединения отличаются по своей химической структуре и физиологической функции, механизм трансдукции сигнала у них сходный. Проникнув в клетку, они связываются с лигандсвязывающим доменом неактивного ядерного рецептора, что приводит к удалению из него белка-ингибитора и высвобождению ДНК-связывающего участка (рис. 13). До взаимодействия с лигандом некоторые рецепторы, например рецептор кортизола, находятся в цитоплазме и поступают в ядро только в составе лигандрецепторного комплекса.

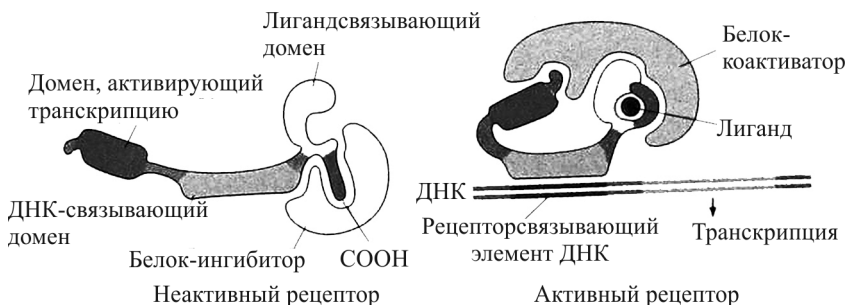


Рис. 13. Молекулярная организация и механизм активации внутриклеточного рецептора

Рецепторы тиреоидных гормонов и ретиноидов изначально находятся в ядре, где и взаимодействуют со своими лигандами. В любом случае активация ядерного рецептора повышает его сродство к ДНК и приводит к связыванию лигандрецепторного комплекса с определенными узнаваемыми нуклеотидными последовательностями в гене (рецепторсвязывающий элемент ДНК). В результате такого взаимодействия может произойти повышение или, напротив, снижение экспрессии тех или иных генов. Во многих случаях ответ на взаимодействие лиганда с ядерным рецептором бывает двухстадийным. Вызванная таким взаимодействием индукция транскрипции небольшого числа специфических генов называется *первичный ответ*. Результатом первичного ответа является образование белковых молекул, которые могут в свою очередь активировать другие гены и вызвать более выраженный *вторичный ответ*.

Большинство гуморальных сигналов – это гидрофильные молекулы, не способные проходить через липидную фазу мембраны. Долгое время было совершенно непонятно, каким образом гидрофильные сигнальные молекулы воздействуют на клетки-мишени и влияют на протекающие в них метаболические процессы. В 1957 г. американскому биохимику из Вашингтонского университета Эрлу Сазерленду и его сотрудникам удалось показать, что посредником между внеклеточным сигналом и внутренней средой клетки является цАМФ, и доказать, что обратимое увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ является необходимым этапом регуляции ряда метаболических процессов. Изучая механизм физиологического действия гормонов адреналина и глюкагона, Э. Сазерленд обнаружил в клеточной мембране фермент *аденилатциклазу*, катализирующий образование цАМФ, и показал, что взаимодействие адреналина и глюкагона с клеткой-мишенью стимулирует активность этого фермента. Таким образом, было установлено, что передача (трансдукция) гормонального сигнала от внешней поверх-

ности внутрь клетки включает активацию аденилатциклазы и последующее повышение внутриклеточной концентрации цАМФ, которое вызывает самые разнообразные воздействия на процессы жизнедеятельности, например клеточную секрецию, синтез мРНК и т. д. За эти работы в 1971 г. Э. Сазерленд был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. Впоследствии было доказано, что и другие гидрофильные сигнальные молекулы взаимодействуют с поверхностными рецепторами. Взаимодействие лиганда с клеточным рецептором во всех случаях ведет к запуску внутриклеточного каскадного механизма, усиливающего исходный сигнал (рис. 14). Во многих случаях каскадный механизм представляет собой последовательность биохимических реакций, приводящих к образованию в цитозоле большого числа молекул внутриклеточного регулятора. В этой схеме гормон называют *внеклеточным* или *первым посредником*, а молекулу (или комплекс молекул) внутриклеточного регулятора, образующегося после взаимодействия гормона с рецептором, – *внутриклеточным* или *вторым посредником*. Таким образом, действие многих (главным образом гидрофильных) гормонов зависит от образования в клетке-мишени второго (а иногда и третьего) посредника, который определяет реакцию внутриклеточных процессов на гормон. Благодаря каскадному усиливающему эффекту клетки-мишени чрезвычайно чувствительны к своему лиганду. Некоторые из них реагируют на концентрацию гормонов в плазме крови, равную всего 10^{-12} М.

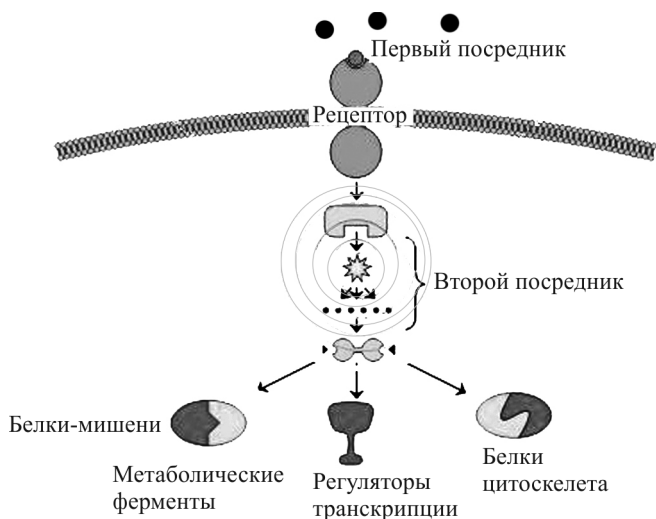


Рис. 14. Каскадный механизм внутриклеточной передачи сигнала

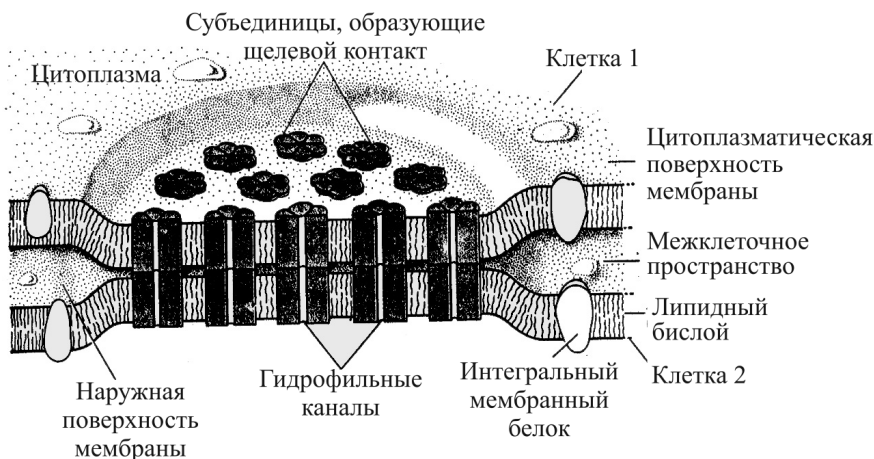


Рис. 15. Строение щелевого контакта

Молекулы вторых посредников имеют небольшие размеры и могут переходить из клетки в клетку через щелевые коммуникационные контакты (рис. 15). Эти контакты формируются за счет трансмембранных белков-каналов, соединяющих внутреннее содержимое двух клеток.

Через такие каналы из одной клетки в другую могут перемещаться молекулы и частицы с массой до 1500 дальтон. Щелевые контакты имеют особое значение для синхронизации активности соседних клеток. Вместе с химическими синапсами щелевые контакты относят к так называемым коммуникационным межклеточным контактам.

На каждую клетку в многоклеточном организме одновременно воздействуют десятки и сотни сигнальных молекул, а число их возможных комбинаций измеряется миллионами. Однако для любой отдельной клетки большинство сигналов и их комбинаций является информационным шумом, из которого она выбирает только конкретные комбинации сигналов и реагирует на них определенным образом. Например, воздействие одной комбинации сигналов инициирует процессы деления, другая комбинация сигнализирует о начале дифференциации, результатом воздействия третьей может быть активация специализированной функции клетки, например секреции или сокращения.

Настройка клетки на нужные комбинации сигналов определяется наличием в каждой клетке специфического, т. е. характерного для данного типа клеток, набора рецепторов. При этом для одной и той же сигнальной моле-

кулы могут быть разные рецепторы. Например, катехоламины взаимодействуют с рецепторами двух типов: α - и β -*адренергическими* рецепторами, и последствия взаимодействия гормонов с этими рецепторами разнонаправленные. Если лиганд связывается с β -адренергическими рецепторами, увеличивается частота сердечных сокращений и уменьшается общее сопротивление периферических сосудов, а активация α -адренергических рецепторов приводит к противоположному результату. Однако не всегда различный клеточный ответ обусловлен только природой воздействующих на клетку-мишень сигнальных молекул или особенностями ее рецепторного аппарата. Часто бывает так, что клетки-мишени имеют идентичные рецепторы и с ними связываются одинаковые сигнальные молекулы, тем не менее ответы оказываются совершенно разными. Это означает, что ответы клеток-мишеней могут быть запрограммированы не только с помощью набора клеточных рецепторов, но и спецификой внутриклеточного каскадного механизма, сопряженного с этими рецепторами.

5.3. Молекулярные механизмы десигнализации

В процессе своего жизненного цикла каждая клетка постоянно получает и реагирует на те или иные комбинации внешних сигналов. Чтобы клетка имела возможность ответить на следующие друг за другом сигналы, последствия воздействия предыдущего сигнала и сам сигнал должны быть устранены. Свободные сигнальные молекулы, не связавшиеся со своим рецептором, убираются либо в результате воздействия на них специальных ферментов (например, ацетилхолинэстеразы), разлагающих их на неактивные компоненты, разрушаются неферментативным путем, главным образом в результате окисления. Лиганд, связанный со своим рецептором, удаляется с поверхности клетки путем эндоцитоза и последующей трансформации эндосомы в эндолизосому. Рецептор может быть расщеплен вместе с лигандом в эндолизосомах кислыми гидролазами, но в большинстве случаев клетки поступают более «экономно», и рецептор возвращается обратно из эндосомы на плазматическую мембрану после высвобождения лиганда, не «дожидаясь» стадии формирования эндолизосомы.

Сигнальные молекулы паракринного типа, так называемые тканевые гормоны, воздействуют только на клетки, расположенные в непосредственной близости (до 1 мм) от места выделения. Ограниченное в пространстве и времени действие тканевых гормонов обусловлено наличием эффективных механизмов их инактивации и иммобилизации. Благодаря этим ме-

ханизмам тканевые гормоны быстро разрушаются под действием внеклеточных ферментов, окисляются кислородом или иммобилизируются во внеклеточном матриксе и не попадают в кровь в эффективных концентрациях. В качестве примера тканевых гормонов, способных быстро иммобилизоваться после выделения, можно указать *фибронектин* и *протеогликаны*. После секреции во внеклеточный матрикс эти макромолекулы объединяются в нерастворимую сеть, утрачивают подвижность и не могут диффундировать из места образования. Однако в составе такой сложной структуры их функциональная активность может сохраняться, при этом их локальный эффект ограничен в пространстве, но продолжителен по времени. Внеклеточный матрикс может связывать и растворимые сигнальные молекулы. Например, фактор роста фибробластов, небольшой белок, стимулирующий деление различных клеток в культуре, прочно связывается с протеогликанами внеклеточного матрикса. Предполагают, что в тканях он также функционирует в иммобилизованном виде.

Глава 6 ЭНДОКРИННАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

6.1. Основные гормоны, регулирующие метаболизм и развитие

По химическому строению большинство гормонов, найденных у многоклеточных животных, можно отнести к одной из следующих групп веществ: 1) *амины*; 2) *стероиды*; 3) *пептиды* и *белки*. В отдельную группу часто выделяют тиреоидные гормоны, являющиеся производными ароматической аминокислоты – тирозина, у которых две аминокислоты связаны между собой эфирной связью. Поскольку катехоламины также производные тирозина, их иногда объединяют вместе с тиреоидными гормонами в группу гормонов производных аминокислот. Наиболее простые по своей структуре амины. Более сложными являются стероидные гормоны. Они относятся к производным полициклических углеводов, причем все эндогенные стероиды образуются из общего предшественника – холестерина. Наиболее сложные и крупные молекулы у пептидных и белковых гормонов.

Основную железу внутренней секреции называют *гипофизом*, который состоит из задней доли, или *нейрогипофиза*, и передней доли, или *аденогипофиза*. Гипофиз выделяет по меньшей мере девять гормонов, многие из них регулируют активность других эндокринных желез. Гипофиз находится под контролем нейросекреторных клеток *гипоталамуса* – отдела, расположенного в основании мозга над гипофизом. Эти клетки реагируют на сенсорные (чувствительные) сигналы от различных частей тела, продуцируя гуморальные сигналы, называемые «рилизинг-факторы». В результате формируются *нейроэндокринные рефлексы* (сенсорное звено – нервное, эффекторное – гуморальное), с помощью которых в организме регулируется ряд функций, в том числе терморегуляции и осморегуляции. Нейроэндокринные рефлексы участвуют и в регуляции половых циклов.

Гормоны нейрогипофиза. Нейрогипофиз секретирует два важнейших гормона. Это нанопептиды *окситоцин* и *вазопрессин*, образующиеся в резуль-

тате гидролиза общего предшественника, вырабатываемого в гипоталамусе. Окситоцин регулирует тонус гладкой мускулатуры, особенно матки беременных, и по этой причине используется в качестве фармакологического средства для стимуляции родов. Вазопрессин повышает кровяное давление, действуя постепенно и длительно. Этот гормон оказывает сильное влияние на водно-солевой обмен, понижая диурез (выделение мочи). Поэтому вазопрессин называют также антидиуретическим гормоном (АДГ). При его недостатке увеличивается выделение мочи и развивается несахарный диабет.

Гормоны аденогипофиза. В аденогипофизе образуются гормоны, регулирующие активность других эндокринных желез, и гормоны, действующие непосредственно на ткани мишени. К первой группе относятся:

- *адренокортикотропный гормон (АКТГ)* – стимулирует синтез и секрецию стероидных гормонов коры надпочечников;

- *тиреотропный гормон* – усиливает синтез и секрецию тиреоидных гормонов щитовидной железой;

- *гонадотропный гормон* – действует на половые железы.

Гормоны аденогипофиза, действующие на ткани-мишени непосредственно:

- *соматотропный гормон (СТГ)*, или *гормон роста*, – стимулирует синтез РНК и белка, способствует росту всех тканей;

- *пролактин* – стимулирует синтез белка молока и развитие молочных желез.

Надпочечники, расположенные около почек, состоят из двух типов железистой ткани: наружной коры и внутреннего мозгового слоя. На кору надпочечников воздействует АКТГ, который стимулирует в ней синтез и секрецию целой группы кортикостероидов. В эту группу входят: *минералокортикоиды*, регулирующие функцию почек; половые гормоны, главным образом андрогены и *глюкокортикоиды*. Все стероиды имеют в основе циклопентанпергидрофенантеновое ядро и образуются из холестерина. У человека и большинства животных наиболее распространены пять гормонов коркового вещества надпочечников, структурные формулы которых приведены на рис. 16.

Минералокортикоиды (*дезоксикортикостерон* и *альдостерон*) регулируют главным образом обмен натрия, калия, хлора и воды; они способствуют удержанию ионов натрия и хлора в организме и выведению с мочой ионов калия. По-видимому, происходит обратное всасывание ионов натрия и хлора в канальцах почек в обмен на выведение других продуктов обмена, в частности мочевины. Альдостерон, который получил свое название благодаря наличию в его молекуле альдегидной группы у 13-го углеродного атома вместо метильной группы, как у всех остальных кортикостероидов, по влиянию на минеральный обмен в 50–100 раз активнее дезоксикортикостерона.

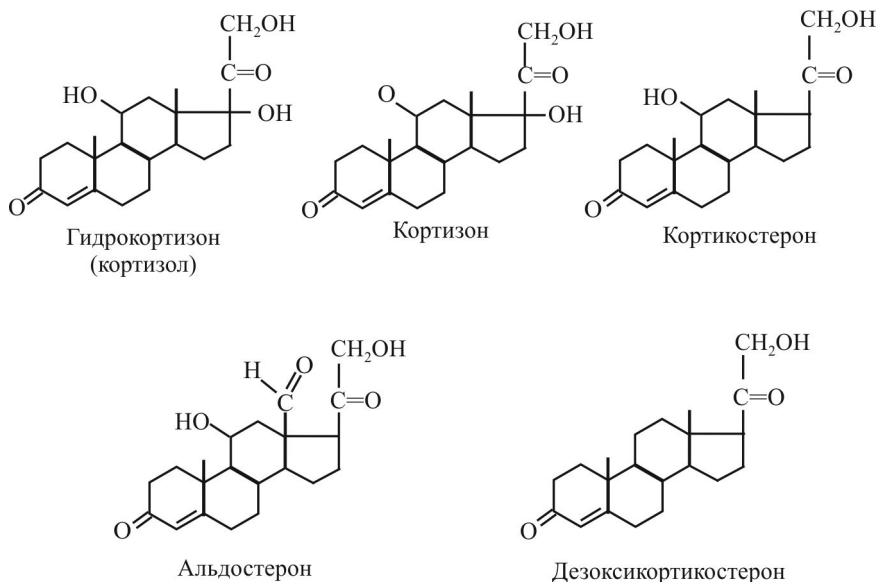


Рис. 16. Химическая структура кортикостероидов

Глюкокортикоиды – важнейшие гормоны коры надпочечников. При хирургическом удалении надпочечников введение одних только глюкокортикоидов обеспечивает выживание особи. У человека основным глюкокортикоидом является *кортизол*. В течение суток концентрация кортизола подвергается существенным колебаниям, подчиняясь *циркадному* (суточному) ритму. В утренние часы концентрация этого гормона в крови значительно выше, чем в вечерние. Кортизол и другие глюкокортикоиды обладают широким спектром действия, в том числе противовоспалительным. Однако наиболее важный эффект глюкокортикоидов заключается в их воздействии на белковый обмен и стимуляции в печени глюконеогеза. В результате выброса глюкокортикоидов активируется катаболизм мышечных белков, а образующиеся аминокислоты поступают в печень, где метаболизируются в процессе глюконеогеза с образованием глюкозы – основного источника энергии в организме. В физиологических условиях все эффекты глюкокортикоидов сбалансированы и направлены на быстрое обеспечение организма энергетическим материалом. Особенно большое значение способность глюкокортикоидов к мобилизации энергетических ресурсов имеет при различных видах стресса. При остром стрессе под действием АКТГ уровень глюкокортикоидов в крови всегда быстро повышается. Глюкокортикоиды в условиях стресса не только улучшают обеспечение организма энергетиче-

ским материалом, но и играют *пермиссивную* (от англ. permission), т. е. разрешающую роль в действии катехоламинов на гладкую мускулатуру сосудов.

Гормоны коркового вещества надпочечников в настоящее время широко используются в клинической практике в качестве лекарственных препаратов. Применение кортизона с лечебной целью явилось следствием случайного наблюдения. Было замечено, что при беременности тяжесть симптомов ревматоидного артрита резко снижается, однако все они вновь появляются после родов. Оказалось, что во время беременности происходят ускорение секреции и поступление в кровь гормонов коркового вещества надпочечников. Параллельное гистологическое исследование надпочечников доказало резкое усиление роста и пролиферации клеток коркового вещества. Эти наблюдения навели на мысль о возможности использования гормонов коркового вещества надпочечников, в частности кортизона, при лечении ревматоидных артритов. Результаты лечения оказались настолько эффективными, что в первые годы применения кортизона наблюдалось почти 100-процентное излечение артритов ревматического происхождения. Обладая противовоспалительной, антиаллергической и антииммунной активностью, глюкокортикоиды нашли широкое применение при лечении таких заболеваний, как бронхиальная астма, ревматоидный артрит, красная волчанка, пузырчатка, сенильная лихорадка, различные аутоиммунные болезни, дерматозы и др. Однако длительное применение кортикостероидных препаратов может привести к серьезным нарушениям обменных процессов в организме.

Катехоламины *адреналин* и *норадреналин* (рис. 17) синтезируются в мозговом слое надпочечников.

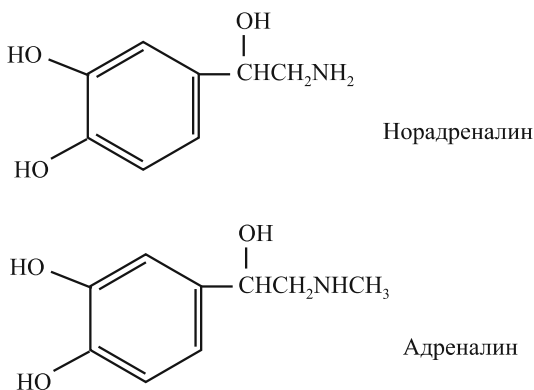


Рис. 17. Химическая структура важнейших катехоламинов

При стрессе они синтезируются и выделяются в кровь в большом количестве, что приводит к усилению сердечной деятельности и, возможно, инициирует образование АКТГ. Кроме того, они действуют на гладкую мускулатуру сосудистой стенки противоположно *монооксиду азота*, т. е. вызывают сокращение гладкой мускулатуры и сужение просвета кровеносных сосудов в различных органах и тканях, за исключением скелетной мускулатуры. В результате кровоток перераспределяется таким образом, что улучшается снабжение мышц кислородом и питательными веществами. (И это очень важно, когда нужны силы для борьбы или спасения бегством.) Однако такое действие катехоламинов проявляется только в присутствии кортизола, который, как уже отмечалось, оказывает при стрессе перmissive, т. е. разрешающее действие. Кроме того, катехоламины, в частности адреналин, обеспечивают мобилизацию энергетических ресурсов организма, активируя процессы гликогенолиза и образования глюкозы. Именно исследование регуляторной роли адреналина и глюкагона в процессах гликогенолиза привело к открытию Д. Сазерлендом цАМФ. Он показал, что оба гормона активируют аденилатциклазу и усиливают образование цАМФ, а это приводит к повышению активности гликогенфосфорилазы, расщепляющей гликоген с образованием глюкозо-1-фосфата.

В нормальных физиологических условиях в организме образующиеся в мозговом слое надпочечников катехоламины действуют разнонаправленно. Например, адреналин увеличивает частоту сердечных сокращений и уменьшает общее сопротивление периферических сосудов, а норадреналин действует противоположным образом. Различие в действии катехоламинов обусловлено тем, что адреналин преимущественно связывается с β -адренергическими рецепторами, при этом активируется аденилатциклаза, а норадреналин – с α -адренергическими рецепторами, в этом случае аденилатциклаза ингибируется и повышается внутриклеточный уровень Ca^{2+} . В некоторых тканях катехоламины вызывают один и тот же эффект, в частности адреналин и норадреналин действуют одинаково на сосуды кожи (сужают) и величину кровяного давления (повышают).

Щитовидная железа выделяет *тиреоидные гормоны L-тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3)* (рис. 18), которые воздействуют на печень, почки, сердце, нервную систему и скелетные мышцы, стимулируя клеточное дыхание и метаболизм, что приводит к увеличению теплопродукции, и это играет важную роль в терморегуляции. Воздействие Т3 на ткани-мишени примерно в четыре раза мощнее, чем у Т4. Действуя совместно с СТГ, тиреоидные гормоны стимулируют синтез белка в период развития.

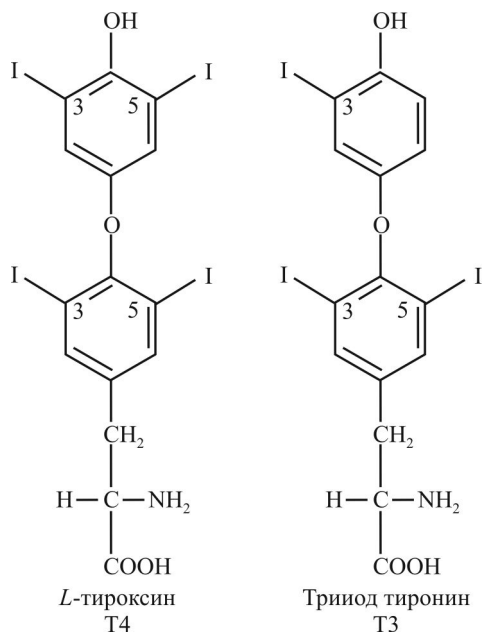


Рис. 18. Химическая структура тиреоидных гормонов

Гормоны щитовидной железы необходимы также для нормального роста и дифференцировки, особенно для образования таких твердых или ороговевших структур, как кости и волосы. Точкой приложения действия тиреоидных гормонов, как и стероидов, считается генетический аппарат. Специфические ядерные рецепторы обеспечивают транспорт тиреоидных гормонов в ядро и взаимодействие со структурными генами, в результате чего увеличивается синтез ферментов, регулирующих скорость окислительно-восстановительных процессов.

Образование Т3 и Т4 регулируется с помощью тиреотропного гормона (ТТГ) по принципу обратной связи. При понижении концентрации тиреоидных гормонов в плазме крови усиливается секреция ТТГ гипофизом, что стимулирует синтез и секрецию Т3 и Т4 секреторным эпителием в щитовидной железе. При повышении концентрации гормонов в плазме крови, напротив, секреция ТТГ гипофизом угнетается, что в свою очередь приводит к снижению продукции тиреоидных гормонов.

Тиреоидные гормоны образуются из аминокислоты тирозина и содержат йод. Для их нормального синтеза у человека в щитовидной железе суточное потребление йода должно составлять примерно 150 мкг. В организм

человека иод поступает в виде химически инертного анион иода. Для включения иода в состав тиреоидных гормонов он должен быть активирован. Образование активного иода происходит в щитовидной железе в результате окисления аниона иода пероксидом водорода до свободного иода или IO_2 . Реакция катализируется ферментом тиреоидпероксидазой.

Щитовидная железа состоит из многочисленных фолликулов, окаймленных секреторным эпителием. Фолликулы содержат белковый коллоид, богатый иодом, — *иодтиреоглобулин*, а также запас тиреоидных гормонов, который при нарушении процессов их синтеза, например вследствие недостаточного поступления иода с пищей, может покрывать потребности организма в течение нескольких месяцев. При дальнейшем недостатке иода в организме развивается *гипотиреоз*. Гипотиреоз приводит к снижению интенсивности всех метаболических процессов, что в свою очередь приводит к замедленной реакции организма на различные внешние раздражители и повышенной утомляемости. У взрослых эти симптомы полностью снимаются с помощью терапевтического приема тиреоидных гормонов. У детей гипотиреоз ведет к замедленному физическому и умственному развитию организма (кретинизм). В некоторых районах с эндемическим дефицитом иода кретинизм встречается довольно часто. В настоящее время для предотвращения развития гипотиреоза используют соответствующую иодную профилактику, например добавляют NaI к поваренной соли.

Сегодня еще полностью не изучены ферментные системы, катализирующие промежуточные стадии синтеза этих гормонов и превращения иодидов в свободный иод, необходимый для иодирования 115 остатков тирозина в молекуле тиреоглобулина. Последовательность реакций, связанных с синтезом гормонов щитовидной железы, была расшифрована при помощи радиоактивного иода (^{131}I). Было показано, что введенный меченый иод прежде всего обнаруживается в молекуле моноиодтирозина, затем — дииодтирозина и только потом — тироксина. Эти данные позволили предположить, что моноиод- и дииодтирозины являются предшественниками тироксина. Однако известно также, что включение иода осуществляется не на уровне свободного тироксина, а на уровне полипептидной цепи тиреоглобулина в процессе его постсинтетической модификации в фолликулярных клетках. Дальнейший гидролиз тиреоглобулина под действием протеиназ и пептидаз приводит к образованию как свободных аминокислот, так и к освобождению иодтиронинов, в частности тироксина, последующее депонирование которого способствует образованию трииодтиронина. Эта точка зрения кажется более правдоподобной с учетом универсальности постсинтетической химической модификации при биосинтезе биологически активных веществ в организме.

Поджелудочная железа выделяет свой секрет (*панкреатический сок*) в желудочно-кишечный тракт (*двенадцатиперстную кишку*), который считается внешней средой по отношению к организму, и поэтому поджелудочную железу относят к *железам внешней секреции (экзокринным железам)*. Однако в небольших эндокринных участках поджелудочной железы, *островках Лангерганса*, расположенных среди *экзокринной* ткани, синтезируются гормоны *глюкагон* и *инсулин*. Полипептидный гормон инсулин оказывает регулирующее действие на метаболические процессы, в том числе стимулирует поглощение глюкозы почти всеми клетками (кроме нервных), облегчая прохождение ее через клеточную мембрану. В этих клетках, особенно жировых и мышечных, имеются цитоплазматические везикулы, содержащие белки, – трансмембранные переносчики глюкозы. Повышенный уровень инсулина в крови и связывание его с поверхностными инсулиновыми рецепторами является сигналом для начала движения данных везикул к плазматической мембране, выхода из них белков-транспортёров, встраивания их в мембрану и резкого возрастания поглощения глюкозы клетками, в первую очередь жировыми и мышечными. В свою очередь синтез, и особенно выделение путем экзоцитоза запасенного в эндокринных клетках гормона, регулируется уровнем глюкозы в крови. При повышении уровня глюкозы в крови выделение инсулина увеличивается, понижение уровня глюкозы крови ведет к прекращению экзоцитоза гормона, и, кроме того, из плазматической мембраны путем эндоцитоза удаляются белки – транспортёры глюкозы. Суммарное действие инсулина ведет к понижению концентрации глюкозы в крови, которая в норме составляет 0,8–1,0 г/л. При нарушении синтеза и недостатке инсулина развивается тяжелое системное заболевание *сахарный диабет*. При сахарном диабете увеличивается содержание сахара в крови (*гипергликемия*), и часть его выводится из организма с мочой. Если заболевание прогрессирует, у больного может наступить *диабетическая кома*, и для его спасения необходимо срочное введение инсулина. Избыточное содержание инсулина в крови может привести к нарушению энергетического обеспечения мозга и потере сознания – *гипогликемической коме*. Повышенная секреция инсулина (например, при опухоли островковых клеток или передозировке экзогенного инсулина) вызывает *гипогликемию* (снижение уровня глюкозы в крови). Поскольку ЦНС получает всю необходимую для ее функционирования энергию в результате окисления глюкозы, поступающей в нервную ткань из крови, то снижение уровня глюкозы в крови до 0,2–0,5 г/л приводит к гипогликемическому шоку, сопровождающемуся помутнением сознания и даже комой. Спасти больного в этом случае можно только срочным внутривенным введением глюкозы. Глюкагон, как и инсулин, является полипептидом, состоящим из 29 аминокислотных остатков. Однако по своим функциям глюкагон – это антагонист инсулина. Он стимулирует расщепление гликогена в печени,

обеспечивая таким образом быстрое повышение концентрации глюкозы в крови. Действие глюкагона опосредуется через каскадный механизм, в котором вторым посредником является цАМФ.

6.2. Нейропептиды

Существенную роль в процессах межклеточной коммуникации играют пептиды, образующиеся в нервной системе. Нейропептиды содержат от 2 до 50–60 аминокислотных остатков. Некоторые из этих нейропептидов играют роль истинных нейромедиаторов, влияющих на постсинаптические клетки, непосредственно примыкающие к тому волокну, которое выделяют нейропептиды. Другие, подобно рилизинг-факторам гипоталамуса, более корректно называть нейросекреторными веществами, т. е. веществами, которые выделяются из нервных окончаний в кровотоки и поступают к клеткам-мишеням с кровью. Существуют данные, что одни и те же пептиды могут выделяться в качестве медиаторов одними нейронами, нейросекретов – другими и, кроме того, тканями внутренних органов в виде гормонов. Подобная полифункциональность не так уж и удивительна, поскольку давно известно, что биогенный амин норадреналин и близкий к нему адреналин образуются как гормоны в мозговом слое надпочечников и высвобождаются некоторыми нервными окончаниями в качестве медиатора. В то же время нейропептиды могут выделяться в качестве медиаторов нервными окончаниями, высвобождающими одновременно и какой-либо классический медиатор, например ацетилхолин, серотонин или норадреналин, и в этом случае они способны функционировать как *синаптические модуляторы* (агенты, влияющие на синаптическое проведение). Несмотря на возможность протеолиза, нейропептиды, в отличие от типичных нейромедиаторов, существуют в организме относительно долго (часы). Это позволяет им достигать достаточно удаленных синапсов и длительное время оказывать на них свое воздействие. При этом нередко на одну и ту же мишень действуют сразу несколько нейропептидов, а один и тот же нейропептид – сразу на несколько мишеней. Благодаря этому могут создаваться различные комбинации модуляторов и клеток-мишеней. Каждой комбинации соответствует определенное функциональное состояние нервной системы и организма в целом.

По своей функции, месту синтеза и структуре все нейропептиды, включая медиаторы и гормоны, подразделяются на 18 семейств. Некоторые из этих семейств включают по 20–30 различных нейропептидов. Эти вещества отнесены к нейропептидам потому, что все они образуются определенными нейронами головного мозга или (как эндорфины) в гипофизе.

Большой интерес у исследователей вызывают две группы нейропептидов – *эндорфины* и *энкефалины*. Эти вещества обладают анальгетическими

(уменьшающими боль), а также другими морфиноподобными свойствами, например, вызывают ощущение удовольствия и эйфорию. Содержание таких веществ в головном мозге увеличивается, когда человек ест, слушает приятную музыку или занимается другими видами деятельности, связанными с появлением чувства удовлетворения. В отношении воздействия на нервную систему эндорфины и энкефалины сходны с *опиатами* (опий и его производные), поэтому их называют *эндогенными опиоидами*. До недавнего времени было неизвестно, почему некоторые алкалоиды, такие как опий, морфин и героин, оказывают столь мощное влияние на нервную систему. Теперь установлено, что на плазматических мембранах некоторых нейронов имеются *опиоидные рецепторы*. В естественных условиях с данными рецепторами связываются эндогенные опиоиды, т. е. энкефалины и эндорфины, и вследствие этого может возникнуть чувство удовлетворения или развиваться анальгетический эффект. С опиоидными рецепторами, кроме соответствующих нейропептидов, способны связываться наркотические опиаты (морфин, кодеин и прочие непептидные опиоиды), выделяемые из растений и по своему строению не сходные с эндогенными полипептидными опиоидами. Чувство удовольствия, сходное с оргазмом, однако более длительное, возникающее в результате мощной естественной стимуляции опиоидных рецепторов наркотиками, побуждает людей к их многократному употреблению. Однако при этом возникают компенсаторные изменения метаболизма нервных клеток, приводящие к развитию наркотической метаболической зависимости. Организм нуждается в постоянном поступлении опиоидов, без которых человек испытывает чрезвычайный дискомфорт. Подобная метаболическая зависимость называется пристрастием, а страдающий ею человек – наркоманом.

При изучении опиоидных рецепторов весьма полезным оказалось вещество *наллоксон* – конкурентный блокатор этих рецепторов. Поскольку наллоксон препятствует связыванию опиатов или опиоидов с клетками-мишенями, с его помощью можно определить, вызвана ли та или иная реакция возбуждением таких рецепторов. Было обнаружено, например, что наллоксон в значительной степени снимает анальгетический эффект *плацебо* (нейтрального вещества, которое дают больным, уверяя их, что оно снимет боль). Очевидно, что вера в лекарство или другое средство лечения, которое должно снять боль, приводит к выбросу опиоидных пептидов; возможно, в этом и состоит физиологический механизм действия плацебо. Наллоксон снимает также обезболивающий эффект иглоукалывания. Отсюда был сделан вывод, что при иглоукалывании из ЦНС выбрасываются естественные опиоидные пептиды. Обезболивающий эффект энкефалинов и эндорфинов может быть связан с тем, что эти нейропептиды препятствуют выделению медиаторов из окончаний нервных клеток, участвующих в формировании болевой чувствительности.

Глава 7

АУТОКРИННАЯ И ПАРАКРИННАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ. ТКАНЕВЫЕ ГОРМОНЫ

7.1. Цитокины

Цитокины (от греч. *cyto* – клетка и *kinos* – движение) – сигнальные молекулы, секретируемые различными клетками, преимущественно иммунной системы. Они регулируют межклеточные взаимодействия, управляют ростом, дифференциацией, пролиферацией и функциональной активностью клеток, стимулируют или подавляют апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях, а также в ответ на патологические воздействия. Цитокины обеспечивают межклеточную коммуникацию как в системе приобретенного, так и врожденного иммунитета.

По химической структуре цитокины являются полипептидами, небольшими белками или гликопротеинами. Цитокины действуют локально (аутокринно или паракринно), но не эндокринно. В этом состоит существенное различие между цитокинами и белковыми гормонами. Другое важное отличие заключается в амплитуде изменения концентрации сигнальных молекул в процессе передачи сигнала. Для гормонов, циркулирующих в крови в наномолярных концентрациях, эти изменения не превышают одного порядка (при выбросе гормонов), тогда как локальная концентрация цитокинов может возрасти при выбросе от пикомолярных до наномолярных концентраций, т. е. на три порядка. Третье и наиболее существенное отличие состоит в том, что цитокины продуцируют в той или иной степени практически все ядерные клетки, особенно эпителиальные, эндотелиальные и иммунокомпетентные, а не только клетки специализированных желез.

Взаимодействие цитокинов с соответствующими клеточными рецепторами включает внутриклеточные каскадные механизмы в клетке-мишени, приводящие к активации или, напротив, ингибированию регуляторов генной экспрессии, так называемых факторов транскрипции, и в конечном итоге к из-

менению функционального состояния клетки. В случае аутокринной сигнализации цитокины регулируют функцию клеток-продуцентов по типу положительной или отрицательной обратной связи. В первом случае изменения в генной транскрипции ведут к дальнейшему возрастанию продукции и экспрессии клеткой цитокинов и соответствующих мембранных рецепторов, а во втором – к их снижению. При паракринном действии, например при развитии воспалительного процесса, цитокины активируют и мобилизуют другие клетки, усиливая системный ответ. Клеточный ответ на воздействия цитокина зависит от его химической структуры и концентрации, количества на клеточной мембране комплементарных к цитокину рецепторов и специфики каскадного механизма, запускаемого в ответ на взаимодействие цитокина с рецептором.

Классификация цитокинов. Все цитокины, а их в настоящее время известно более 30, по структурным особенностям и биологическому действию делятся на самостоятельные группы. Существует несколько подходов к классификации цитокинов в зависимости от признака, который берется за основу. Наиболее ранняя классификация, основанная на типах клеток-мишеней, позволила разделить все известные на то время цитокины на три группы: *лимфокины*, *интерлейкины* и *хемокины*. Первоначально термин «интерлейкины» применялся для цитокинов, воздействующих на лейкоциты. В группу хемокинов объединяли цитокины-хемоаттрактанты или медиаторы хемотаксиса. Однако в последующих исследованиях было установлено, что один и тот же тип цитокинов способен воздействовать на различные клетки мишени. Поэтому в настоящее время термин «интерлейкин» практически стал синонимом термина «цитокин» и используется для названия всех вновь открываемых сигнальных пептидов без учета их конкретной функции. Например, ИЛ-8 (интерлейкин-8) по характеру действия является хемокином.

Классификация, основанная на механизме действия цитокинов, позволяет разделить цитокины на следующие группы:

- провоспалительные – обеспечивают мобилизацию воспалительного ответа (интерлейкины 1, 2, 6, 8, *фактор некроза опухолей альфа* (TNF- α), *интерферон γ*);
- противовоспалительные – ограничивают развитие воспаления (интерлейкины 4, 10, *трансформирующий фактор роста бета* (TGF- β);
- регуляторы клеточного и гуморального иммунитета (естественного или специфического) – обладают собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими).

7.2. Лейкотриены

К лейкотриенам относится группа липидных высокоактивных веществ, образующаяся в организме из арахидоновой кислоты. Подкласс лейкотриенов вместе с *простаноидами* входит в класс *эйкозаноидов*. Известно шесть типов лейкотриенов – А, В, С, D, Е и F.

Лейкотриены образуются из арахидоновой кислоты, которая в свою очередь отщепляется от фосфолипидов цитоплазматической мембраны с помощью фермента *фосфолипаза А2*. Далее арахидоновая кислота может трансформироваться двумя путями: под влиянием циклооксигеназы (ЦОГ) она превращается в *простаноиды*, а под влиянием липоксигеназной ферментной системы – в лейкотриены (рис. 19). Липоксигеназная ферментная система относится к растворимым цитозольным ферментам, они обнаружены в лейкоцитах, альвеолярных макрофагах, тромбоцитах, тучных клетках. Наиболее важным среди ферментов этой системы является *5-липоксигеназа* (5-ЛОГ).

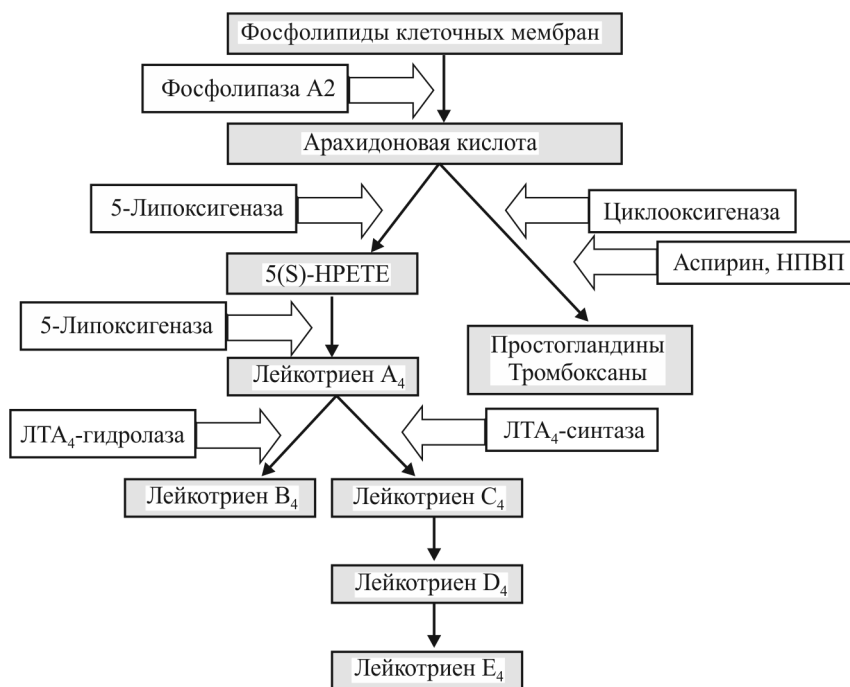
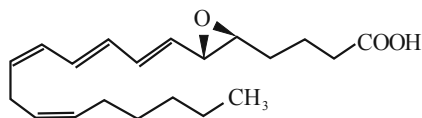


Рис. 19. Основные пути образования эйкозаноидов

Активация перечисленных выше клеток приводит к перемещению 5-ЛОГ к мембране ядерного аппарата и связыванию со специфическим белком – *5-ЛОГ-активирующим протеином* (5-ЛОГ-АП). 5-ЛОГ-АП является кофактором при взаимодействии арахидоновой кислоты и 5-ЛОГ. Под воздействием комплекса 5-ЛОГ+5-ЛОГ-АП арахидоновая кислота превращается в нестабильное

соединение – 5-гидроксипероксиэйкозатетраеновую кислоту (5-НРЕТЕ), из которой в свою очередь образуется ЛТА₄:



Далее ЛТА₄ может превращаться в другие лейкотриены. По химическому строению они характеризуются наличием карбоксильной группы, четырьмя двойными связями (поэтому после написания названия лейкотриена указывают индекс 4) и имеют одинаковое число атомов углерода в основной цепочке (20).

Лейкотриены опосредуют сокращение гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, бронхов, паренхимы легких, кровеносных сосудов, являются активным ионофором для Ca²⁺, обладают выраженным *лейкотропным* действием – вызывают *хемотаксис* (направленное движение) и *хемокинезис* (повышение подвижности) лейкоцитов – и участвуют в воспалительных и иммунных ответах.

7.3. Простагландины

Простагландины (ПГ) – группа липидных физиологически активных веществ, образующихся в организме ферментативным путем из некоторых незаменимых жирных кислот, содержащих 20-членную углеродную цепь. Простагландины являются медиаторами с выраженным физиологическим эффектом. Вместе с тромбоксанами и простациклинами они образуют подкласс простаноидов, которые в свою очередь входят в класс эйкозаноидов. Впервые простагландины были выделены в 1935 г. из семенной жидкости, поэтому термин «простагландин» происходит от латинского названия предстательной железы (лат. *glandula prostatica*). Позже оказалось, что простагландины синтезируются во многих тканях и органах.

По особенностям химического строения ПГ делят на группы, имеющие латинские индексы А, В, Е, F и др., и на подгруппы, обозначаемые арабскими цифрами (ПГЕ1, ПГЕ2 и др.) соответственно количеству двойных связей в молекуле. Количество двойных связей в молекуле простагландинов обусловлено тем, какая полиненасыщенная жирная кислота являлась субстратом для их синтеза: простагландины с одной двойной связью синтезируются из гамма-линоленовой кислоты, с двумя – из эйкозатетраеновой (арахидоновой), с тремя – из эйкозопентаеновой. В процессе образования простагландинов полиеновые кислоты (эндогенные из фосфолипидов или экзогенные) окисляются кислородом под действием *циклооксигеназы* (*простагландинсинтазы*). Существует два типа циклооксигеназ: ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

Считается, что ЦОГ-1 – это конститутивный белок, определяющий базальный уровень простагландинов, а ЦОГ-2 – индуцибельный фермент, биосинтез которого при воспалении многократно возрастает в результате повышения экспрессии соответствующего гена, следствием чего является существенное увеличение секреции простагландинов. ЦОГ имеет два активных центра, в которых протекает циклооксигеназная реакция (окисление арахидоновой кислоты до простагландина G₂) и пероксидазная (восстановление перекисной группы простагландина G₂ до спиртовой) (рис. 20). В результате двух реакций образуется простагландин H₂, который далее под действием специфических ферментов – конвертаз – может превращаться в другие физиологически активные соединения, такие как простагландины E₂, D₂, F_{2a}, тромбоксан A₂, простациклин.

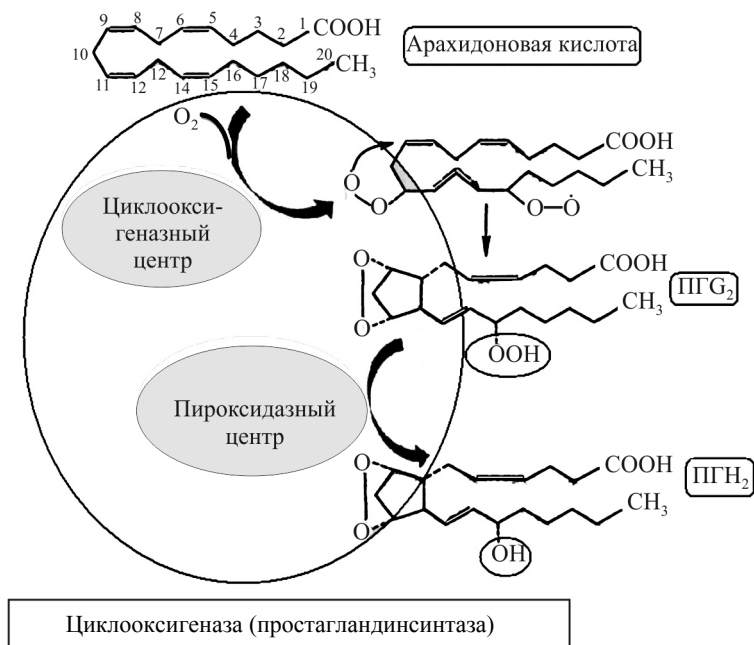


Рис. 20. Молекулярный механизм образования простагландинов

Активный (каталитический) сайт циклооксигеназы представляет собой длинный гидрофобный канал, имеющий остаток серина в положении 530. В 1971 г. Джон Вейн обнаружил, что аспирин – один из наиболее эффективных нестероидных противовоспалительных препаратов – является ингибитором синтеза простагландинов. Аспирин может обратимо ацетилировать

серин 530, что не позволяет арахидоновой кислоте поступать в активный центр и приводит к ингибированию ЦОГ. За исследование простагландинов Вейн и шведские биохимики Суне Бергстрём и Бенгт Самуэльсон получили в 1982 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

В какие же процессы межклеточной сигнализации вовлекаются простагландины? Во-первых, они являются чрезвычайно эффективными аутокринными и паракринными медиаторами воспаления. Их главные мишени в этом случае – эндотелиальные и иммунные клетки. Аспирин, ингибируя продукцию простагландинов, блокирует развитие воспалительного ответа. Во-вторых, простагландины воздействуют на тромбоциты и играют ключевую роль в процессах тромбообразования.

Ранее считалось, что после синтеза простагландины выходят из клетки за счет пассивной диффузии, так как они обладают значительной липофильностью. Однако позже был обнаружен белок-переносчик, который опосредует как клеточный захват, так и секрецию простагландинов. В отличие от большинства сигнальных молекул, взаимодействующих только с одним типом рецепторов, для простагландинов известны как поверхностные, так и внутриклеточные рецепторы. Связывание простагландинов с рецепторами, расположенными на поверхности клетки, приводит к изменению (увеличению или уменьшению) концентрации внутриклеточных циклических нуклеотидов (например, циклического аденозинмонофосфата). В тех случаях, когда простагландины проникают через мембраны внутрь клетки и связываются с ядерными рецепторами, они влияют на процессы транскрипции.

7.4. Простые неорганические молекулы в системе межклеточной коммуникации

В последние годы установлено, что во многих случаях межклеточная сигнализация осуществляется с помощью химически активных, а потому очень нестойких простых неорганических молекул. Классическим примером таких «биосигналов» является *монооксид азота*. Первые публикации об образовании NO в организме человека и животных появились в 1987 г. Исследовательскими группами, возглавляемыми Сальватором Монкадой (Великобритания) и Луисом Иньярро (США) были получены однозначные доказательства того, что фактор, секретируемый клетками эндотелия кровеносных сосудов в ответ на действие ацетилхолина, брадикинина и некоторых других вазодилататоров и вызывающий расслабление гладких мышц сосудов, есть не что иное, как монооксид азота (NO) – газ и свободный радикал.

Монооксид азота является двухатомной нейтральной молекулой, малые размеры и отсутствие заряда у которой обеспечивают высокую проницаемость через мембраны клеток и субклеточных структур. Наличие одного электрона с неспаренным спином придает молекуле NO высокую реакционную способность. Взаимодействуя с другими свободными радикалами, NO способен образовывать ковалентные связи. Благодаря радикальной природе NO может как активировать цепные свободнорадикальные реакции, так и ингибировать их. Кроме того, NO способен взаимодействовать с ионами металлов с переменной валентностью в активном центре белков-ферментов, влияя на каталитическую активность.

Наиболее важная роль монооксида азота связана с регуляцией тонуса гладкомышечных волокон, расположенных в стенках сосудов (рис. 21) и управляющих просветом сосудов, а следовательно, и кровотоком.

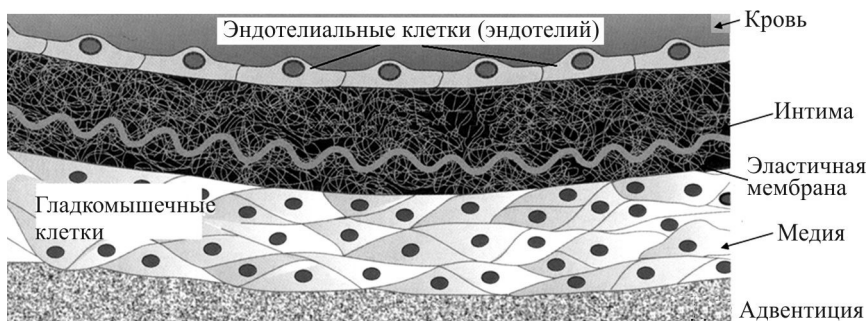


Рис. 21. Клеточная организация сосудистой стенки

Регуляция кровотока представляет собой систему со сложной иерархией (рис. 22). Ее верхний уровень включает волокна автономной (вегетативной) нервной системы. Эти волокна иннервируют все внутренние органы, в том числе и сосудистую стенку. Нервные окончания вегетативных волокон выделяют ацетилхолин, который связывается с рецепторами, расположенными на поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность всех сосудов. В результате стимулируется активность эндотелиальной NO-синтетазы и продуцируется монооксид азота, который легко диффундирует не только через мембрану эндотелиальных клеток, но и через интиму сосудистой стенки, достигая слоя гладкомышечных клеток. Пройдя через плазматическую мембрану этих клеток, монооксид азота взаимодействует с железом в активном центре растворимой гуанилатциклазы, тем самым активируя ее, что приводит к возрастанию концентрации внутриклеточного цГМФ – второго посредника, функционально идентичного упомянутому ранее цАМФ.

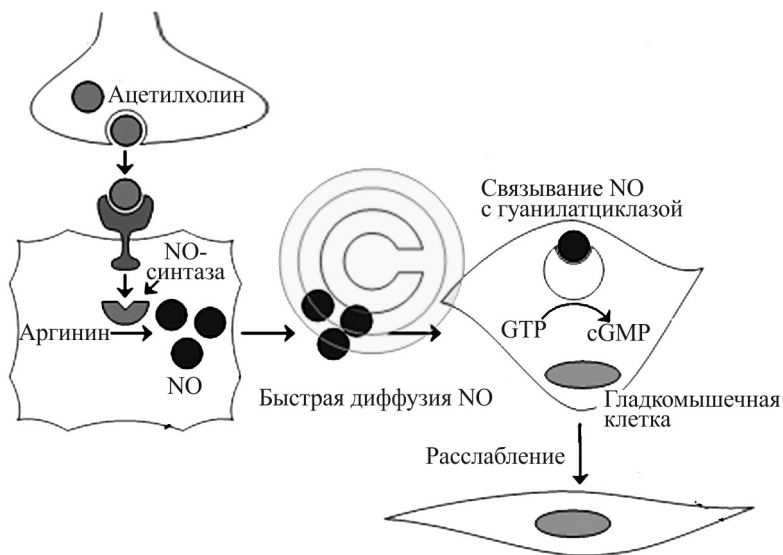


Рис. 22. Механизм регуляции кровотока монооксидом азота

Следствием возрастания концентрации цГМФ в гладкомышечных клетках является их расслабление и вазодилатация (расширение просвета сосудов) и усиление локального кровотока.

Важную роль в процессах клеточной коммуникации играет и нейрональная NO-синтаза. В настоящее время выявлено много типов нервных клеток, использующих монооксид азота для передачи сигналов соседним клеткам.

По типу действия монооксид азота можно отнести к тканевым гормонам. Зона его действия ограничена коротким сроком его существования в межклеточном пространстве, время полужизни составляет всего 5–15 с. Процесс десигнализации NO обусловлен его быстрым окислением кислородом до нитратов и нитритов. Важный фактор, инактивирующий NO, ограничивающий распространение и снижающий его концентрацию, – анион-радикал кислорода ($O_2^{\cdot -}$). Энергия активации взаимодействия двух этих радикалов близка к нулю, благодаря чему они реагируют со скоростью, которая практически лимитируется только скоростью их диффузии. Константа скорости реакции второго порядка равна $3,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В нормальных условиях в клетках и тканях анион-радикал кислорода образуется в незначительном количестве, и его вклад в процесс десигнализации монооксида азота невелик или отсутствует вовсе. Однако установлено, что при некото-

рых предпатологических состояниях увеличение продукции анион-радикала кислорода может привести к спазму сосудов и нарушению кровотока в результате устранения монооксида азота. В частности, локальные нарушения кровотока в органах и тканях могут быть следствием усиленной продукции анион-радикала кислорода фагоцитирующими клетками в очаге воспаления. Показано, что медицинское использование фермента супероксиддисмутазы (СОД), который эффективно убирает избыток анион-радикала кислорода и тем самым предотвращает инактивацию оксида азота, способствует улучшению микроциркуляции при воспалительных процессах и нормализует кровоток после тромбозов, вазоспазмов и других нарушений кровоснабжения. Кроме анион-радикала кислорода монооксид азота инактивируется оксигемоглобином. В крови оксигемоглобин находится внутри эритроцитов, и возможность его взаимодействия с NO ограничена. Однако после кровоизлияний, вызванных травмами или другими причинами, в зоне кровоизлияния происходит частичное разрушение эритроцитов. Оксигемоглобин оказывается в межклеточной среде и может взаимодействовать с NO, следствием чего является снижение концентрации тканевого гормона и развитие вазоспазма.

Открытие биологической роли монооксида азота способствовало и выяснению механизма терапевтического действия нитроглицерина, который уже более 100 лет используется для быстрого снятия боли в сердце, обусловленной недостатком кровоснабжения сердечной мышцы. Американский фармаколог Ферид Мурад показал, что нитроглицерин и сходные лекарства действуют как вазодилататоры в результате образования из них в организме монооксида азота, вызывающего расширение сосудов и тем самым снижающего нагрузку на сердце и потребность его в кислороде. В 1998 г. он с Луисом Иньярро был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине за это открытие.

Глава 8

РЕЦЕПЦИЯ БИОСИГНАЛОВ

8.1. Основные типы поверхностных клеточных рецепторов, их структурные и функциональные особенности

Большинство рецепторов, расположенных на поверхности клетки, в зависимости от запускаемого ими способа трансдукции сигнала принадлежит к одному из трех классов:

- рецепторы, связанные с ионными каналами;
- рецепторы, связанные с G-белками;
- рецепторы, обладающие собственной ферментативной (протеинкиназной) активностью или связанные с протеинкиназами.

8.2. Рецепторы, управляющие трансмембранными ионными каналами

Активация рецепторов, непосредственно управляющих мембранными каналами, в результате взаимодействия с соответствующими сигнальными молекулами приводит к открыванию каналов, т. е. увеличению их проницаемости для тех или иных ионов. Следствием этого может быть резкое увеличение концентрации внутриклеточного кальция, одного из наиболее распространенных вторых посредников, или изменение мембранного потенциала и генерация потенциала действия (ПД) на мембранах нервных и мышечных клеток. В результате распространения ПД по клеткам в клеточных мембранах, в свою очередь, могут открываться потенциалзависимые ионные каналы, в том числе кальциевые.

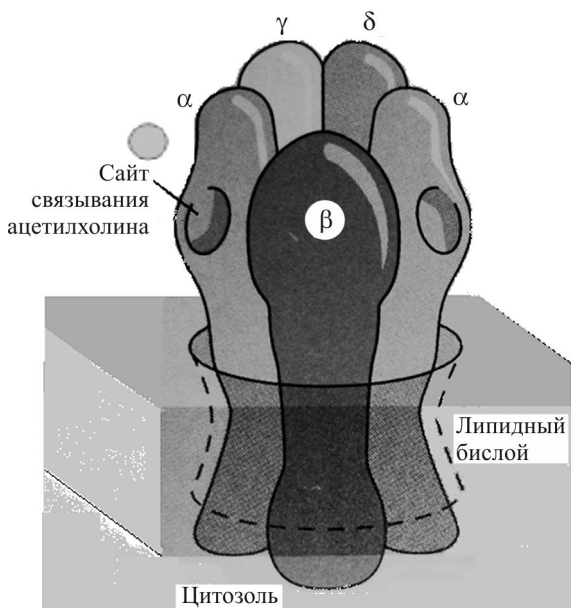


Рис. 23. Молекулярная организация натриевого канала

Поскольку рецепторы расположены непосредственно на каналобразующих белках (рис. 23), передача сигнала, приводящая к их открыванию, осуществляется практически без задержки. Таким образом, в системе межклеточной сигнализации рецепторы, непосредственно управляющие мембранными каналами, опосредуют быстрые клеточные ответы (реакции).

8.3. Рецепторы, сопряженные с G-белками

Рецепторы, сопряженные с GTP-связывающими белками или просто G-белками, составляют наиболее многочисленное семейство плазматических рецепторов у всех одноклеточных и многоклеточных эукариотических организмов. Около 5% всех генов кодируют эти белки у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Тысячи таких генов выявлены у млекопитающих. Например, у мыши около тысячи различных рецепторов, сопряженных с G-белками, выявлены только в системе обоняния. К этой группе рецепторов относятся рецепторы вкусовых клеток и родопсин, воспринимающий электромагнитное излучение в видимой области. Существует множество сигнальных молекул, активирующих пути сигнальной трансдукции посредством рецепторов, сопряженных с G-бел-

ками. К ним относятся гормоны, локальные медиаторы и нейротрансмиттеры. По химической структуре это могут быть пептиды и белки, производные аминокислот и жирных кислот. Существует огромное количество летучих лигандов-ароматов, взаимодействие которых с обонятельными рецепторами, находящимися на клетках обонятельных луковиц нашего носа, воспринимается нами как тот или иной запах. Установлено, что для многих сигнальных молекул существует несколько рецепторов, сопряженных с G-белками. Например, 9 различных рецепторов, сопряженных с G-белками, активируются адреналином, не менее 5 – ацетилхолином и для 15 лигандом является серотонин. Несмотря на структурные и функциональные различия своих лигандов, молекулы всех рецепторов, сопряженных с G-белками, имеют сходную структуру и состоят из одной полипептидной цепи, которая делает четыре неполных петли между наружной и внутренней поверхностью клеточной мембраны. Благодаря такой структуре рецепторы, сопряженные с G-белками, называют также серпентиновыми (змееподобными) рецепторами.

G-белки состоят из трех субъединиц – α , β и γ (рис. 24). В неактивном состоянии субъединица α связана с молекулой ГДФ. В момент образования комплекса сигнальной молекулы с рецептором молекула ГДФ замещается

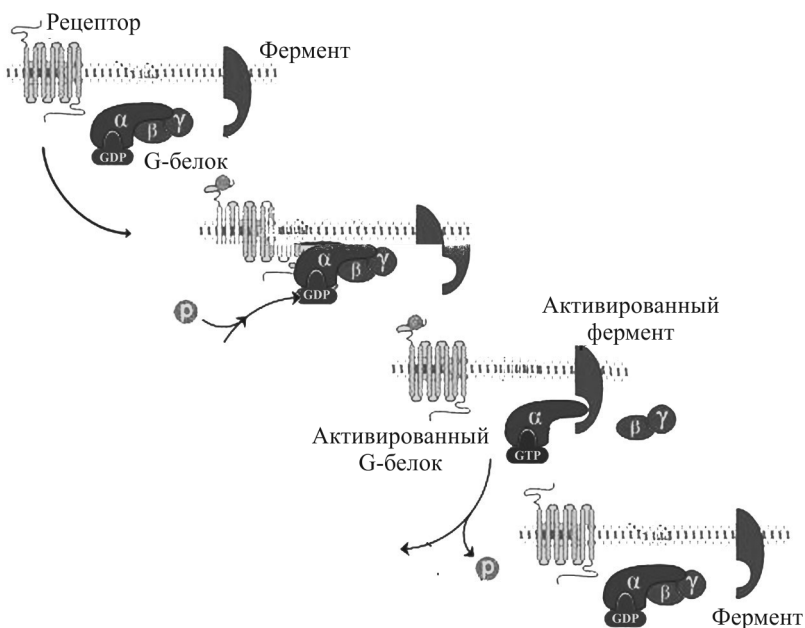


Рис. 24. Передача сигнала рецепторами, сопряженными с G-белками

на ГТФ. Вслед за этим происходит диссоциация тройного комплекса G-белок-ГТФ с образованием свободной субъединицы α и комплекса субъединиц $\beta\gamma$, каждый из образовавшихся фрагментов взаимодействует с последующими элементами системы передачи сигнала. Такими элементами могут быть каналообразующие белки или неактивные ферменты. Результатом передачи сигнала от рецепторов, связанных с G-белками, к каналообразующим белкам часто является развитие потенциала действия и передача нервного импульса. Однако в отличие от рецепторов, непосредственно управляющих мембранными каналами, рецепторы, связанные с G-белками, передают сигналы с задержкой и опосредуют медленные клеточные ответы.

Существует множество сигнальных путей, которые включают взаимодействие активированных G-белков с неактивным ферментом. Основываясь на специфике последующей внутриклеточной передачи сигнала, их можно разделить на две группы:

- сигнальные пути, где в качестве второго посредника функционируют циклические нуклеотиды;
- сигнальные пути, где в качестве второго посредника функционируют ионы кальция (Ca^{2+}).

Примером сигнального пути, опосредованного образованием цАМФ, является взаимодействие субъединицы α активированного G-белка с молекулой аденилатциклазы. В этом случае происходит активация фермента, который начинает продуцировать цАМФ.

Поскольку в данном случае G-белок является активатором аденилатциклазы, он получил название *стимулирующего G-белка* (*Gs*). Gs-белок активирует аденилатциклазу до тех пор, пока сигнальная молекула связана с рецептором. За это время образуется множество молекул цАМФ, и сигнал, передаваемый клетке лишь одной сигнальной молекулой, многократно усиливается. После разрушения лиганд-рецепторного комплекса происходит гидролиз ГТФ до ГДФ, субъединица α прекращает активировать аденилатциклазу, и вновь образуется тройной комплекс – α , β и γ , т. е. неактивная форма G-белка. Активный G-белок может не активировать, а, напротив, ингибировать аденилатциклазу. Такие G-белки получили название «ингибиторные» и обозначаются G_i-белки. Благодаря способности регулировать процесс передачи сигнала G-белки являются мишенью воздействия различных фармакологических агентов, в том числе ядов. В частности, холерный токсин, воздействуя на Gs-белок, видоизменяет субъединицу α таким образом, что она постоянно активирует аденилатциклазу вне зависимости от связывания рецептора с сигнальной молекулой. В результате происходит длительное повышение уровня цАМФ в клетках кишечного эпителия, что

приводит к выходу воды из этих клеток в просвет кишечника и развитию диареи – характерному симптому холеры. У индивидуумов с врожденным, наследственным дефицитом Gs нарушена передача сигналов посредством некоторых гормонов, и по этой причине они страдают нарушениями роста и полового созревания, умственной отсталостью и рядом аномалий процессов обмена веществ.

8.4. Рецепторы, обладающие собственной ферментативной (протеинкиназной) активностью или связанные с протеинкиназами

Протеинкиназы катализируют реакции фосфорилирования белков – одну из наиболее распространенных форм посттрансляционной модификации, кардинально влияющую на третичную структуру и функцию белковых молекул. Фосфорилирование белков переводит их из функционально неактивного в активное состояние. Наиболее часто белки фосфорилируются по спиртовым группам серина, треонина и фенольной группе тирозина. Лигандами рецепторов, обладающих собственной ферментативной (протеинкиназной) активностью или связанных с протеинкиназами, являются внеклеточные сигнальные белки, усиливающие рост, пролиферацию, дифференциацию и влияющие на жизнеспособность клеток животных тканей. Эти сигнальные белки часто называют общим термином «факторы роста». В большинстве случаев они действуют как локальные медиаторы (тканевые гормоны) в очень низких (10^{-8} – 10^{-11} М) концентрациях. Типичный ответ на воздействие факторов роста достаточно медленный (порядка часов), что обусловлено наличием большого числа отдельных этапов на пути внутриклеточной передачи сигнала. Эти пути обычно заканчиваются на регуляторных участках различных генов, и передача сигналов по ним приводит к изменениям в их экспрессии. Рецепторы-ферменты также опосредуют прямые, быстрые эффекты на цитоскелет, обуславливающие различные виды клеточного движения и изменения формы клеток. Внеклеточные сигналы, вызывающие эти эффекты, часто иммобилизованы на поверхностях, по которым осуществляется клеточное движение. Дисфункция сигнальной трансдукции посредством рецепторов-ферментов, ведущая к нарушению процессов пролиферации, дифференциации и способности клеток к миграции, играет ключевую роль в процессах канцерогенеза.

Подобно рецепторам, связанным с G-белками, рецепторы-ферменты являются трансмембранными белками с лигандсвязывающим доменом на

внешней поверхности плазматической мембраны и внутриклеточным доменом, который либо сам обладает ферментативной активностью, либо связан с белком-ферментом. В отличие от рецепторов, связанных с G-белками и имеющих семь трансмембранных сегментов, в молекуле рецепторов-ферментов имеется только один трансмембранный сегмент. Все рецепторы, обладающие собственной ферментативной (протеинкиназной) активностью или связанные с протеинкиназами, можно разделить на шесть классов, наиболее изучены из них следующие:

- рецепторы с тирозинкиназной активностью;
- рецепторы, связанные с ферментами, обладающими тирозинкиназной активностью;
- рецепторы с серин/треонинкиназной активностью.

Наиболее многочисленная группа рецепторов-ферментов – рецепторы с тирозинкиназной активностью.

Глава 9

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ БИОСИГНАЛОВ

9.1. Модульный принцип в формировании трехмерной структуры внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции

Сигналы, воспринимаемые клетками посредством одного из рассмотренных ранее механизмов рецепции, передаются от поверхности вовнутрь клетки с помощью различных по размеру внутриклеточных сигнальных молекул. Небольшие молекулы, называемые «вторые посредники» или «вторые мессенджеры», появляются в большом количестве в ответ на формирование лигандрецепторного комплекса, быстро распространяются путем диффузии от места появления, транслируя тем самым полученный сигнал в другие части клетки. При этом циклические нуклеотиды, инозитол трифосфат и ионы кальция диффундируют по цитозолю, а гидрофобная молекула диацилглицерола, который также является вторым посредником, диффундирует в плоскости плазматической мембраны. *В некоторых сигнальных путях низкомолекулярные вторые посредники отсутствуют и внутриклеточная трансляция сигнала осуществляется при участии только белковых молекул.* Белки, участвующие во внутриклеточной трансдукции сигналов, выполняют одну, а часто и несколько функций (рис. 25), в соответствии с которыми их можно разделить на следующие категории:

- *белки-трансляторы* (эстафетные белки) – просто передают сигнал следующему участнику пути трансдукции;
- *белки-мессенджеры* – передают сигнал от одной части клетки в другую, например из цитоплазмы в ядро;
- *белки-адаптеры* – связывают друг с другом другие сигнальные белки, но непосредственно не участвуют в передаче сигнала;

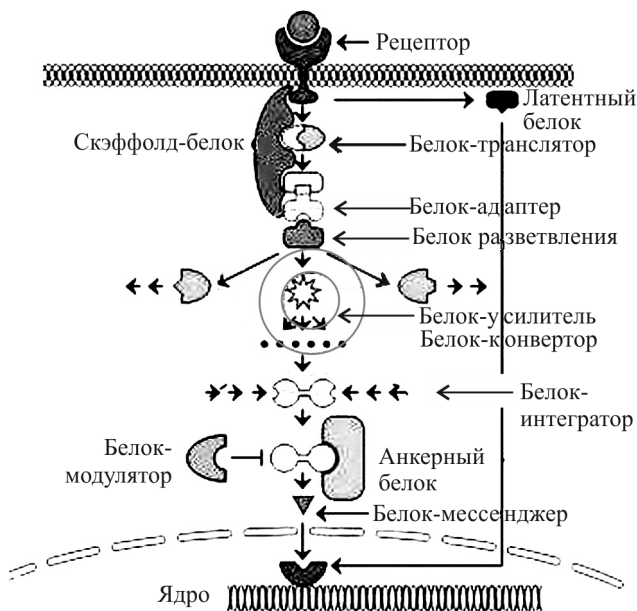


Рис. 25. Белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигналов

- *белки-усилители* – обычно ферменты или каналобразующие белки, способные значительно усилить передаваемый сигнал за счет синтеза (диффузии) большого количества молекул вторых посредников или сигнальных белков;

- *белки-конверторы* – конвертируют сигнал в другую форму; аденилатциклаза является одновременно и белком-усилителем, и белком-конвертором.

- *белки-разветвления* – на них путь сигнальной трансдукции может раздвоиться;

- *белки-интеграторы* – на них замыкаются несколько путей сигнальной трансдукции;

- *латентные ген-регулирующие белки* – активируются на поверхности клетки активным лигандорецепторным комплексом и затем мигрируют в клеточное ядро, где стимулируют процессы транскрипции;

- *анкерные (якорные) белки* – фиксируют специфические сигнальные белки в определенном локусе клетки, прикрепляя их к клеточным мембранам или элементам цитоскелета;

● *скэффолд-белки* – являются белками-адаптерами и анкерными белками, связывающими несколько сигнальных белков в сложный комплекс, который фиксируется в определенном месте клетки.

Молекулярные выключатели. В процессе передачи сигнала многие внутриклеточные сигнальные белки действуют как молекулярные выключатели. Получив сигнал от вышерасположенных компонентов пути трансдукции, они переходят из неактивного в активное состояние (включаются) и находятся в этом состоянии, пока не получают сигнал на выключение. Оба типа сигналов – и «включающий», и «выключающий» – в равной степени важны для нормальной работы системы внутриклеточной сигнализации. Известны два основных типа молекулярных выключателей. Они функционируют различным образом, но в обоих случаях процесс переключения из активного в неактивное состояние основан на получении или потере сигнальным белком фосфатных групп. Работа большей части молекулярных выключателей базируется на чередовании процессов фосфорилирования и дефосфорилирования самого сигнального белка, в результате которых они получают или теряют одну, иногда две фосфатные группы. Реакции фосфорилирования катализируются различными протеинкиназами, большая часть которых фосфорилирует в белках остатки серина или треонина. Кроме серин/треониновых существуют тирозиновые протеинкиназы, присоединяющие фосфатную группу к остаткам тирозина. Следует отметить, что большая часть цитоплазматических белков выполняет в клетке функцию молекулярных выключателей такого типа. Об этом свидетельствует тот факт, что в любой момент времени третья часть белковых молекул в эукариотических клетках находится в фосфорилированном виде. Дефосфорилирование сигнальных белков катализируется различными *протеинфосфатазами*.

Вторая группа молекулярных выключателей объединяет различные ГТФ-связывающие белки или G-белки. В неактивной форме эти белки связаны с АДФ, а при их активации молекула АДФ заменяется АТФ. Последующий гидролиз АТФ до АДФ возвращает G-белки в неактивное состояние.

Интеграция внеклеточных сигналов. Даже простые клеточные ответы и тем более такие сложные формы клеточного поведения, как пролиферация или деление, обычно инициируются не одним, а комбинацией внеклеточных сигналов, воздействующих на конкретную клетку. Процесс интеграции множества сигналов, получаемых клеткой на входе, и запуск характерного для данной комбинации ответа осуществляется при участии белков-интеграторов. Возможные молекулярные механизмы интеграции различных сигналов показаны на рис. 26.

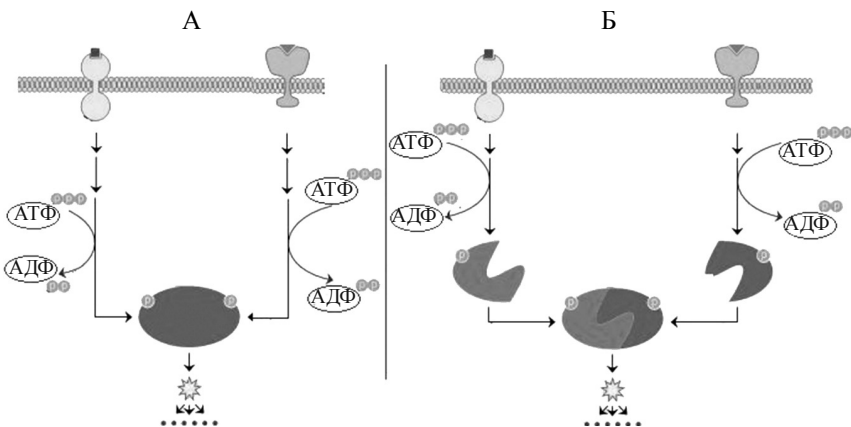


Рис. 26. Молекулярные механизмы интеграции внутриклеточных сигнальных путей

Внутриклеточные сигнальные комплексы. Как отмечалось выше, часто бывает так, что клетки-мишени имеют идентичные рецепторы и с ними связываются одинаковые сигнальные молекулы, и все же это ведет к совершенно разным ответам. Следовательно, ответы клеток-мишеней могут быть запрограммированы не только специфическим набором клеточных рецепторов, но и особенностями нижерасположенных сигнальных путей.

Одним из известных в настоящее время молекулярных механизмов, обеспечивающих такую специфику, является формирование внутриклеточных сигнальных комплексов с помощью скэффолд-белков (рис. 27). Такой внутриклеточный сигнальный комплекс из неактивных сигнальных белков может быть сформирован и прикреплен к определенным рецепторам еще до их взаимодействия с сигнальной молекулой. В этом случае активация рецептора лигандом ведет к активации всех компонентов сигнального комплекса и, как результат, очень точной, быстрой и эффективной передаче сигнала. Более того, такой механизм исключает или уменьшает вероятность нежелательных взаимовлияний различных путей трансдукции.

Аналогичный эффект наблюдается и в случае, когда внутриклеточный сигнальный комплекс формируется после образования комплекса рецептора с сигнальной молекулой. Здесь активация рецептора приводит к тому, что его цитоплазматический «хвост» фосфорилируется по определенным аминокислотам, и эти фосфорилированные аминокислоты служат впоследствии участками прикрепления неактивных сигнальных белков. В резуль-

тате не только формируется комплекс сигнальных белков, но и происходит их активация. Наконец, в некоторых случаях взаимодействие рецептора и лиганда ведет к модификации фосфолипидов в прилежащем к рецептору участке плазматической мембраны. Такая модификация фосфолипидов делает их способными присоединять определенные сигнальные белки, что ведет к образованию специфического комплекса сигнальных молекул в этой области мембраны. Время жизни такого комплекса определяется продолжительностью существования комплекса рецептора с сигнальной молекулой.

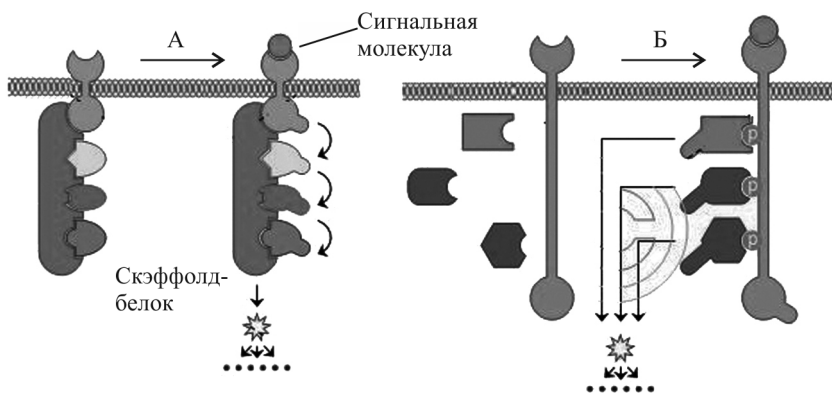


Рис. 27. Молекулярная организация внутриклеточных сигнальных комплексов

Градуальные ответы клеток на внешние стимулы и ответы по типу «все или ничего». Некоторые реакции клеток на сигнальные молекулы бывают плавными (градуальными) и усиливаются прямо пропорционально увеличению концентрации сигнальной молекулы. Такими обычно бывают ответы клетки на действие стероидных гормонов. Это происходит потому, что каждый рецептор, связывая одну молекулу соответствующего лиганда, инициирует один путь сигнальной трансдукции, действующий на конечный белок-мишень, независимо от активации других аналогичных путей. Однако реакция клеток на увеличение концентрации сигнальной молекулы может начинаться более резко и даже проходить по типу «все или ничего».

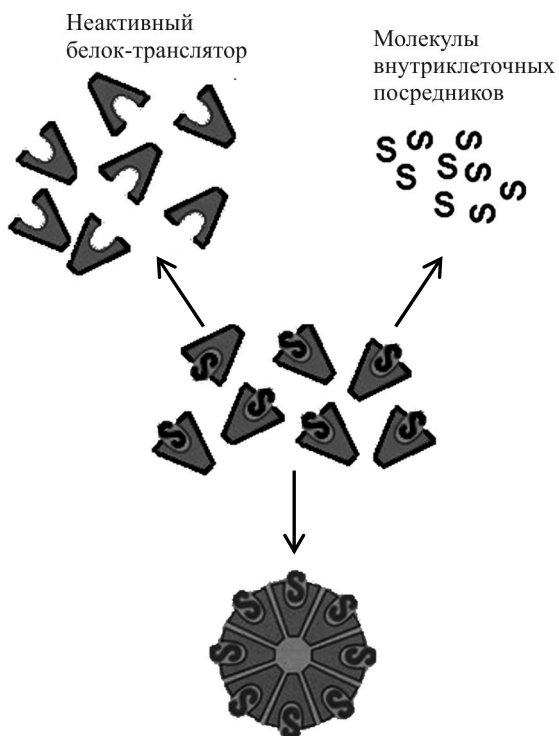


Рис. 28. Возможный молекулярный механизм кооперативного усиления сигнала

Молекулярный механизм таких ответов включает этап кооперативного усиления сигнала. В этом случае взаимодействие лигандов с рецепторами приводит к образованию внутриклеточных посредников, которые могут транслировать сигнал только после накопления их в концентрации, достаточной для их кооперативного взаимодействия (рис. 28).

9.2. Протеинкиназные каскады

Во многих случаях внутриклеточная трансдукция сигнала осуществляется только при помощи сигнальных белков, т. е. без участия вторых посредников. В значительной степени это обусловлено тем, что большинство фосфорилируемых сигнальных белков сами обладают протеинкиназной активностью, при этом такие сигнальные белки образуют так называемый

каскад фосфорилирования, или протеинкиназный каскад, в котором каждая предыдущая протеинкиназа фосфорилирует последующий белок, благодаря чему на каждом этапе такой цепочки сигнал многократно усиливается.

Примером такого каскадного механизма являются *митогенактивируемые протеинкиназы* (МАРК). Термин «митоген» используется для обозначения любого агента, усиливающего митоз. МАРК являются эволюционно консервативным семейством серин/треониновых протеинкиназ, катализирующих фосфорилирование белков по остаткам серина или треонина и широко распространенных в эукариотических организмах от дрожжей до человека. Они участвуют в реализации многочисленных клеточных программ, таких как пролиферация, дифференциация, клеточная подвижность и гибель. МАРК функционируют в составе нескольких протеинкиназных каскадов с трехмодульной иерархией. Конечный модуль в каждом каскаде представлен соответствующей МАРК, непосредственно воздействующей на различные *факторы транскрипции* в клеточном ядре, что приводит к соответствующим клеточным ответам. В качестве примера таких киназ можно привести *киназу, регулируемую внеклеточными сигналами* (Erk) и *стресс-активируемую протеинкиназу* (SAPK). Митоген-активируемые киназы конечного уровня фосфорилируются киназами второго уровня или *МАРК-киназами* (МАРКК). Примером таких *киназ киназ* является *МАРК/Erk-киназа* (МЕК). Киназы второго уровня фосфорилируются киназами третьего уровня, или *киназами киназкиназ* (МАРККК). К таким киназам относятся *киназа смешанного происхождения* (MLK) и активируемая бета-трансформирующим фактором роста (TGF) киназа (ТАК). Протеинкиназы третьего уровня «включаются» активированным рецептором непосредственно или через G-белки.

9.3. Сигнализация через NF-κB-белки (ядерный фактор κB)

Еще одним примером путей внутриклеточной передачи сигналов без участия низкомолекулярных посредников является путь, включающий *ядерный фактор kappaB* (nuclear factor-kappaB, NF-κB). Этот белок является ключевым транскрипционным элементом, обуславливающим развитие воспалительной и иммунной реакции, и способствует защите клетки и организма от стресса. NF-κB может активироваться при вирусной или бактериальной инфекции, активации В- или Т-клеток, гиперпродукции биорадикалов в результате воздействия на организм УФ-излучения, минеральных частиц и других физико-химических факторов. Действие всех этих стимулов опосредуется через образование липополисахаридных фрагментов бактериальной стенки (ЛПС), факторов роста и различных цитокинов, воздействую-

щих на соответствующие поверхностные рецепторы. Наиболее сильные активаторы NF- κ B такие провоспалительные цитокины, как фактор некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкин 1 (ИЛ-1), выделяемые активированными макрофагами.

NF- κ B представляет собой гомо- или гетеродимерный белок, состоящий из комбинации пяти субъединиц, относящихся к семейству Rel: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB, и c-Rel (Rel) (рис. 29). Все Rel белки содержат гомологичный, консервативный домен на N-конце, называемый RHD (Rel homology domain). N-конечный участок RHD обеспечивает связывание белка с ДНК и называется *ДНК-домен*. На C-конце RHD локализован домен димеризации. Рядом расположен участок NLS (Nuclear localization signal), играющий важную роль в транспорте активного NF- κ B комплекса в ядро. В результате гетеро- и гомодимеризации данных субъединиц образуются димерные молекулы p50/RelA, p50/c-Rel, p52/c-Rel, RelA/c-Rel, RelA/RelA, p50/p50, p52/p52, RelB/p50 и RelB/p52.

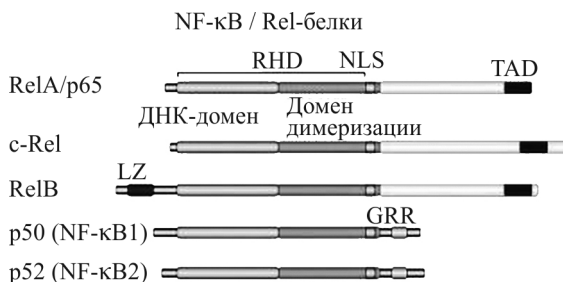


Рис. 29. Доменная организация сигнальных белков семейства Rel

NF- κ B-димер удерживается в цитоплазме неактивированных клеток в результате нековалентного взаимодействия с ингибиторным протеином, семейства I- κ Bs. К настоящему времени известно семь белков этого семейства: I- κ B-alpha, I- κ B-beta, I- κ B-gamma, I- κ B-epsilon, BCL3, p100 и p105. Все эти белки содержат повторяющиеся 30–33 раза последовательности *aa*, так называемый анкирин. Анкирин взаимодействует с RHD NF- κ B, в результате маскируется область NLS. При воздействии на клетку сигналов, активирующих NF- κ B, инициируется фосфорилирование I- κ Bs протеинкиназой IKK (I- κ B kinase complex) (рис. 30). IKK состоит из трех субъединиц, две из которых – IKK-alpha (IKK1) и IKK-beta (IKK2) – обладают протеинкиназной активностью, тогда как третья – IKK-gamma (NEMO) – не имеет каталитической активности, но выполняет ключевую регуляторную роль. Фосфорилированный I- κ B узнается убиквитин-лигазным комплексом, который катализирует полиубиквитинирование I- κ B, что является сигналом для

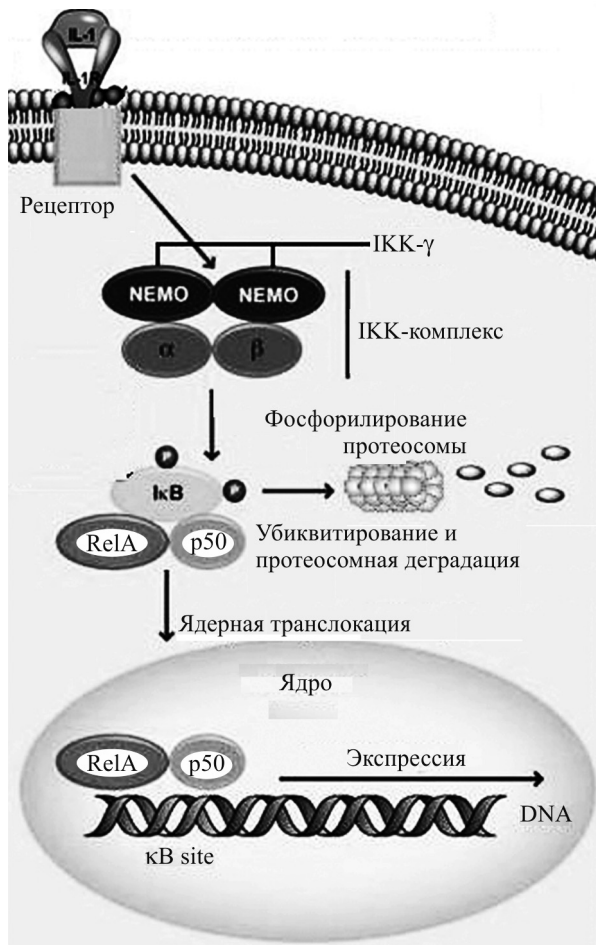


Рис. 30. Сигнализация через NF-κB (ядерный фактор κB)

последующей его протеосомной деградации. Высвобожденный ядерный фактор переносится в ядро (транслокация), связывается с ДНК в карраВ-связывающем участке и активирует экспрессию соответствующего гена (рис. 30).

Глава 10

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВТОРЫЕ ПОСРЕДНИКИ

10.1. Сигнальная трансдукция посредством циклических нуклеотидов

В животных клетках цАМФ осуществляет передачу сигнала главным образом путем активации сигнального белка, называемого цАМФ-зависимой протеинкиназой или *A*-киназой. В неактивном состоянии *A*-киназа представляет собой комплекс из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц (рис. 31). Связывание цАМФ с регуляторными субъединицами изменяет их конформацию, что приводит к распаду комплекса и высвобождению каталитических субъединиц, которые в свою очередь активируют белки-мишени, катализируя их фосфорилирование по остаткам серина и треонина.

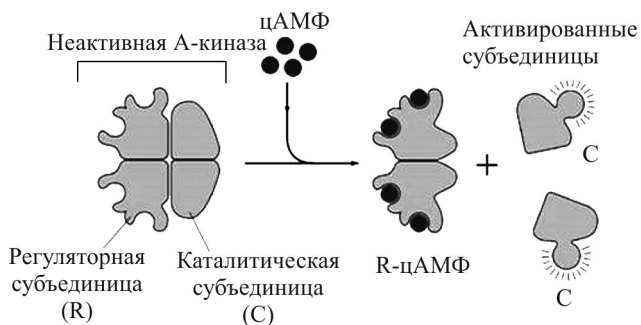


Рис. 31. Механизм активации цАМФ-зависимой протеинкиназы (*A*-киназы)

Впервые цАМФ-зависимое фосфорилирование белков было выявлено при изучении метаболизма гликогена в скелетных мышцах. Как уже отмечалось, гликоген является основным субстратом для получения энергии в мышцах при интенсивной физической нагрузке и в условиях стресса. Расщепление гликогена с образованием глюкоза-1-фосфата регулируется адреналином, концентрация которого в крови при стрессе резко возрастает. Связывание адреналина с β -адренергическими рецепторами приводит к активации аденилатциклазы, возрастанию уровня цАМФ в цитозоле и активации А-киназы (рис. 32). А-киназа фосфорилирует киназу фосфорилазы, которая в свою очередь фосфорилирует и активирует гликогенфосфорилазу – фермент, отщепляющий остатки глюкозы от молекулы гликогена с образованием глюкоза-1-фосфата.

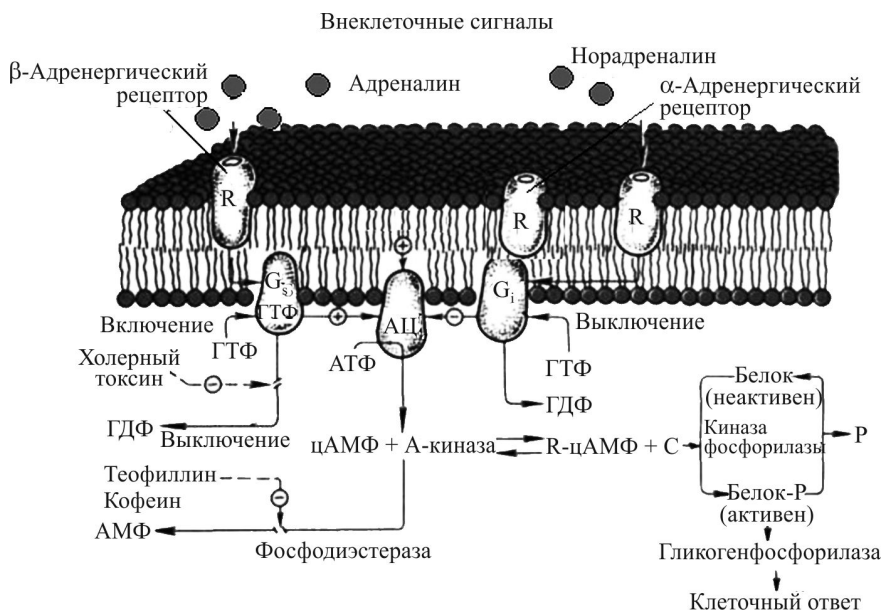


Рис. 32. цАМФ-зависимая внутриклеточная передача сигнала

Для осуществления постоянной передачи внутриклеточного сигнала, как и для регуляции интенсивности протекания метаболических процессов, в зависимости от потребностей клетки необходимо не только фосфорилировать, но и дефосфорилировать сигнальные белки. В животных клетках отщепление фосфатной группы в большинстве случаев катализируют две *протеинфосфатазы*. Активность одной из них регулируется цАМФ таким образом, что она наиболее активно осуществляет дефосфорилирование сиг-

нальных и регуляторных белков в отсутствие цАМФ. Повышение уровня цАМФ приводит к снижению активности протеинфосфатазы, скорость дефосфорилирования многократно уменьшается, а интенсивность фосфорилирования сигнальных и регуляторных белков А-киназой, напротив, увеличивается. Растительные алкалоиды из листьев чая и зерен кофе – кофеин и теofilлин (группа метилксантинов) – являются ингибиторами фосфодиэстераз и способны стимулировать обменные процессы, повышая внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов (см. рис. 32). Именно этот молекулярный механизм обуславливает способность крепкого чая и кофе повышать физическую и особенно умственную работоспособность человека.

10.2. Роль ионов кальция в процессах внутриклеточной передачи сигнала

Первые данные о роли ионов кальция как внутриклеточного посредника были получены в 1947 г., когда выяснилось, что инъекция в мышечную клетку ионов кальция вызывает ее сокращение. В последующие годы установили, что многие экстраклеточные сигналы, как опосредованные, так и неопосредованные через G-белки, индуцируют увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, который является вторым посредником в разнообразных клеточных реакциях. В яйцеклетке, например, резкий подъем концентрации внутриклеточного кальция происходит в результате их оплодотворения сперматозоидом. Кальций выходит в цитоплазму из цистерн эндоплазматического ретикулума и способствует изменению клеточной поверхности яйцеклетки таким образом, что другие сперматозоиды не могут войти в нее. Волна повышения уровня кальция начинается в участке цитоплазмы, непосредственно прилегающем к месту вхождения сперматозоида в клетку, и менее чем за минуту распространяется по всей клетке. Введение в яйцеклетку флуоресцентного красителя, чувствительного к Ca^{2+} , позволяет визуализировать процесс распространения ионов кальция по цитоплазме и наблюдать его с помощью флуоресцентного микроскопа. Во многих секреторных клетках, включая нейросекреторные, подъем внутриклеточной концентрации кальция стимулирует процессы секреции. Ионы кальция играют ключевую регуляторную роль и в клеточном делении (пролиферации).

Возможность использовать Ca^{2+} в качестве внутриклеточного сигнала обусловлена существованием эффективных механизмов, позволяющих быстро изменять внутриклеточную концентрацию. В отсутствие внеклеточных сигналов концентрация Ca^{2+} в цитозоле клеток очень низкая – 10^{-7} М.

В то же время его внеклеточная концентрация и концентрация во внутриклеточном кальциевом «депо» – эндоплазматическом (саркоплазматическом) ретикулуме – достигает 10^{-3} М и выше. Наличие огромного кальциевого градиента создает возможность возникновения кальциевого тока, направленного в цитозоль через кальциевые каналы, расположенные на плазматической мембране и мембранах эндоплазматического (саркоплазматического) ретикулума (рис. 33). Открывание каналов происходит под влиянием вне- или внутриклеточных сигналов и приводит к значительному (в некоторых клетках на порядок) и быстрому (за несколько мс) возрастанию цитоплазматической концентрации Ca^{2+} . Десигнализация кальций-зависимой передачи после прекращения действия сигнала осуществляется в результате быстрого снижения внутриклеточной концентрации кальция до исходного уровня. Удаление кальция из цитозоля во внеклеточное пространство или внутриклеточное депо обеспечивают специальные АТФ-зависимые кальциевые насосы, располагающиеся в клеточных мембранах. В нервных и мышечных клетках, где концентрация цитозольного кальция изменяется наиболее сильно, имеется дополнительный натрий-кальциевый насос. Этот механизм откачки ионов кальция обладает сравнительно низким средством к Ca^{2+} и эффективно функционирует только при 10-кратном превышении нормального уровня ионов кальция в цитозоле, что происходит в случае многократной стимуляции электровозбудимых клеток.

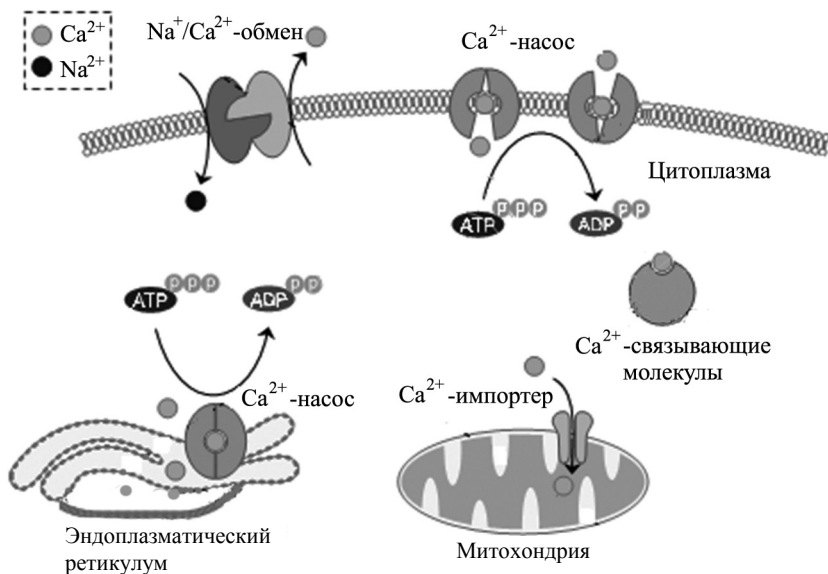


Рис. 33. Механизмы регуляции концентрации ионов кальция в цитоплазме

Какую же роль играют ионы кальция в электрически активных клетках? Известно, что при передаче сигнала через химические синапсы потенциал действия, достигнув пресинаптического окончания, деполяризует мембрану в зоне синапса, тем самым активируя (открывая) потенциалзависимые кальциевые каналы. Поскольку внутриклеточная концентрация ионов кальция значительно меньше, чем внеклеточная, Ca^{2+} входит в зону синаптического окончания. Повышение внутриклеточного уровня кальция в пресинаптическом окончании нервных волокон инициирует экзоцитоз везикул, наполненных медиатором. Содержимое везикул высвобождается во внеклеточное пространство, и молекулы медиатора, диффундируя, связываются с рецепторными молекулами постсинаптической мембраны.

В скелетных мышцах ионы кальция запускают процессы сокращения, обеспечивая синхронизацию передачи сигнала всем *миофибриллам* мышечного волокна о начале сокращения. Этот сигнал достигает практически одновременно каждого саркомера и инициирует активное скольжение тонких актиновых нитей относительно толстых миозиновых. Каким же образом реализуется сигнальная роль ионов кальция в процессе мышечного сокращения? Оказывается, действие ионов кальция опосредуется комплексом специализированных вспомогательных белков, тесно связанных с актиновыми филаментами (рис. 34). Один из таких белков – *тропомиозин* – жест-

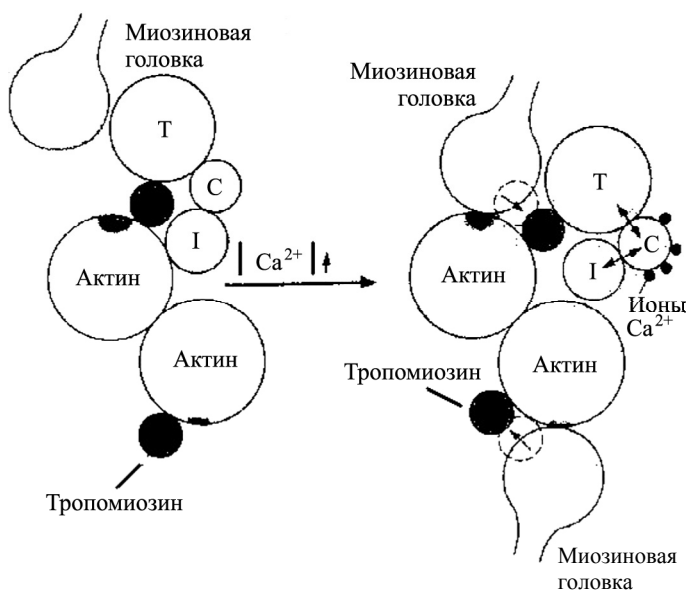


Рис. 34. Роль тропонина и ионов кальция в мышечном сокращении

кая стержнеобразная молекула, связанная с актиновым филаментом по всей его длине, тем самым придающая ему жесткость. Другой важнейший вспомогательный белок, участвующий в регулировании мышечного сокращения ионами кальция, – *тропонин*. Он представляет собой комплекс из трех полипептидов – *тропонинов Т, I и С*. Тропонин Т связывается с тропомиозином (отсюда название) и определяет положение всего комплекса на тонком филаменте. Тропонин I – это ингибиторная субъединица, обеспечивающая способность комплекса блокировать присоединение миозиновых поперечных мостиков к актиновому филаменту. Ингибиторный эффект тропонина I обусловлен тем, что его расположение в белковом комплексе создает стерическое препятствие для такого взаимодействия. Тропонин С является центром связывания ионов Ca^{2+} .

Таким образом, в отсутствие ионов кальция, т. е. в покоящейся мышце, тропониновый комплекс размещен так, что тропомиозин и тропонин I препятствуют прикреплению головки поперечных мостиков к *миозинсвязывающим* центрам актина. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле приводит к его связыванию с тропонином С. В результате этого меняется конформация всего комплекса, происходит смещение молекулы тропонина I, открывающее миозинсвязывающий центр и позволяющее миозиновым поперечным мостикам присоединиться к актиновому филаменту. Следствием такого взаимодействия является скольжение актиновых нитей относительно толстых миозиновых, что приводит к сокращению саркомеров и поперечно-полосатой мышцы в целом. Возможность для соединения поперечного мостика с актином существует до тех пор, пока ионы кальция не будут удалены из тропонинового комплекса.

Каким же образом сигнал о начале мышечного сокращения передается от ЦНС к отдельным миофибриллам? В мышцах есть мембранная система, называемая *саркоплазматическим ретикулумом (СР)* (рис. 35). СР обволакивает наподобие полой манжеты отдельно каждую миофибриллу. На уровне Z-пластины каждого саркомера цистерны СР вступают в тесный контакт с Т-трубочкой и как бы сжимают ее между собой. Т-трубочки (Т-система), имеющие диаметр 50 нм, анатомически соединяют поверхностную мембрану с миофибриллами, лежащими в глубине мышечного волокна, и обеспечивают перенос ПД с поверхностной мембраны внутрь клетки к каждой миофибрилле. ПД передается на мышцу с нервных волокон через химический синапс, распространяется по поверхностной клеточной мембране мышечных волокон, а затем по Т-системе до цистерн саркоплазматического ретикулама, прилежащих к каждому отдельному саркомеру. Электрическое возбуждение Т-трубочек приводит к открытию в мембране цистерн саркоплазматического ретикулама кальциевых каналов, и ионы Ca^{2+} , концентрация которых в ретикулауме очень высокая (до 10^{-3}M), выходят в цитозоль, где

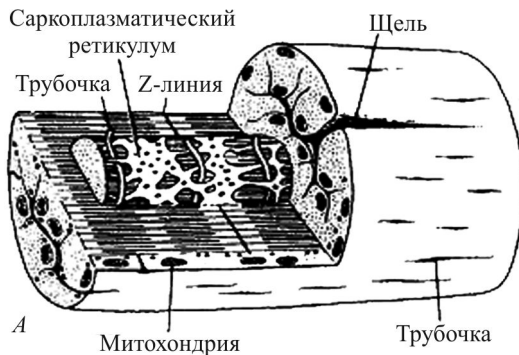


Рис. 35. Морфологическая основа внутриклеточной передачи сигнала, вызывающего сокращение миофибрилл

находятся миофибриллы. В результате концентрация свободных ионов кальция в цитозоле за несколько миллисекунд возрастает от значения 10^{-7} М и ниже (в покое) до 10^{-6} и более (в активном состоянии). Ионы Ca^{2+} связываются с тропонином С, инициируя тем самым сокращение миофибрилл. Поскольку время прохождения сигнала от плазматической мембраны через Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум до каждого саркомера измеряется миллисекундами, сокращение всех миофибрилл в клетке происходит практически одновременно. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле кратковременно, так как ионы кальция быстро перекачиваются обратно в цистерны СР Ca^{2+} -АТФ-азой, содержащейся в большом количестве в мембранах СР. Обычно одиночный ПД вызывает повышение концентрации Ca^{2+} всего на 30 мс, и этого времени достаточно только для однократного взаимодействия миозиновых головок поперечных мостиков с актином. В этом случае развивается минимальная мышечная сила. Если потенциалы действия в мышечном волокне возникают с интервалами менее 30 мс, то ионы кальция не успевают быть выведены из цитоплазмы, и количество взаимодействий миозиновых головок поперечных мостиков с актиновыми филаментами будет максимальным. Очевидно, что в этом случае мышца развивает наибольшую силу.

10.3. Сигнальная трансдукция посредством инозитолфосфолипидов

Предположение о роли инозитолфосфолипидов в передаче сигналов впервые возникло в 1953 г., когда было обнаружено, что некоторые внеклеточные сигналы стимулируют включение радиоактивного фосфора в *фосфатидилино-*

зитол (PI) – минорный фосфолипид клеточной мембраны. Несколько позднее было доказано, что этот феномен обусловлен реакциями расщепления и синтеза *инозитолфосфолипидов*, которые запускаются в результате активации рецепторов, связанных с ферментом *фосфолипазой С-β*. В настоящее время установлено, что посредством инозитолфосфолипидных путей осуществляется внутриклеточная передача сигнала у ряда гормонов и медиаторов, в частности ацетилхолина, вазопрессина, тромбина. Их рецепторы, связавшись с соответствующими лигандами, в большинстве случаев оказывают свое действие на фосфолипазу С-β через G-белки, получившие название *G_q-белки*. G_q-белки активируют фосфолипазу С-β аналогично тому, как G_s-протеин активирует аденилатциклазу. Активированный фермент воздействует на инозитолфосфолипиды внутреннего слоя клеточной мембраны. Пул этих фосфолипидов включает фосфатидилинозитол и образующиеся из него под действием соответствующих киназ *полифосфоинозитиды*: фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI(4)P), фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PI(4,5)P₂). Все три фосфолипида могут быть субстратом фосфолипазы С-β, однако только PI(4,5)P₂ в результате расщепления дает две молекулы вторых посредников: *инозитол-1,4,5-трифосфат* (IP₃) и *диацилглицерол*. На этой стадии путь сигнальной трансдукции разделяется на два направления (рис. 36).

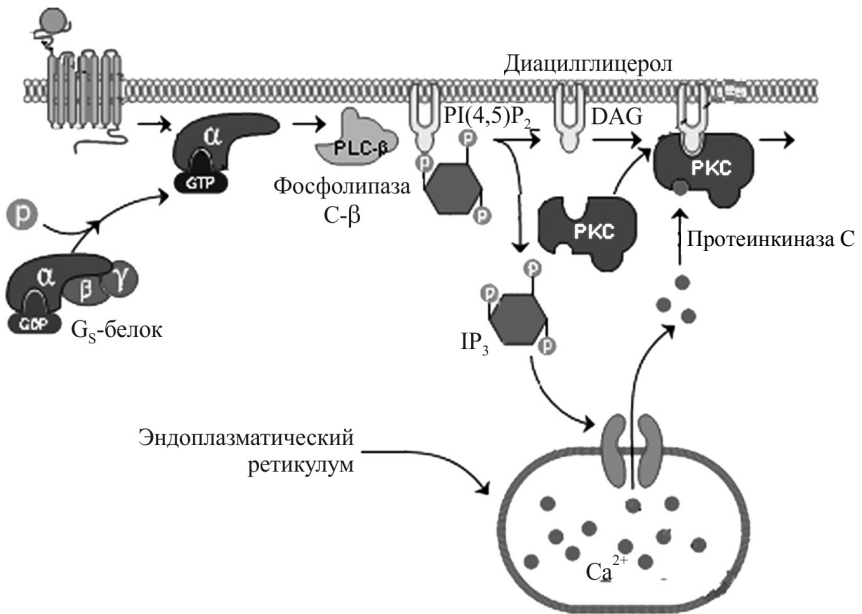


Рис. 36. Сигнальная трансдукция посредством инозитолфосфолипидов и ионов кальция

Инозитол-1,4,5-трифосфат – небольшая водорастворимая молекула, покидает мембрану сразу после образования и быстро диффундирует через цитозоль, достигая мембран эндоплазматического ретикулума, связывается с ними. В результате открываются IP_3 – управляемые ворота кальциевых каналов в мембране ЭР, и кальций, содержащийся в большом количестве в полости ЭР, начинает быстро поступать в цитозоль. После прекращения действия сигнала десигнализация кальций-зависимой передачи осуществляется в результате быстрого снижения внутриклеточной концентрации кальция до исходного уровня. Механизмы десигнализации направлены, с одной стороны, на удаление из клетки молекулы IP_3 и тем самым на закрытие кальциевых каналов и прекращение поступления его в цитозоль, а с другой – на удаление ионов кальция в клеточные депо кальциевыми насосами, имеющимися в клеточных мембранах. В клетках IP_3 обычно либо дефосфорилируется специфической фосфатазой до IP_2 , либо, напротив, фосфорилируется до IP_4 .

Диацилглицерол, гидрофобная молекула, образовавшаяся в результате расщепления фосфатидинозитол-4,5-бифосфата, остается во внутреннем слое плазматической мембраны, где выполняет две функции в процессах биосигнализации. Во-первых, диацилглицерол подвергается дальнейшим процессам расщепления, в результате которых образуется арахидоновая кислота, являющаяся субстратом для синтеза важной группы тканевых гормонов простагландинов и других эйкозаноидов. Во-вторых, наиболее важная роль диацилглицерола в процессах внутриклеточной передачи сигнала заключается в способности этого соединения активировать фермент *протеинкиназу С* (РКС). Буква С в названии этой серин-треониновой протеинкиназы означает, что это кальций-зависимый фермент, проявляющий максимальную активность при наличии в среде ионов кальция. Повышение концентрации внутриклеточного кальция в ответ на образование инозитол-1,4,5-трифосфата приводит к связыванию Ca^{2+} с РКС, вследствие чего конформация фермента изменяется таким образом, что изначально цитоплазматический фермент переносится к внутренней стороне плазматической мембраны, где взаимодействует с диацилглицеролом. В результате образуется активный комплекс, способный эффективно фосфорилировать различные белки-мишени.

Важной особенностью протеинкиназы С является наличие в ее структуре уникальной аминокислотной последовательности, благодаря которой фермент обладает высокой чувствительностью к окислительной модификации. Другими словами, протеинкиназа С представляет собой чувствительный элемент, или биосенсор, реагирующий на возникновение окислительного стресса. Полагают, что некоторые биологические эффекты оксидантов (органические пероксиды) и антиоксидантов (витамин Е) реализуются че-

рез воздействие на РКС. При этом оксиданты окисляют чувствительный элемент и ингибируют активность фермента, а антиоксиданты препятствуют его окислительной модификации.

Эффект каждого из продуктов расщепления фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата на процессы внутриклеточной передачи сигналов может быть смоделирован с помощью фармакологических агентов. В качестве миметика инозитол-1,4,5-трифосфата используют Ca^{2+} -ионофоры, например A23187, или *иономицин*, обеспечивающий выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо. Миметиком диацилглицерола является *форболовый эфир*, получаемый из растений и способный связываться с РКС, вследствие чего фермент активируется аналогично тому, как это происходит при действии на РКС физиологического эффектора. С помощью Ca^{2+} -ионофоров и проболового эфира было доказано, что в большинстве случаев клеточные ответы на стимуляцию путей сигнальной трансдукции, включающих инозитолфосфолипиды, развиваются только при совместном действии инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. В частности, пролиферация культивируемых лимфоцитов может быть вызвана только при совместном действии на клетки Ca^{2+} ионофоров и проболового эфира.

Сигнализация с участием инозитолфосфолипидов и PI 3-киназы посредством создания стыковочных сайтов на плазматической мембране. Один из основных сигнальных путей, активирующих рост клеток, включает фермент фосфатидилинозитол-3-киназу, фосфорилирующую фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI(4)P) и фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PI(4,5)P₂), в положение 3 инозитольного кольца. В свою очередь этот фермент активируется как через рецепторы с протеинкиназой, главным образом тирозинкиназой активностью, так и через рецепторы, связанные с G-белками. Образующиеся в этом случае PI(3,4)P и PI(3,4,5)P₂ функционируют на плазматической мембране как стыковочные сайты или адаптеры для сигнальных белков. В частности, на мембране с помощью PI(3,4,5)P₂ фиксируются и образуют комплекс два цитоплазматических белка: ВТК (Bruton's тирозинкиназа) и фосфолипаза Cγ (PLCγ). В этом комплексе PLCγ фосфорилируется и активируется ВТК и в свою очередь катализирует расщепление PI(4,5)P₂ на молекулы вторых посредников – инозитол-трифосфат и диацилглицерол. В В-лимфоцитах данный путь сигнальной трансдукции контролирует продукцию клетками белков антител. Установлено, что точечная мутация, приводящая к утрате ВТК способности состыковываться с PI(4,5)P₂, резко снижает способность В-лимфоцитов продуцировать анти-тела.

PI(3,4)P и PI(3,4,5)P₂ функционируют на плазматической мембране до тех пор, пока они не дефосфорилируются специфической инозитолфосфолипидфосфатазой, удаляющей фосфатную группу из третьего положения.

Известна мутация, инактивирующая инозитолфосфолипидфосфатазу и тем самым как бы продляющая действие PI 3-киназы. В культуре клеток такая мутация ведет к клеточному росту и способствует выживанию клеток. Однако в организме она повышает вероятность развития рака и выявляется при многих онкологических заболеваниях.

10.4. Другие пути внутриклеточной передачи сигнала с помощью ионов кальция

Кальмодулин. Кроме рассмотренных ранее серин-треониновой протеинкиназы С и тропонина С, опосредующего кальцийзависимую передачу сигнала в мышечных волокнах, существует ряд других белков, транслирующих внутриклеточный кальциевый сигнал. Одним из таких белков является *кальмодулин*. Этот белок присутствует в большом количестве во всех эукариотических клетках. Его содержание в соматической клетке около 10^7 молекул и достигает 1 % от всего клеточного белка. Кальмодулин функционирует как многофункциональный внутриклеточный рецептор для Ca^{2+} , опосредующий множество Ca^{2+} -регулируемых процессов. Белок состоит из одной очень консервативной полипептидной цепочки с четырьмя высокоаффинными центрами связывания ионов кальция. При этом центры связывания кальция, расположенные на карбоксильном конце (С-конце) белка, в 10 раз эффективнее связывают Ca^{2+} , чем центры связывания на N-конце. В результате присоединения двух и более ионов кальция кальмодулин переходит в активное состояние Ca^{2+} -кальмодулин, в котором данный комплекс не обладает какой-либо специфичной ферментативной активностью, но зато способен связываться с неактивными белками, тем самым многократно усиливая их ферментативную активность. Связывание с белком-мишенью приводит к существенным конформационным изменениям и самого комплекса Ca^{2+} -кальмодулин. В некоторых случаях кальмодулин функционирует как постоянный кофактор ферментов или регуляторная субъединица ферментного комплекса. В качестве примера можно привести, рассмотренную выше NO-синтетазу.

Среди белков, активность которых зависит от образования комплекса с активированным Ca^{2+} -кальмодулином, много ферментов и ионных насосов, в том числе и кальциевый насос, трансмембранный белок, осуществляющий «откачку» ионов кальция из клетки. Связывание Ca^{2+} -кальмодулина с кальциевым насосом приводит к активации последнего, а следовательно, к удалению ионов кальция из цитозоля. Удаление ионов кальция происходит до уровня, характерного для неактивированного состояния клетки, поскольку при такой концентрации кальция комплекс Ca^{2+} -кальмодулин распадается,

кальмодулин отсоединяется от кальциевого насоса и последний переходит в неактивное состояние.

Большая часть клеточных эффектов Ca^{2+} опосредована и реализуется через этап фосфорилирования белков семейством Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ (СаМ-киназ). Эти киназы, подобно РКА и РКС, фосфорилируют остатки серина или треонина, и конечный эффект зависит от того, какие конкретно белки присутствуют и фосфорилируются в данной клетке. Первыми среди СаМ-киназ были открыты *киназа легких цепей миозина* и *киназа фосфоорилазы*. Оба фермента характеризуются узкой субстратной специфичностью. Первый фермент активируют процессы сокращения гладких мышечных волокон, а второй – расщепление гликогена. Следует отметить, что на уровне киназы фосфоорилазы происходит интеграция цАМФ и Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей. Киназа фосфоорилазы – это мультисубъединичный фермент, в его состав входят как каталитические субъединицы, катализирующие фосфорилирование фосфоорилазы гликогена, так и регуляторные. Часть из них является мишенью для фосфорилирования А-киназой, которая, как уже отмечалось, активируется цАМФ. Другой регуляторной субъединицей является кальмодулин. В мышечных клетках тот же подъем уровня цитоплазматического Ca^{2+} , который инициирует мышечное сокращение, приводит к образованию комплекса Ca^{2+} -кальмодулин и активации киназы фосфоорилазы гликогена, а в конечном итоге – к увеличению скорости расщепления гликогена и активации гликолиза – главного источника энергии в интенсивно работающей мышце. Какую же роль играет в этом случае цАМФ-зависимый сигнальный путь, запускаемый, как было рассмотрено выше, выбросом адреналина в ответ на стресс? Оказывается, фосфорилирование киназы фосфоорилазы гликогена А-киназой, которое предшествует мышечному сокращению, делает киназу фосфоорилазы гликогена более чувствительной к уровню цитозольного кальция. Другими словами, активация киназы фосфоорилазы гликогена и в конечном итоге увеличение скорости расщепления гликогена и интенсивности гликолиза происходит при более низких концентрациях цитозольного кальция. Физиологический смысл этого феномена заключается в том, что выброс адреналина облегчает получение энергии для интенсивно работающей мышцы.

Кроме ферментов, характеризующихся узкой субстратной специфичностью, известны СаМ-киназы, обладающие широкой субстратной специфичностью и способные фосфорилировать различные типы сигнальных белков, в том числе белки, влияющие на транскрипцию тех или иных генов. Примером одной из наиболее изученных мультифункциональных СаМ-киназ является *СаМ-киназа II*. Этот фермент присутствует во всех клетках, но

особенно много его выявлено в нервных клетках. В некоторых участках мозга количество СаМ-киназы II составляет почти 2 % от всего клеточного белка. Фермент представляет собой сложный белковый комплекс, состоящий из 12 субъединиц. Все субъединицы можно отнести к одному из четырех гомологичных типов: α , β , γ и σ . В разных типах клеток они экспрессируются в различной пропорции, вследствие чего в этих клетках различается и субъединичный состав фермента.

В отсутствие комплекса Ca^{2+} -кальмодулин СаМ-киназа II неактивна, поскольку ингибиторный домен фермента взаимодействует с каталитическим, тем самым препятствуя возможности субстратов попасть в активный центр. Связывание ингибиторного домена с Ca^{2+} -кальмодулином инициирует конформационные изменения в белковом комплексе, приводящие к высвобождению каталитического домена и активации протеинкиназной активности (рис. 37). Очень важной особенностью СаМ-киназы II является способность к автофосфорилированию, т. е. фермент после присоединения Ca^{2+} -кальмодулина наряду с различными сигнальными белками может фосфорилировать собственную молекулу. Благодаря наличию сайтов автофосфорилирования комплекс кальмодулин-СаМ-киназа II, обладающий максимальной киназной активностью, сохраняется даже после потери ионов кальция в результате возвращения внутриклеточного уровня этого иона к нормальному состоянию. Протеинкиназная активность, равная 50–80 % от максимального уровня, сохраняется и после отсоединения кальмодулина, а полное «выключение» СаМ-киназы II происходит в результате ее дефосфорилирования протеинфосфатазой.

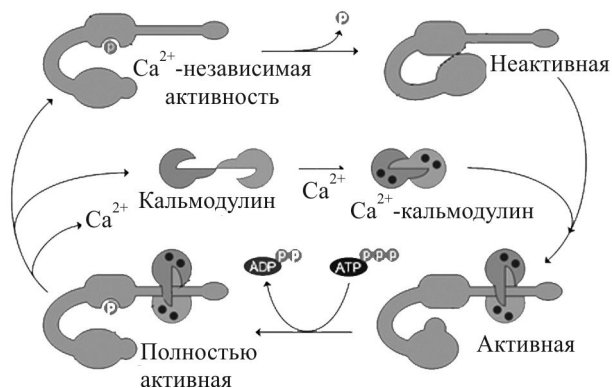


Рис. 37. Молекулярный механизм активации СаМ-киназы II

Благодаря способности к автофосфорилированию и сохранению активности даже после исчезновения вызвавшего это повышение сигнала СаМ-киназа II обладает по меньшей мере двумя важными свойствами. Во-первых, она способна функционировать как устройство молекулярной памяти, которое включается при воздействии с комплексом Са²⁺-кальмодулин и остается в активном состоянии даже после возвращения концентрации внутриклеточного кальция к нормальному уровню. Важная роль СаМ-киназы II в процессах формирования краткосрочной памяти и обучения доказана в опытах на мышах, имеющих точечные мутации, вследствие которых в молекуле фермента отсутствовал сайт автофосфорилирования, но во всех остальных отношениях фермент не отличался от фермента у дикого типа и сохранял нормальную протеинкиназную активность. Оказалось, что у мутантных мышей ухудшались способности к запоминанию мест расположения разных предметов в пространстве.

Вторым важным свойством СаМ-киназы II является то, что описанный выше механизм молекулярной памяти дает ферменту возможность функционировать как частотный декодер Са²⁺-осцилляций в клетке, а в более общем случае – как декодер нейрональной активности. Известно, что информация, передаваемая по нервным волокнам, кодируется частотными, а не амплитудными параметрами биоэлектрической активности. В некоторых типах нервных синапсов СаМ-киназа II способна трансформировать одинаковые по амплитуде, но различные по частоте изменения концентрации внутриклеточного кальция в градуальные, длительные изменения протеинкиназной активности и, как следствие, – в функциональном состоянии постсинаптической клетки (рис. 38). В экспериментах, моделирующих реальные

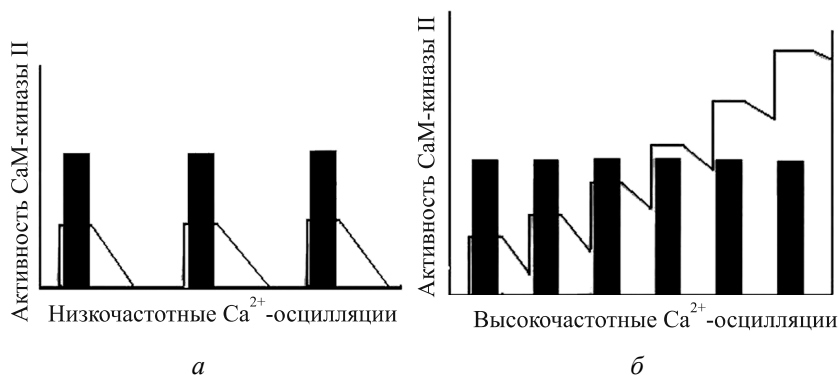


Рис. 38. Молекулярный механизм функционирования СаМ-киназы II как частотного декодера Са²⁺-осцилляций в клетке:
a – низкочастотные; *б* – высокочастотные

условия в клетке на СаМ-киназу II, иммобилизованную на твердой поверхности, воздействовали в присутствии кальмодулина и протеинфосфатазы ионами кальция, концентрация которых в среде изменялась с различной частотой. При низкой частоте колебаний концентрации кальция (рис. 38, а) активность фермента резко увеличивалась с увеличением концентрации кальция в результате автофосфорилирования части субъединиц фермента, а после уменьшения концентрации кальция медленно возвращалась к исходному уровню в результате дефосфорилирования СаМ-киназы II протеинфосфатазой.

Однако при увеличении частоты кальциевых осцилляций (рис. 38, б) фермент не успевал за временной промежутком между следующими друг за другом осцилляциями полностью инактивироваться, так как в некоторых субъединицах сайты автофосфорилирования оставались фосфорилированными к началу следующего увеличения концентрации кальция. Сайты, фосфорилированные при новом повышении уровня кальция, суммируются с оставшимися от предыдущего цикла, в результате чего наблюдается градуальный рост активности СаМ-киназы II. При достаточно продолжительном воздействии все большее число субъединиц фермента будет фосфорилироваться, а протеинкиназная активность увеличиваться. Очевидно, что максимальная активность будет при фосфорилировании всех (12) каталитических доменов СаМ-киназы II. Крутизна возрастания ответа будет зависеть от частоты кальциевых осцилляций. Чем выше частота, тем быстрее фермент достигнет максимальной активности. Кроме того, крутизна, амплитуда и продолжительность ответа определяются и субъединичной композицией конкретной СаМ-киназы II. Это значит, что при получении одного и того же сигнала ответ клеток, различающихся по субъединичной композиции СаМ-киназы II, будет различным. Отмечается, что в случае, когда все каталитические домены СаМ-киназы II будут фосфорилированы, высокая активность фермента сможет сохраняться еще некоторое время, несмотря на снижение частоты кальциевых осцилляций, и, таким образом, реализуется еще один механизм участия СаМ-киназы II в процессах молекулярной памяти.

Глава 11

РОЛЬ КЛЕТОК В ПОДДЕРЖАНИИ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА. ВОСПАЛЕНИЕ

11.1. Общая характеристика воспаления

Воспаление (лат. inflammatio) – это комплексный, местный или общий процесс, возникающий в ответ на повреждение или действие патогенного раздражителя. Воспаление проявляется в реакциях, направленных на удаление продуктов повреждения, а при возможности – устранение агентов (раздражителей) или к максимальному для данных условий восстановлению в зоне повреждения.

Клинически воспаление характеризуется:

- покраснением;
- отеком;
- местным повышением температуры;
- болью;
- нарушением функции.

В месте повреждения в результате расширения сосудов увеличивается кровоснабжение, приводящее к покраснению, местному повышению температуры. Затем происходит увеличение проницаемости стенки капилляров для белков плазмы и, как следствие, повышение онкотического давления межклеточной жидкости и переход в нее воды из плазмы. Развивающийся в результате отек сдавливает нервные окончания, вызывая боль и нарушение функции органа или ткани.

Воспаление может быть:

- острым – длительностью до двух недель;
- подострым – длительностью до шести недель;
- хроническим – длительностью более шести недель.

Кратковременное острое воспаление – это проявление защитной функции организма, имеющей выраженный адаптивный характер. При некоторых видах терапии, например пролотерапии повреждений суставов у про-

фессиональных спортсменов, с помощью специальных инъекций провоцируют кратковременное слабовыраженное воспаление, стимулирующее восстановление поврежденных тканей.

Хроническое воспаление, напротив, – это патология, при которой защитные силы организма вместо того чтобы защищать, медленно, но уверенно его убивают. Современная медицина пришла к выводу, что хроническое воспаление является основой для развития онкологических, сердечно-сосудистых и так называемых нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона).

Внешние факторы, вызывающие воспаление:

- *биологические*: вирусные, бактериальные, грибковые и другие инфекции, а также продукты, образующиеся при их разрушении, например липополисахариды;

- *физические*: ионизирующее и УФ-излучения, механические воздействия, волокна асбеста, нанотрубки;

- *химические*: полициклические, ароматические, галогенсодержащие соединения и другие ксенобиотики.

Эндогенные провоспалительные факторы:

- модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП);

- эндогенные антигены, образующиеся в результате оксидантного стресса;

- провоспалительные цитокины.

Воспаление – это проявление специфического и неспецифического клеточного иммунитета в ответ на воздействие данных факторов. Оно обусловлено главным образом наличием в крови лейкоцитов и их провоспалительной и фагоцитарной активностью.

11.2. Характеристика основных типов лейкоцитов

В зависимости от того, содержит ли цитоплазма зернистость (т. е. многочисленные лизосомы и секреторные гранулы) или она однородна, лейкоциты делятся на две группы: гранулоциты и агранулоциты. Способностью к фагоцитозу обладают гранулоциты, моноциты, тромбоциты, лимфоциты. Фагоцитарная активность более всего выражена у моноцитов.

Гранулоциты. Образуются в костном мозге и составляют 60 % всех лейкоцитов крови. Срок жизни – двое суток. Гранулоциты в свою очередь подразделяются на три вида: *эозинофилы* – гранулы окрашиваются в розовый цвет кислым красителем эозином; *базофилы* – гранулы окрашиваются в синий цвет основными красителями; *нейтрофилы* – гранулы воспринимают те и другие краски.

Нейтрофилы, или *нейтрофильные лейкоциты*, составляют 93–96 % от всех гранулоцитов. Поскольку с возрастом клеток изменяется и форма яд-

ра, их еще называют *полиморфноядерные лейкоциты*. Часть гранул нейтрофилов представлена лизосомами, содержащими кроме типичных лизосомальных ферментов кислых гидролаз, способных переваривать захваченные клетками объекты, лизоцим, повреждающий стенку бактерий, и катионные белки, нарушающие дыхание и рост микроорганизмов. Другие гранулы содержат энзимы, участвующие в процессах регенерации тканей.

Нейтрофилы являются самыми важными функциональными элементами неспецифической защитной системы крови. Они способны быстро мигрировать и накапливаться в инфицированном или поврежденном участке тела, где они фагоцитируют, а затем убивают и переваривают бактерии. Выбор направления движения обусловлен появлением в участке повреждения хемотаксических факторов как белковой природы (ИЛ-8, MCP-1 – хемотаксический протеин моноцитов 1), так и АФК (пероксид водорода, анион-радикал кислорода). Мощным хемотаксическим эффектом обладают лейкотриены, они секретируются активированными Т-лимфоцитами (хелперами) после воздействия на них бактериальных агентов.

Нейтрофилы были первым клеточным объектом при исследовании межклеточной коммуникации и внутриклеточных путей передачи сигналов, связанных с воспалением. Именно в результате этих исследований, проведенных в начале 1990-х гг., установлено, что перемещение нейтрофилов и накопление их в очаге воспаления в значительной степени обусловлено воздействием хемокина ИЛ-8. Путь передачи сигнала ИЛ-8 включает его взаимодействие с поверхностным рецептором, связанным с G-белком, диссоциацию тримерной молекулы G-белка на димер $\beta\gamma$ и активную α субъединицу, активирующую *фосфолипазу С β* , которая в свою очередь инициирует фосфатидилинозитольный путь и образование вторых посредников *инозитолтрифосфата* и *диацилглицерола*. Следующим этапом сигнальной трансдукции является повышение концентрации цитоплазматического кальция и активация протеинкиназы С. Все эти события и определяют клеточный ответ нейтрофилов при воздействии ИЛ-8. Под влиянием ИЛ-8 и других хемоаттрактантов клетки поляризуются и начинают передвигаться по направлению к источнику аттрактанта. В результате большое количество лейкоцитов переходит в пораженную ткань.

Помимо того что ИЛ-8 определяет хемотаксическое перемещение нейтрофилов, он участвует в развитии дыхательного взрыва. *Дыхательный, или метаболический, взрыв* возникает в нейтрофилах через 30–60 с после контакта с бактериальным агентом и обуславливает бактерицидный эффект нейтрофилов. В результате метаболического взрыва резко увеличивается потребление кислорода, который расходуется на образование анион-радикала кислорода, перекиси водорода и других активных форм кислорода, поступающих в фагосому и выделяющихся в межклеточное пространство.

Пероксид водорода (H_2O_2) используется в ключевом процессе, обуславливающем бактерицидный эффект нейтрофилов, – окислении анионов *галитов* (Г, СГ) до *гипогалитов*, главным образом гипохлорита ($HOCl$), токсичных для бактерий даже в концентрации 50 мкМ. Катализирует эту реакцию *миелопероксидаза* – фермент, присутствующий в нейтрофилах в большом количестве. Токсичность гипогалитов, по-видимому, обусловлена их высокой химической активностью, благодаря которой они способны разрушать различные макромолекулы и надмолекулярные комплексы. Благодаря высокой химической активности и деструктивным свойствам гипохлорит широко используют в быту в качестве основы отбеливателей. Бактерицидный эффект нейтрофилов связан также с разрушением бактерий и продуктов распада тканей лизосомальными ферментами. Образующийся в очагах воспаления гной состоит главным образом из нейтрофилов и их остатков. Нейтрофилы способны получать энергию путем анаэробного гликолиза, поэтому могут существовать в очагах воспаления, обедненных кислородом.

Базофильные гранулоциты составляют 0,5–1 % всех лейкоцитов крови. Эти клетки способны к фагоцитозу и миграции из кровяного русла в ткани. Базофилы могут выделять гистамин, который участвует в формировании аллергических реакций. Эти реакции развиваются при повторном воздействии нетоксических антигенов. При аллергии через несколько минут или (самое большее) часов наблюдается покраснение кожи, появляется сыпь, иногда развивается спазм легких (например, при воздействии пыльцы – сенная лихорадка), и в крайних случаях аллергия приводит к анафилактическому шоку.

Эозинофильные гранулоциты составляют 2–4 % всех лейкоцитов крови. Они обладают фагоцитарной и бактерицидной активностью и способны убивать микроорганизмы и более крупных паразитов, например личинок глистов (аскарид, трихинелл), благодаря целому ряду механизмов, прежде всего в продукции пероксида водорода. Эозинофилы уменьшают концентрацию биологически активных соединений, возникающих при аллергии, т. е. являются антагонистами базофилов.

Агранулоциты. В цитоплазме этих лейкоцитов при окрашивании зернистость не выявляется. Они представлены лимфоцитами и моноцитами.

Лимфоциты составляют 25–40 % всех лейкоцитов. Образуются во многих органах: лимфатических узлах, миндалинах, пейеровых бляшках, аппендиксе, селезенке, вилочковой железе (тимусе), но главным образом в костном мозге. Лимфоциты играют ключевую роль в иммунитете, способствуя усиленной выработке иммуноглобулинов.

Моноциты образуются в костном мозге (4–8 % всех лейкоцитов крови). Способность к фагоцитозу у них выражена больше, чем у других форменных элементов крови. Из крови моноциты выходят в окружающие ткани,

где происходит их рост и, как следствие, увеличивается содержание лизосом и митохондрий. Достигнув зрелости, превращаются в неподвижные клетки – *тканевые макрофаги*. Макрофаги способны функционировать в анаэробных условиях. Их цитотоксические свойства связаны с развитием дыхательного взрыва, в ходе которого образуются анион радикал кислорода H_2O_2 , гидроксильный радикал ($\cdot OH$) и другие формы активного кислорода и азота, в том числе монооксид азота (NO). Образование NO макрофагами катализируется индуцибельной NO-синтазой, ее экспрессия стимулируется бактериальными липополисахаридами, а также провоспалительными цитокинами. NO-синтазная активность в макрофагах может быть в 100 раз выше активности эндотелиального фермента. Кроме того, макрофаги формируют ограничивающий вал вокруг тех инородных тел, которые не могут быть удалены с помощью фагоцитоза.

11.3. Биосигнализация воспаления (сигнальная роль АФК и пероксидов)

Ключевую роль в развитии воспаления играют так называемые провоспалительные цитокины (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) и фактор некроза опухолей альфа (TNF- α). Эти сигнальные молекулы инициируют процессы воспаления, активируя пути сигнальной трансдукции, регулирующие экспрессию генов, отвечающих за синтез в различных клетках-мишенях, в первую очередь эндотелиальных, хемокинов, например хемотаксического белка моноцитов 1 (MCP-1) и ИЛ-8 и молекул (рецепторов) межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule, ICAM-1; vascular cell adhesion molecule, VCAM-1). Многократное увеличение секреции хемокинов клетками-мишенями привлекает все возрастающее количество лейкоцитов, благодаря взаимодействию с рецепторами адгезии они задерживаются и накапливаются в области воспаления. Паттерн цитокинов, экспрессия и секреция которых в области воспаления возрастает (оверэкспрессия), зависит от природы агента, провоцирующего воспаление. Например, при действии на культивируемые эндотелиальные клетки липополисахарида из *Escherichia coli* и окисленных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) наблюдается существенное возрастание экспрессии ИЛ-8, MCP-1, ICAM-1 и VCAM-1 (в 3–20 раз по отношению к контрольным клеткам). В то же время ЛПС значительно увеличивал экспрессию ключевых провоспалительных цитокинов TNF- α и ИЛ-6, тогда как эффект окисленных ЛПНП на экспрессию данных цитокинов был значительно менее выраженным. Чрезвычайно важную роль в развитии воспаления играют простагландины, синтезируемые из арахидоновой кислоты с помощью индуцибельного фермента циклооксигеназы 2

(СОХ-2). Его экспрессия контролируется ИЛ-1 и TNF- α через NF- κ B-зависимый путь сигнальной трансдукции.

Глубина воспалительного процесса обуславливается складывающимся балансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. К последним относят ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-13, ИЛ-16, IFN- α , TGF- β , ИЛ-1ra, G-CSF, растворимые рецепторы для TNF- α и ИЛ-6.

Понятие о биорадикалах и их классификация. Биорадикалы – это возникающие в биологических системах молекулы и ионы, имеющие на внешней электронной оболочке один или несколько неспаренных электронов. Поскольку при химическом взаимодействии с другими молекулами или атомами биорадикалы стремятся получить недостающий или отдать лишний электрон, они характеризуются высокой химической активностью и способны инициировать быстрые, цепные неуправляемые реакции окисления различных субстратов (свободнорадикальное окисление), приводящие к модификации органических молекул и деградациии надмолекулярных клеточных структур.

В результате химических реакций, протекающих с участием биорадикалов, в организме образуются весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит, гидроперекиси липидов и ряд подобных им по химической активности соединений. Такие активные молекулы наряду с радикалами получили в англоязычной литературе название «reactive species», что в русской литературе чаще всего переводится как «активные формы». Все биорадикалы и активные формы молекул разделяют на три основные группы: активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и хлора (АФХ). Кроме того, в отдельную группу иногда выделяют и активные формы липидов – различные гидро- и эндолипопероксиды.

Представления о важной роли биорадикалов в клетках и живых организмах в целом стали формироваться в середине XX в. В это время был открыт ряд ферментов и низкомолекулярных соединений – биоантиоксидантов, защищающих организм от повреждающего действия биорадикалов. Первоначально именно прямое повреждающее действие биорадикалов стало объектом многочисленных биомедицинских исследований. Позднее было показано, что липопероксиды и их метаболиты наряду с монооксидом азота, пероксидом водорода и анион-радикалом кислорода или супероксидом играют важную роль в процессах биосигнализации, в том числе сигнальной трансдукции при воспалении.

Механизмы воздействия биорадикалов на клетки. Исследование роли оксидантов в процессах меж- и внутриклеточной сигнализации (редокс-сигнализация) стало одним из ведущих направлений исследований по биосигнализации, о чем свидетельствует множество научных публикаций, посвященных данной проблеме. Несколько ведущих международных науч-

ных журналов, в том числе «Антиоксиданты и редокс-сигнализация», полностью посвящены этому вопросу. Важность исследования редокс-сигнализации обусловлена рядом причин. Во-первых, выяснилось, что оксидантный, или окислительный, стресс, который возникает в клетках и тканях при воздействии разнообразных внешних и внутренних факторов, таких как УФ-излучение, волокна асбеста и ионы тяжелых металлов, способен инициировать множество путей внутриклеточной передачи сигналов, ведущих к возникновению онкологических, сердечно-сосудистых и других заболеваний. Во-вторых, активные формы кислорода и азота, продуцирующиеся при воспалении клетками иммунной системы, являются обязательными медиаторами воспалительного процесса, инициируя соответствующие сигнальные каскады как в клетках иммунной системы, так и клетках-мишенях. Кроме того, оксиданты могут влиять (модифицировать) белки и другие макромолекулы, участвующие в процессах внутри- и межклеточной передачи сигналов. Например, АФК способны непосредственно влиять на активность редокс-чувствительных сигнальных белков (РКС) и ядерных факторов транскрипции (протеин-активатор 1 (AP-1) и рассмотренный выше NF-κB), играющих ключевую роль во внутриклеточной регуляции воспалительных ответов NF-κB.

Образование и сигнальные эффекты анион-радикала кислорода и пероксида водорода в клетках и тканях. Основным физиологическим процессом, ведущим к образованию анион-радикала кислорода и пероксида водорода, является так называемый дыхательный взрыв в различных типах гранулярных и агранулярных лейкоцитов, в первую очередь нейтрофилах и макрофагах. Дыхательный взрыв характеризуется возрастанием потребления клетками кислорода, усилением в них катаболизма глюкозы и образования НАДФН через гексозомонофосфатный шунт. При этом практически весь потребляемый кислород расходуется на образование анион-радикала кислорода НАДФН-оксидазным комплексом, локализованным на внешней стороне плазматической мембраны фагоцитирующих клеток. Из анион-радикала кислорода в результате дисмутации образуется пероксид водорода:



Дисмутация при нормальных физиологических условиях протекает с достаточно большой скоростью неферментативно, однако фермент супероксиддисмутазы ускоряет эту реакцию на несколько порядков.

Существуют и нефизиологические пути образования в клетках анион-радикала кислорода и пероксида водорода. Важнейшим из них является утечка электронов в дыхательной цепи митохондрий и коротких электрон-транспортных цепях эндоплазматического ретикулаума. В нормально работающих митохондриях цитохромы и другие белки, входящие в состав ды-

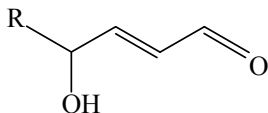
хательных комплексов, с диоксигеном не взаимодействуют, однако его одноэлектронное восстановление и образование анион-радикала кислорода возможно на уровне убихинона. Полагают, что даже в нормальных физиологических условиях примерно от 1 до 3 % поступающего в митохондрии кислорода восстанавливается только до анион-радикала кислорода. Значительный рост нефизиологической продукции анион-радикала кислорода и пероксида водорода наблюдается при структурно-функциональных нарушениях в митохондриях. При этом утечка электронов происходит не только с молекулы убихинола, но и на уровне цитохромов дыхательной цепи. Этим обстоятельством объясняется необходимость постоянного обновления митохондрий в клетке путем аутофагии.

Анион-радикал кислорода или супероксид в системе межклеточной сигнализации выполняет роль хемоаттрактанта, способствующего накоплению фагоцитов в зоне воспаления. Он также подавляет сигнальную функцию другой радикальной молекулы – монооксида азота. Следствием этого является понижение эффективности NO-зависимой сигнализации и появление токсичного для клетки агента пероксинитрита. Пероксинитрит может вызвать окислительную модификацию различных белков, в том числе белков, участвующих во внутриклеточной передаче сигнала. Кроме того, пероксинитрит может функционировать в качестве кофактора при катализе циклооксигеназой синтеза простагландинов. Десигнализация в системе супероксид-зависимой передачи сигнала осуществляется ферментом СОД, который эффективно удаляет анион-радикал кислорода из клетки. СОД выполняет также защитную функцию, удаляя избыток супероксида и предотвращая нарушения в NO-зависимой передаче сигналов, обусловленные взаимодействием монооксида азота с анион-радикалом кислорода.

Пероксид водорода активирует в некоторых типах клеток (эпителиальных) продукцию адгезионных молекул или рецепторов адгезии, которые экспрессируются на клеточной поверхности. Установлено, что влияние пероксида водорода на NF-κB-зависимый путь внутриклеточной передачи сигнала зависит от типа клеток. В некоторых типах раковых клеток пероксид водорода активирует, тогда как в других типах клеток ингибирует NF-κB-зависимый путь передачи сигнала. Десигнализация пероксида водорода осуществляется с помощью фермента каталаза, разлагающего пероксид водорода на молекулярный кислород и воду, а также различных глутатион-зависимых пероксидаз. Эти ферменты вместе с супероксиддисмутазой относят к ферментной антиоксидантной защитной системе, поскольку они выполняют важную роль, предохраняя клетки и ткани от перепроизводства активных форм кислорода.

Сигнальные эффекты продуктов перекисного окисления липидов. Пероксиды липидов и продукты их расщепления образуются в результате перекисного (свободнорадикального) окисления полиненасыщенных жирных

кислот, входящих в состав фосфолипидов клеточных мембран. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) может инициироваться в различных тканях при повреждающих воздействиях внешних и внутренних факторов, например биотрансформации ксенобиотиков в печени или воздействии УФ-излучения на кожу. Наиболее изучены сигнальные эффекты альдегида-4-гидрокси-2,3-ноненаль (HNE), образующегося при разложении пероксидов полиненасыщенных жирных кислот, главным образом арахидоновой кислоты:



HNE, по-видимому, не имеет конкретного, высокоспецифичного клеточного рецептора, а способен сравнительно низкоаффинно взаимодействовать с различными поверхностными и внутриклеточными рецепторами. Одним из важных результатов такого взаимодействия является увеличение экспрессии фиброгенного цитокина – трансформирующего фактора роста β (TGF β). Установлено, что ряд заболеваний, связанных с хроническим воспалением, например фиброз печени, обусловлены повышенной экспрессией TGF β . Путь передачи сигнала от HNE к гену трансформирующего фактора роста β включает перемещение из цитоплазмы в ядро и активацию протеина-активатора 1 (AP-1).

Сквален как биосенсор УФ-излучения. Кожа человека в отличие от всех остальных приматов имеет ряд уникальных особенностей: отсутствие развитого волосяного покрова, сильное развитие слоя подкожного жира, наличие на поверхности кожи многочисленных сальных желез, продуцирующих кожное сало (sebum). Кожное сало, или липиды поверхности кожи (ЛПК), у животных предназначается для смазывания шерсти, а у человека просто распределяется по поверхности тела, превратившись в естественный жирный крем, который постоянно находится на коже. Одним из основных компонентов ЛПК у человека (около 15 %) является сквален (спинацен; 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен) – ациклический полиненасыщенный (содержит шесть двойных связей) жидкий углеводород (тритерпен) состава $C_{30}H_{50}$. Название «сквален» произошло от латинского *squalus* – акула, печень которой богата этим соединением. В частности, в печени черной колючей акулы (*Etmopterus spinax*), живущей обычно на глубинах 300–1000 м, содержится 75 % жира (у млекопитающих обычно около 5 %), половину которого составляет сквален. Сквален встречается в значительном количестве в оливковом, пальмовом, амарантовом маслах, а также в масле из проростков пшеницы и риса. У животных сквален является промежуточным продуктом в синтезе холестерина. У человека в клетках

сальных желез, по-видимому, происходит блокирование синтеза холестерина и накопление значительного количества сквалена.

Поскольку сквален легко окисляется, предполагают, что на поверхности кожи, постоянно подверженной воздействию различных факторов внешней среды, сквален функционирует как биосенсор, чувствительный к повреждающему воздействию УФ-света на кожу. Продукт, образующийся при воздействии солнечного УФ-излучения на сквален – окисленный сквален, является сигнальной молекулой, опосредующей развитие воспалительной реакции кожи. Окисленный сквален, как и HNE, по-видимому, не имеет конкретного, высокоспецифичного клеточного рецептора, а способен сравнительно низкоаффинно взаимодействовать с различными поверхностными и внутриклеточными рецепторами. В результате такого взаимодействия увеличивается экспрессия провоспалительных цитокинов – ИЛ-8, ИЛ-1-β, ИЛ-6 – и фактора некроза опухолей альфа (TNF-α). Окисленный сквален активирует также экспрессию цитохрома P-450 – фермента, катализирующего реакции I этапа детоксикации ксенобиотиков.

Глава 12

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ КРУПНЫХ АРТЕРИЙ. АТЕРОСКЛЕРОЗ

Атеросклероз – это тяжелая сосудистая патология, ведущая к ишемической болезни сердца, инфарктам и инсультам. Эти заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности в экономически развитых странах (примерно 50 %). В основе атеросклероза лежит атерогенез – сложный и длительный процесс дегенеративных изменений стенок крупных артерий, сопровождающийся образованием в просвете сосудов атеросклеротических фиброзных бляшек (атером). Фиброзная бляшка формируется непосредственно под эндотелием и состоит из так называемой покрышки, включающей гладкомышечные клетки (ГМК) и фиброзную ткань, и желтого липидного ядра, которое на поздних стадиях атерогенеза может обызвествляться. Кроме эндотелиальных и ГМК в атерогенезе важную роль играют моноциты и образующиеся из них макрофаги, тромбоциты и лимфоциты, а также надмолекулярные структуры – липопротеиды. Последовательность и взаимосвязь событий в процессе атерогенеза определяются продуцируемыми этими клетками сигнальными, регуляторными и другими активными молекулами, включая хемоаттрактанты, факторы роста, фактор некроза опухолей (TNF- α), интерферон- γ (IFN- γ) и другие цитокины, ферменты и биорадикалы.

12.1. Липопротеиды, их классификация и механизмы модификации

Все основные липиды в плазме крови человека находятся в комплексе с белками, образуя сложные соединения – липопротеиды (ЛП). ЛП выполняют функцию транспорта и запасания липидов, являются необходимой со-

ставляющей различных структур клетки; содержание ЛП в крови служит важным диагностическим тестом при ряде заболеваний (в первую очередь при атеросклерозе). ЛП делят на свободные (в плазме крови) и структурные (в мембранах клеток, миелиновой оболочке нервов и т. д.). По гидратированной плотности ЛП плазмы крови делят на четыре класса: 1) хиломикроны (ХМ); 2) липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП); 3) липопротеиды низкой плотности (ЛПНП); 4) липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) (рис. 39).

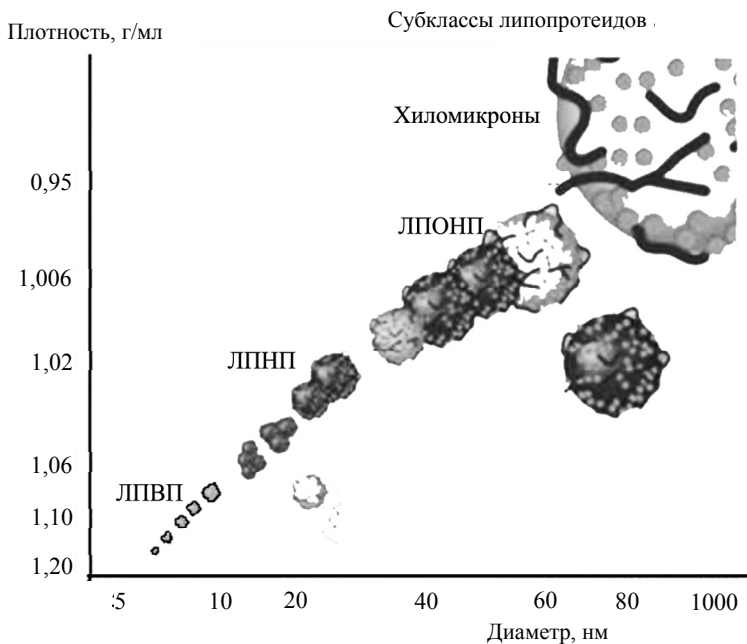


Рис. 39. Физические характеристики липопротеидов

Хиломикроны – это самые большие из липопротеидов, их размер варьирует от 75 нм до 1,2 микрона (мкм) в диаметре (рис. 40). Они состоят главным образом из липидов (99 %), в основном триглицеридов, и содержат только 1 % белка – аполипопротеида (апоВ-48). Белок частично покрывает поверхность хиломикрона, обеспечивая таким образом стабильность частицы в процессе циркуляции. Содержание холестерина (общего) у хиломикронов составляет примерно от 1 до 3 %, фосфолипидов – примерно 4–8 %. Благодаря высокому содержанию жира хиломикроны имеют чрезвычайно низкую плотность. С давних времен было замечено, что через несколько

часов после употребления жирной пищи кровь человека напоминает молоко. В 1920 г. при изучении плазмы крови под микроскопом были обнаружены легкие и богатые жиром частицы, которые назвали хиломикронами («хило» – млечный сок, «микро» – маленький). Эти липопротеиды образуются в клетках эпителия слизистой оболочки тонкой кишки после всасывания продуктов, обогащенных жиром. Хиломикроны обеспечивают перенос (транспорт) пищевых липидов от кишечника до печени и в другие ткани, а также служат для отложения (запаса) пищевых липидов в подкожно-жировой клетчатке. Период полужизни хиломикронов меньше одного часа, поэтому в крови здорового человека через 12 часов после последнего приятия пищи хиломикронов практически не находят.

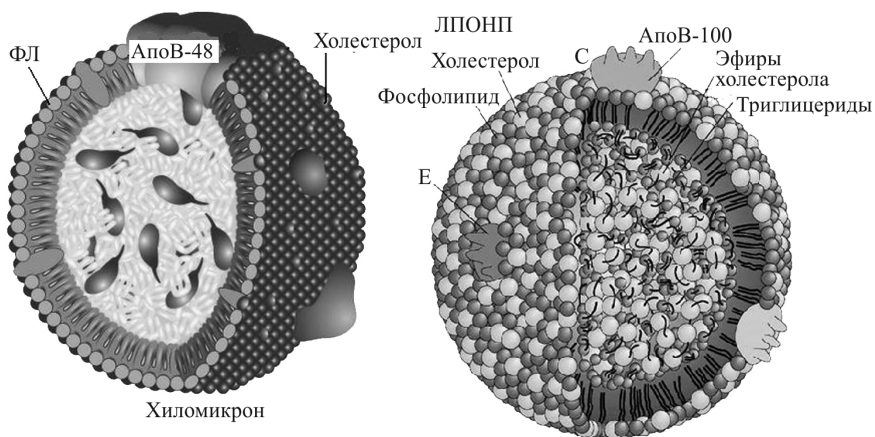


Рис. 40. Молекулярная организация хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности

ЛПОНП образуются в печени из липидов и аполипопротеинов и содержат примерно 9 % белка и 91 % липидов (см. рис. 40). В крови они подвергаются частичному гидролизу и превращаются в липопротеины низкой плотности. Размер частиц ЛПОНП достигает 30–80 нм. Эти липопротеиды, как и хиломикроны, относят к группе, обогащенной триглицеридами (так как в составе данной липопротеидной частицы из всех липидов преобладают триглицериды – от 50 до 70 %). Содержание холестерина (общего) – 15–17 %; фосфолипидов – 14–20 %. Основной аполипопротеин, стабилизирующий структуру частицы, – это одна из изоформ *аполипопротеина В* (apoB-100). ApoB-100 отличается от apoB-48 наличием дополнительного домена – центра связывания с рецепторами на поверхности клеток-мишеней, так называемыми ЛПНП-рецепторами. ЛПОНП также, как и хиломик-

роны, осуществляют транспортную функцию жиров к месту утилизации и синтезируются частично в слизистой оболочке кишечной стенки, но главным образом в печени. Замечено, что при увеличении в плазме крови свободных ЖК печень начинает усиленно синтезировать ЛПОНП. Период полужизни ЛПОНП – от 2 до 4 часов, их расщепление происходит при действии липолитических ферментов.

ЛПНП – липопротеидные частицы, содержащие примерно 21 % белка и 79 % липидов, причем в последних превалирует холестерин (рис. 41). Состав липидов в данной частице приблизительно следующий: триглицеридов – 8–33 %; фосфолипидов – 10–30 %, общего холестерина – 25–48 % (причем эстерифицированный холестерин в ядре этого липопротеида уже выделен в особую зону, а не растворен в нейтральных жирах, как в ЛПОНП). Частица ЛПНП содержит в качестве белковой компоненты одну молекулу *аполипопротеина В-100* (апоВ-100), который стабилизирует структуру частицы и является лигандом для ЛПНП рецептора (или апоВ-100-Р). Размеры ЛПНП варьируют от 18 до 26 нм. Одна липопротеидная частица низкой плотности содержит приблизительно 1300 молекул ПНЖК и имеет молекулярную массу примерно $5 \cdot 10^6$. Образуются ЛПНП в печени, иногда – в клетках кишечника. Также ЛПНП образуются в результате метаболизма их предшественников, т. е. ЛПОНП.

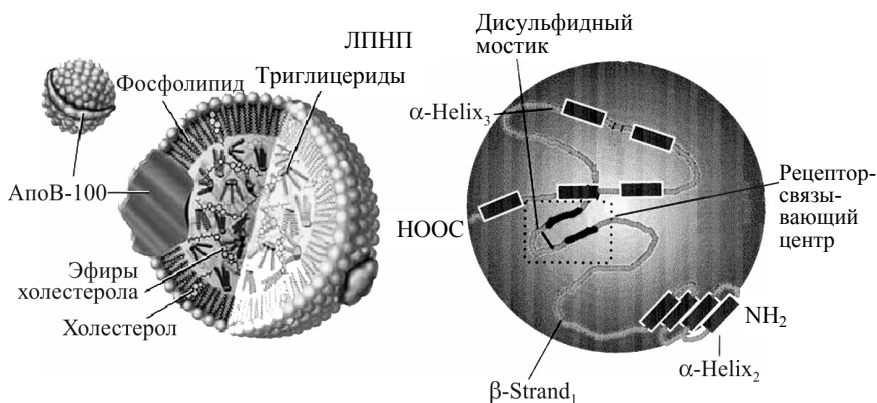


Рис. 41. Молекулярная организация липопротеинов низкой плотности

Известно, что практически все клетки организма могут синтезировать холестерин сами, однако не все из них способны обеспечить себя им полностью. Недостаток холестерина в таких клетках возмещается в результате доставки его с помощью ЛПНП (в меньшей степени ЛПОНП) из печени. При необходимости невостребованный холестерин вместе с этими липо-

протеидами вновь возвращается в печень, где по мере надобности он идет на образование желчных кислот или другие нужды, т. е. в организме холестерин расходуется экономно. Период полужизни ЛПНП – от 2 до 4 суток, расщепление и утилизация происходят в надпочечниках, печени, селезенке, половых железах, а также в других органах и тканях.

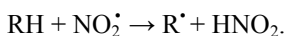
ЛПВП – класс липопротеидов, содержащий 52 % белков и 48 % липидов, из которых наибольшее количество относится к группе фосфолипидов (до 40 %). На долю ТГ приходится примерно 5 %, холестерина – от 20 до 35 %. Образование ЛПВП происходит главным образом в печени (хотя есть данные, что в этом участвуют и клетки кишечника) из аполипопротеинов А1 и А2, связанных с фосфолипидами. В плазме крови синтез ЛПВП может происходить за счет расщепления предшествующих классов липопротеидов, богатых триглицеридами, т. е. из ХМ и ЛПОНП. Период полужизни этого липопротеида составляет около 5 суток; его расщепление происходит, видимо, в печени и в меньшей степени в других органах и тканях. ЛПВП обладают антиатерогенным эффектом, так как их основная роль заключается в поглощении избыточного холестерина с наружной поверхности ЛПНП и ЛПОНП. Кроме того, ЛПВП осуществляют обратный транспорт избыточного холестерина из различных органов и тканей в печень, где он по мере надобности подвергается окислению.

Таким образом, больше всего холестерина в плазме крови находится в составе ЛПНП – примерно 70 %; около 10 % – в составе липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и около 20 % – в составе ЛПВП. Замечено, что сходное распределение отмечено у тех животных, которые склонны к развитию атеросклероза (обезьяны, свиньи, кролики, морские свинки, голуби, куры и т. д.). Напротив, у животных, развитие атеросклероза для которых нехарактерно (собаки, кошки, суслики, норки, песцы, лошади, дельфины и др.), большая часть холестерина плазмы находится в составе ЛПВП, обладающих антиатерогенным действием. Именно поэтому в клиническую практику введено правило расчета коэффициента, отражающего отношение атерогенных липопротеидов ЛПНП и ЛПОНП к антиатерогенным ЛПВП. Это отношение является идеальным у новорожденных (не более единицы); у лиц 20–30 лет его величина колеблется от 2,0 до 2,9; у здоровых людей старше 30 лет она находится в пределах 3–3,5 (причем у женщин, как правило, ниже, чем у мужчин); у лиц с ишемической болезнью сердца – от 4.

В 80–90-е гг. XX в. появились данные, свидетельствующие, что среди неоднородной самой по себе группы ЛПНП можно выделить наиболее атерогенные подфракции. Атерогенность этих ЛПНП обусловлена их химической модификацией, которая включает окисление липидного и белкового компонентов, липолиз, протеолиз и агрегацию. Образование модифицированных (окисленных) ЛПНП в организме может быть следствием побочно-

го действия оксидантов (например, пероксинитрита), генерируемых фагоцитирующими клетками в ответ на проникновение бактериальной или другой инфекции, результатом воздействия ферментов липоксигеназ и (или) следовых количеств ионов металлов с переменной валентностью, в первую очередь меди. В последние годы появились убедительные доказательства, что ключевую роль в окислительной модификации ЛПНП играет миелопероксидаза.

Миелопероксидаза (МПО, донор: пероксид водорода, оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7, молекулярная масса ~ 150 кДа) – основной, сильно гликозилированный белок, образующий вместе с тиреоидпероксидазой, лактопероксидазой, эозинпероксидазой, простагландин-Н-синтазой и пероксидасином суперсемейство пероксидаз. Наибольшее количество МПО содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов (5 % от сухого веса клеток) и моноцитах (1–2 %). При фагоцитозе, сопровождающемся обязательной активацией фагоцитирующих клеток и развитием дыхательного взрыва, МПО секретируется вместе с АФК как во внеклеточную среду, так и в фагосому. В обоих компартментах МПО усиливает окислительный потенциал АФК, катализируя несколько молекулярных процессов; наиболее важный из окисления галидов (Cl⁻) пероксидом водорода до гипогалитов. Недавно были получены экспериментальные данные, свидетельствующие, что МПО может также катализировать окисление пероксидом водорода нитрит аниона (NO₂⁻). Реакция протекает при физиологических концентрациях нитрита и приводит к образованию активной формы азота, так называемых NO₂⁻-подобных радикалов. В свою очередь NO₂⁻-подобные радикалы вызывают окислительную модификацию ЛПНП:



Окисленные ЛПНП обладают побочными эффектами, ведущими к развитию в стенках магистральных сосудов хронического воспаления – атерогенеза, конечным результатом которого является атеросклероз. В частности, окисленные ЛПНП:

- активируют экспрессию медиаторов воспаления эндотелиальными клетками;
- обладают свойствами хемоаттрактантов в отношении моноцитов, тканевых макрофагов и Т-клеток;
- активируют экспрессию молекул адгезии на эндотелии и моноцитах;
- способствуют образованию пенистых клеток – макрофагов;
- усиливают пролиферацию (митогенное действие) гладкомышечных клеток сосудов и тканевых макрофагов;
- активируют экспрессию тромбогенных молекул и агрегацию кровяных пластинок;

- нарушают функции эндотелия, воздействуя на сигнализацию посредством NO (монооксида азота);
- активируют сигнальные пути, запуская процесс апоптоза гладкомышечных и эндотелиальных клеток.

Атерогенез начинается с проникновения в интиму сосудистой стенки ЛПНП. Нарушению целостности эндотелия и прохождению через него липопротеидов способствует ряд внутренних и внешних факторов. По-видимому, наиболее важен гидродинамический эффект потока крови. Даже при нормальном артериальном давлении механическое воздействие на эндотелий в крупных сосудах и особенно в области разветвления, где возникают турбулентные потоки, весьма значительно. И именно здесь наиболее часто развивается атеросклеротическое повреждение. Повышенное АД – один из факторов риска атеросклероза. Другими факторами, влияющими на состояние эндотелия, являются курение, вирусные инфекции (герпес), хронические воспалительные процессы, окислительный стресс, обусловленный воздействием на организм различных физических и химических факторов внешней среды.

Накопление ЛПНП в матриксе сосудистой стенки – необходимый этап атерогенеза, но он далеко не всегда приводит к возникновению атеросклеротической бляшки; часто процесс ограничивается образованием так называемых липидных пятен. Атерогенными ЛПНП становятся в результате их химической модификации.

12.2. Межклеточная передача сигнала при атерогенезе. Сигнальные эффекты модифицированных липопротеидов низкой плотности

Модифицированные ЛПНП (МЛПНП) инициируют два ключевых этапа атерогенеза: воспаление и образование пенистых клеток, при этом характер атерогенного эффекта МЛПНП зависит от степени их окислительной модификации. Так называемые минимально окисленные ЛПНП (МОЛПНП), накапливаясь в интиме сосудистой стенки, способствуют возникновению очага воспаления, являясь сигналом к усиленному проникновению через эндотелий моноцитов и лимфоцитов. Провоспалительный эффект МОЛПНП обусловлен их способностью стимулировать продукцию эндотелиальными клетками хемотаксического протеина моноцитов (MCP-1), ИЛ-8, других хемоаттрактантов, а также индуцировать экспрессию рецепторных гликопротеинов адгезии на поверхности эндотелия, расположенной непосредственно над формирующимся очагом воспаления. Появление таких рецепторов, в частности селектинов Р и Е, факторов межклеточной адгезии VCAM1, ICAM1, PCAM1,

приводит к усиленной адгезии на эндотелии иммунокомпетентных клеток. Большую часть – 90 % от всех прикрепившихся клеток – составляют моноциты, остальные 10 % приходятся на Т-лимфоциты.

Какая же структурная модификация делает ЛПНП малоокисленными? Установлено, что малоокисленные липопропротеиды получают при окислении ЛПНП МПО в присутствии нитритов, при этом для инициирования процессов сигнальной трансдукции, ведущих к развитию воспалительного ответа эндотелиальных клеток, достаточно окисления примерно 5 % ПНЖК, имеющихся в ЛПНП до ацилпероксидов. В то же время существует мнение, что первичного окисления ЛПНП с образованием эндо- и гидропероксидов полиеновых ацилов недостаточно для атерогенной модификации ЛПНП и необходима более глубокая степень окисления. В частности показано, что свойствами малоокисленных обладают ЛПНП, в фосфолипидах которых остаток арахидоновой кислоты окислен до 5-оксисалерьяновой или глутаровой кислот.

ЛПНП, модифицированные в еще большей степени, или так называемые сильно окисленные (СОЛПНП), инициируют процесс образования пенных клеток. Именно СОЛПНП, но не МОЛПНП способны связываться со специальными скэвенджер-рецепторами макрофагов (прежнее название – рецепторы ацетил-ЛПНП). В наше время выявлено достаточно большое количество таких рецепторов, однако только рецепторы SR-A-I/II и CD36, связываясь с СОЛПНП, дают сигнал к включению механизмов фагоцитоза и быстрому поглощению СОЛПНП макрофагами. По существу, это защитная реакция организма. Однако СОЛПНП, захваченные по неясным до настоящего времени причинам, не могут быть утилизированы лизосомальными ферментными системами, что ведет к превращению фагоцитов в пенные клетки, т. е. макрофаги, богатые нерасщепленными фрагментами липопропротеидов, в первую очередь эстерифицированным холестерином, т. е. связанным сложноэфирной связью с жирными кислотами. Пенные клетки очень быстро гибнут, главным образом путем некроза. Их содержимое, в том числе МПО, различные протеолитические и липолитические ферменты, выделяются в матрикс, что в свою очередь приводит к дальнейшему окислению, модификации и агрегации ЛПНП, все более интенсивному образованию и гибели пенных клеток. В результате из продуктов лизиса пенных клеток, главным образом так называемого липидного мусора, в области воспаления начинает формироваться липидное ядро атеросклеротической бляшки. Кроме окисленных липидов здесь содержатся модифицированные апобелки, остатки тирозина в которых подверглись нитрованию. Параллельно с липидным ядром вследствие миграции гладкомышечных клеток из меди к эндотелию (их движение обусловлено образованием сигнальных молекул аттрактантов в зоне атерогенеза) и образования фиброзной ткани идет формирование покрышки атеросклеротической бляшки.

Процесс атерогенеза может осложняться надломом внутренней поверхности сосудистой стенки на границе атеросклеротической бляшки с интактным эндотелием, последующим прилипанием тромбоцитов к сосудистой стенке в области разрыва и образованием пристеночного тромба, создающего реальную угрозу последующего инфаркта или инсульта.

Вопрос о том, где протекают процессы, приводящие к окислительной модификации ЛПНП и образованию МОЛПНП, является предметом научной дискуссии. Некоторые исследователи считают, что перекисное окисление липидов липопротеидов и образование МОЛПНП происходит только в сосудистой стенке. Их оппоненты полагают, что окисление ЛПНП может происходить при различных воспалительных процессах, протекающих в областях, пространственно удаленных от места формирования атеросклеротической бляшки, и в доказательство приводят экспериментальные данные о наличии в крови окисленных ЛПНП. По-видимому, оба механизма имеют место. При этом окисленные ЛПНП, попадая в интиму, могут играть роль «затравки», инициирующей развитие атеросклероза.

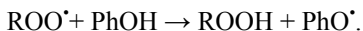
12.3. Механизмы противовоспалительного действия антиоксидантов

Поскольку ключевым этапом атерогенеза являются реакции свободно-радикальной модификации ЛПНП, в качестве наиболее перспективных профилактических средств атеросклероза рассматриваются природные, нетоксичные антиоксиданты.

Известные в настоящее время антиоксиданты могут быть классифицированы по механизму действия следующим образом:

- классические антиоксиданты (обрывающие цепь агенты);
- ловушки инициаторов свободнорадикальных реакций;
- хелаторы (железосвязывающие агенты);
- кофакторы и низкомолекулярные компоненты защитных антиоксидантных ферментов и их предшественники.

Большинство фенолов, к которым относится витамин Е и природные флавоноиды, являются цепь-обрывающими агентами. Они взаимодействуют с алкилдиоксилами (пероксидными радикалами):



Образующиеся при взаимодействии фенольных антиоксидантов с алкилдиоксилами феноксильные радикалы (PhO^{\bullet}) являются резонансно стабильными структурами, неспособными продолжать цепь свободноради-

кальных реакций, однако они могут взаимодействовать с еще одним пероксидным радикалом:



Водорастворимые антирадикальные агенты, например аскорбиновая кислота, способны восстанавливать феноксильные радикалы в исходные фенолы.

Наиболее эффективным природным антиоксидантом является, по-видимому, витамин Е (α -токоферол). Ключевая роль α -токоферола в системе антиоксидантной защиты организма подтверждается многочисленными экспериментами, свидетельствующими о высокой эффективности его применения при патологических состояниях, сопровождающихся активацией свободнорадикальных реакций, и активации процессов перекисного окисления липидов в тканях при недостатке витамина Е в пище.

Витамин С (аскорбиновая кислота) – один из наиболее эффективных водорастворимых антиоксидантов. Например, окисление фосфолипидов, триацилглицеридов и эфиров холестерина, инициируемое в плазме крови активированными полиморфноядерными лейкоцитами, наблюдается только после полного расходования эндогенной аскорбиновой кислоты, даже если мочевиная кислота, билирубин, α -токоферол и восстановленный глутатион остаются в сравнительно высокой концентрации.

Флавоноиды являются наиболее распространенными полифенольными соединениями растительного происхождения. Фармакологические эффекты флавоноидов были обнаружены в 1936 г. Сент-Дьердьи, который назвал их витаминами группы Р. В настоящее время установлено, что флавоноиды обладают выраженными антиоксидантными, антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и антивирусными свойствами. Наиболее убедительно свидетельствуют о важной биологической роли флавоноидов и других природных полифенолов в организме эпидемиологические исследования. Показано, что включение в диету пожилых людей продуктов с высоким содержанием флавоноидов (яблоки, лук, чай) приводило к снижению заболеваемости коронарной болезнью сердца. Выявлено также, что флавоноиды зеленого чая снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний и уменьшают смертность от рака желудка. Особенно возрос интерес к флавоноидам в последнее время в связи с так называемым французским парадоксом, суть которого заключается в необычно низком уровне сердечно-сосудистых заболеваний у жителей ряда областей Франции и других средиземноморских стран, несмотря на наличие факторов (высокое потребление жиров, курение), провоцирующих сердечно-сосудистые болезни. Оказалось, что объясняется этот феномен значительным потребле-

нием населением этих областей оливкового масла и красного вина, содержащих большое количество различных полифенолов и других антиоксидантов (средиземноморская диета). На основе данных эпидемиологических исследований были предприняты многочисленные попытки использовать полифенолы и другие антиоксиданты в качестве фармакологических и диетических средств профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Однако проведенные клинические испытания дали довольно противоречивые результаты. Одной из причин является то, что природные полифенолы оказывают модулирующее действие на процессы биосигнализации, причем некоторые из них, такие как кверцетин, эффективно предотвращают окислительную модификацию ЛПНП, но при этом усиливают их провоспалительное действие на уровне меж- и внутриклеточных путей передачи сигнала.

Глава 13

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ: АПОПТОЗ И НЕКРОЗ

13.1. Биологическое значение апоптоза

Смерть клетки может произойти двумя принципиально различными путями: апоптоза и некроза. Некроз – насильственная или случайная гибель клетки, вызванная повреждениями, несовместимыми с дальнейшим ее существованием; считался универсальным механизмом гибели клетки вплоть до открытия апоптоза в 1972 г. Апоптоз – запрограммированный акт активного самоуничтожения клетки, необходимый элемент формообразовательного процесса в эмбриогенезе и важнейший механизм поддержания клеточного гомеостаза у взрослых особей. Апоптоз универсален и эволюционно консервативен. Он выявлен у всех многоклеточных организмов – от вольвокса до человека. У позвоночных в процессе формирования нервной системы более половины всех первоначально образовавшихся клеток погибают. У взрослого человека миллиарды клеток ежедневно умирают в костном мозге и кишечнике. На первый взгляд это кажется расточительным, особенно если учесть, что большая часть погибающих клеток перед началом апоптоза вполне нормальна. Но такая «расточительность» оправдывается той громадной ролью, которую играет апоптоз в развитии и жизнедеятельности многоклеточных организмов. В онтогенезе совершенство и сложность строения взрослого организма достигается в результате динамического баланса двух регулируемых процессов – митоза и апоптоза. В качестве примера можно указать формирование конечностей у млекопитающих. Так, у мыши на ранней стадии онтогенеза лапка по форме напоминает лопату, а затем в результате апоптоза часть клеток, топографически локализованная между будущими пальцами, элиминируется.

Во взрослом организме посредством апоптоза устраняются клетки с поврежденной ДНК или денатурированными белками, другими структурно-функциональными нарушениями, возникающими в результате воздей-

ствия внешних и внутренних патогенных факторов: радиации, гипоксии, травмы, аксотомии нейронов, генотоксических препаратов. О том, что такие клетки должны быть обязательно удалены, свидетельствует опыт использования некоторых антиапоптотических фармакологических препаратов при воздействии на организм повреждающих факторов различной природы. Молекулярный механизм действия фармпрепаратов мог быть различным, но во всех случаях, когда они предотвращали развитие апоптоза без защиты ДНК, наблюдалось увеличение частоты возникновения раковых клеток. Апоптозом уничтожаются клетки иммунной системы, образующие антитела к собственным белкам организма. Апоптоз участвует в антивирусной защите и борьбе со злокачественным перерождением. Таким образом, физиологический смысл апоптоза – устранение части клеток в интересах организма как целого. Термины «запрограммированная клеточная смерть» и «апоптоз» обычно употребляют как синонимы. Первый термин чаще используют для описания закономерной гибели клеток в процессе онтогенеза, в частности морфогенеза, второй – для описания гибели клеток во взрослом сформировавшемся организме. Механизмы реализации этих двух процессов сходны, но не тождественны.

13.2. Морфофизиологические признаки апоптоза и некроза

Подобно другим программам клеточного поведения, апоптоз сопровождается характерными морфологическими изменениями. Появление термина «апоптоз» связано с результатами морфологических наблюдений, свидетельствующих о том, что в процессе гибели клетки возникают выпячивания плазматической мембраны, отделяющиеся далее в виде ограниченной мембраной «апоптотических телец» (апо – отделение, ptosis – падение). Апоптоз – активный процесс, в ходе которого клетка остается открытой системой, активно использующей энергию АТФ, которая на начальных стадиях апоптоза продолжает образовываться в митохондриях. Энергия АТФ в апоптотической клетке нужна как для обеспечения ее жизнеобеспечения, в частности поддержания ионного гомеостаза, так и для реализации программы гибели. Например, переход клетки в состояние апоптоза сопровождается активацией энергозависимого процесса отпочкования от эндоплазматического ретикулума пузырьков-визикул, мигрирующих к периферии клетки, где мембрана визикюлы сливается с плазматической мембраной, а ее содержимое высвобождается во внеклеточное пространство (рис. 42). Следствием этого процесса является сжатие и уменьшение объе-

ма клетки на 30–50 %. Апоптотические тельца фагоцитируются соседними клетками, или фагоцитами, поэтому внутриклеточное содержимое погибающей клетки не выходит наружу, а вовлекается в метаболические и пластические процессы в поглотивших их клетках. Уже в самом начале апоптоза клетка теряет способность к адгезии и межклеточному взаимодействию, материал ядра конденсируется и расчленяется на хроматиновые глыбки. Происходит упорядоченное разрезание цепи ДНК по межнуклеосомным промежуткам. Таким образом, апоптоз протекает в отдельных клетках, непосредственно не влияя на состояние соседних и не приводя к развитию воспалительной реакции.

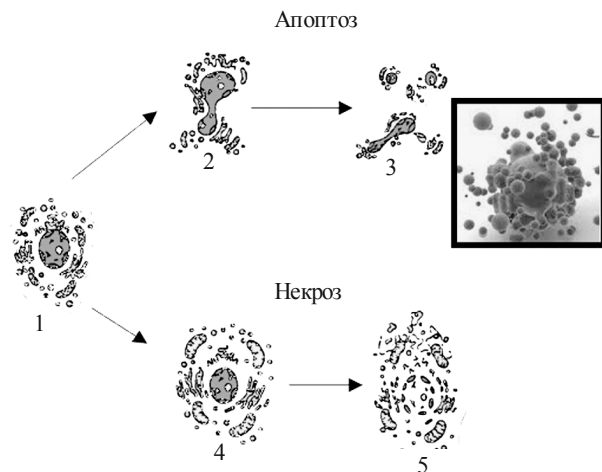


Рис. 42. Два механизма клеточной гибели

Некроз, напротив, протекает в группе клеток. Межклеточные контакты сохраняются до поздней стадии гибели клетки. Некроз – пассивный процесс, сопровождающийся ингибированием метаболических процессов. В первую очередь это проявляется в том, что в клетке нарушается работа ионных насосов и ионный гомеостаз. Содержание клетки по отношению к внеклеточной среде становится гипертоническим. В результате осмоса в клетку поступает вода, что приводит к набуханию органелл и самой клетки и их повреждению (см. рис. 42). Выходящие из клеток продукты взаимно усиливают некротическое повреждение и воздействуют на близлежащие неповрежденные клетки, благодаря чему процесс распространяется и охватывает значительный объем ткани. Более того, в очаг некроза устремляются клетки-фагоциты, что приводит к возникновению области воспаления.

13.3. Генетические механизмы апоптоза

Поскольку механизм апоптоза запрограммирован генетически, для понимания того, как умирают клетки, было необходимо обнаружить гены, контролирующие апоптоз, и определить, как действуют продукты этих генов. Первые данные, позволившие понять механизмы апоптоза, были получены на микроскопическом (менее 1 мм в длину) червячке нематоде *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), состоящем всего из 1090 неполовых клеток, из которых 131 в ходе развития погибает, используя механизм апоптоза. Установлено, что гибель клеток вызвана каскадом экспрессии генов, которая приводит к конечной продукции белков, убивающих клетку. Что это за гены и белки? Генетические исследования позволили идентифицировать 10 генов, которые действуют на различных стадиях апоптоза: самоубийства, фагоцитоза и уборке останков клетки.

- *Самоубийство*. Эту стадию контролируют два гена (*ced-3* и *ced-4* (от англ. cell death abnormal)). Мутации, устранившие функцию каждого из них, приводят к тому, что клетки, обычно умирающие, выживают и дифференцируются.

- *Фагоцитоз*. Осуществление фагоцитоза требует активности семи генов (*ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-8*, *ced-10*). У мутантов по этим генам апоптотические клетки часто сохраняются рядом с живыми на протяжении многих часов.

- *Разрушение ДНК*. Расщепление ДНК осуществляется Ca^{2+} -зависимой эндонуклеазой, которая кодируется геном *nuc*. Стадии фагоцитоза и фрагментации ДНК не имеют прямого отношения к самой клеточной смерти, которая может происходить и в их отсутствие.

- *Ингибирование апоптоза*. Ген *ced-9* тормозит суицидную программу, поэтому в случае активирующей его мутации, апоптоз не происходит. Напротив, если мутация гена инактивирующая, погибают и некоторые из тех клеток, которые в норме выживают. Рано умирает и само животное. Следовательно, значительно больше, чем 131, клеток имеют готовые к действию *ced-3*- и *ced-4*-зависимые суицидные программы, но в них они подавлены *ced-9*-зависимым механизмом. Суицидные гены *ced-3* и *ced-4* кодируют цистеиновые протеазы CED-3 и CED-4.

Мутации, вызывающие подавление процессов программируемой гибели клеток у нематод, приводят к нарушению процессов морфообразования и жизнедеятельности. Вследствие излишка клеток увеличена нагрузка на метаболизм – животные медленнее созревают. Лишние нейроны вмешиваются в работу нервной сети – животные хуже отвечают на хемосенсорные стимулы. В целом мутанты менее конкурентоспособны.

13.4. Биохимические механизмы апоптоза

Внутриклеточный механизм апоптоза схож по своему строению у всех позвоночных животных. Его основой является система протеаз, имеющих в активном центре остаток цистеина и расщепляющих белки-мишени после остатков аспарагиновой кислоты, получивших по этой причине название *каспазы*. Каспазы синтезируются и существуют в клетке как неактивные предшественники – *прокаспазы*. Активируются прокаспазы под действием нескольких так называемых иницирующих каспаз, в результате отщепления ингибирующего фрагмента по остатку аспарагиновой кислоты. При апоптозе иницирующие каспазы активируются и расщепляют, а следовательно, активируют другие каспазы, и запускаются протеолитические каскады (каскады смерти), результатом которых является многократное усиление протеолиза в апоптотической клетке. Активность запускающих каспаз (9 и 8) при этом возрастает соответственно в 10 и 100 раз, а палача – каспазы-3 – в 10 000 раз. Каспазы действуют на ключевые внутриклеточные молекулы. Часть каспаз расщепляет важнейшие белки в цитоплазме, другие разрушают ядерную мембрану, третьи расщепляют белки, которые в нормальном состоянии инактивируют ДНК-деградирующий фермент – ядерную эндонуклеазу. В результате ядерные эндонуклеазы в апоптотической клетке активируются и начинают расщеплять ДНК на фрагменты. Признаки фрагментации появляются на ранней стадии апоптоза, за несколько часов до начала снижения жизнеспособности. Расщепление ДНК идет по межнуклеосомным промежуткам с образованием фрагментов, кратных 180–200 п. н. По этой причине при электрофорезе ДНК в полиакриламидном геле видна своего рода лесенка. При некрозе хаотическое разрушение ДНК дает фрагменты самого различного размера, поэтому на электрофореграмме ДНК возникает размытое пятно. Различные варианты апоптоза, по-видимому, нетождественны в биохимическом плане. Для запуска гибели клеток в раннем онтогенезе необходим синтез новых белков, в других ситуациях подобная зависимость отсутствует.

13.5. Биосигнализация апоптоза

Все животные клетки, исключая эритроциты, содержат генетически запрограммированный механизм клеточной гибели, который находится в постоянной готовности и включается при получении соответствующего сигнала. По отношению к клетке такой сигнал может быть внешний или внутренних. Например, апоптоз может быть запущен цитокинами после связывания их с соответствующими рецепторами на плазматической мембране, в

результате чего включаются пути передачи внешнего сигнала (extrinsic pathway). Если сигнал возникает непосредственно в клетке, а такими сигналами в первую очередь являются повреждение хромосом и иные изменения хроматина, активируются так называемые внутренние пути передачи сигнала (intrinsic pathways). В обоих случаях апоптотический механизм клеточной гибели включает несколько этапов сигнальной трансдукции от сигнала смерти до включения исполнительного механизма разрушения основных клеточных элементов.

Поскольку конечным этапом апоптоза является фагоцитоз наряду с сигнальными путями, обеспечивающими запуск апоптоза, апоптотическая клетка должна привлекать фагоциты, сигнализируя им о том, что для них появилась «работа» (сигнал «съешь меня»). К таким сигналам относят структурные биохимические изменения в плазматической мембране, а именно:

- изменения в углеводном компоненте;
- потерю фосфолипидной асимметрии и экстернализацию (выход на внешнюю поверхность клеточной мембраны) фосфатидилсерина;
- появление (экспрессия) на плазматической мембране специфических рецепторов адгезии.

13.6. Сигнальная трансдукция в случаях внешнего инициирования апоптоза (extrinsic pathway)

Внеклеточные сигналы апоптоза и их рецепторы. Внеклеточными сигналами, запускающими апоптоз, являются цитокины, такие как фактор некроза опухолей альфа TNF- α и лиганд FasL, и их аналоги, а также антигены. Апоптоз может быть иницирован и в результате воздействия на инфицированные или трансформированные клетки белка перфорина и гранзима В (granzyme В), которые продуцируются клетками-киллерами. Активные формы кислорода, способные модифицировать наружную поверхность плазматической мембраны, также способны инициировать апоптоз.

Структурной особенностью рецепторов, взаимодействующих с цитокинами и другими лигандами, служащими сигналами к началу апоптоза, является наличие на внутриклеточной части рецепторных молекул особого домена смерти, связывающегося с гомологичным доменом смерти внутриклеточной адаптерной молекулы, которая сопрягает активацию рецепторов с активацией каспаз. Рецепторы, лишённые домена смерти, связываясь с теми же лигандами, запускают пути передачи сигналов, усиливающих рост и размножение клеток.

На поверхности клетки имеются также и антиапоптотические рецепторы, активирующиеся при связывании особых внеклеточных антиапоптотических

белков, специфических для каждой ткани. По существу белки, о которых идет речь, непрерывно посылают клетке сигнал «живи дальше». Исчезновение такого сигнала, например в случае, если клетка случайно окажется вне своей ткани, дает преимущества проапоптозным системам клетки над антиапоптозными, и клетка переходит в апоптоз.

Иницирование апоптоза фактором некроза опухолей альфа и Fas-лигандом. Фактор некроза опухолей альфа – важнейший провоспалительный цитокин, продуцируемый различными клетками, главным образом макрофагами, лимфоцитами, фибробластами и кератиноцитами, в ответ на воспаление, инфекции и другие внешние стрессорные воздействия. TNF- α вызывает целый спектр биологических ответов, зависящих от типа клеток, на которые он воздействует. Действие TNF- α опосредуется через два вида поверхностных рецепторов – TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75) (рис. 43). Большинство клеток экспрессирует TNFR1 рецепторы, посредством которых, как полагают, реализуются цитотоксические эффекты TNF- α и запускаются процессы апоптоза. Напротив, взаимодействие лиганда с рецепторами TNFR2 инициирует пути сигнальной трансдукции, ведущие к активации ядерного фактора kappaB (NF- κ B), повышению экспрессии ряда генов, и способствует выживанию клеток при воздействии различных негативных факторов.

Связывание TNF- α с TNFR1-рецептором приводит к формированию тройного комплекса: лиганд – TNF- α , рецептор – TNFR1 и специальный белок, несущий так называемый домен смерти – TRADD (TNFR-associated death domain). В этом комплексе TRADD выполняет функцию адаптерного или скэффолд-белка, к которому присоединяется группа сигнальных белков, также имеющих домены смерти: FADD (FAS-associated death domain), RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain), MADD (MAPK-activating death domain). Эти сигнальные белки инициируют несколько путей, ведущих к активации различных каспаз и в конечном итоге к гибели клетки путем апоптоза.

По-видимому, основной из этих путей инициируется в результате образования сигнального комплекса TRADD, FADD и прокаспазы-8. Результатом такого взаимодействия является превращение прокаспазы-8 в активную каспазу-8, которая воздействует на каспазы «палачи» или исполняющие каспазы 3, 6 и 7. В покое данные каспазы представляют собой зимогены, т. е. предшественники ферментов. После протеолиза, катализируемого каспазой-8, возникают зрелые каспазы, вызывающие ограниченный протеолиз субстратов, ответственных за морфологические и биохимические проявления апоптоза. Среди них белковый комплекс ICAD/DFF-45, в результате ограниченного протеолиза которого высвобождается белок CAD, обладающий высокой эндонуклеазной активностью и осуществляющий процесс апоптотической фрагментации ДНК.

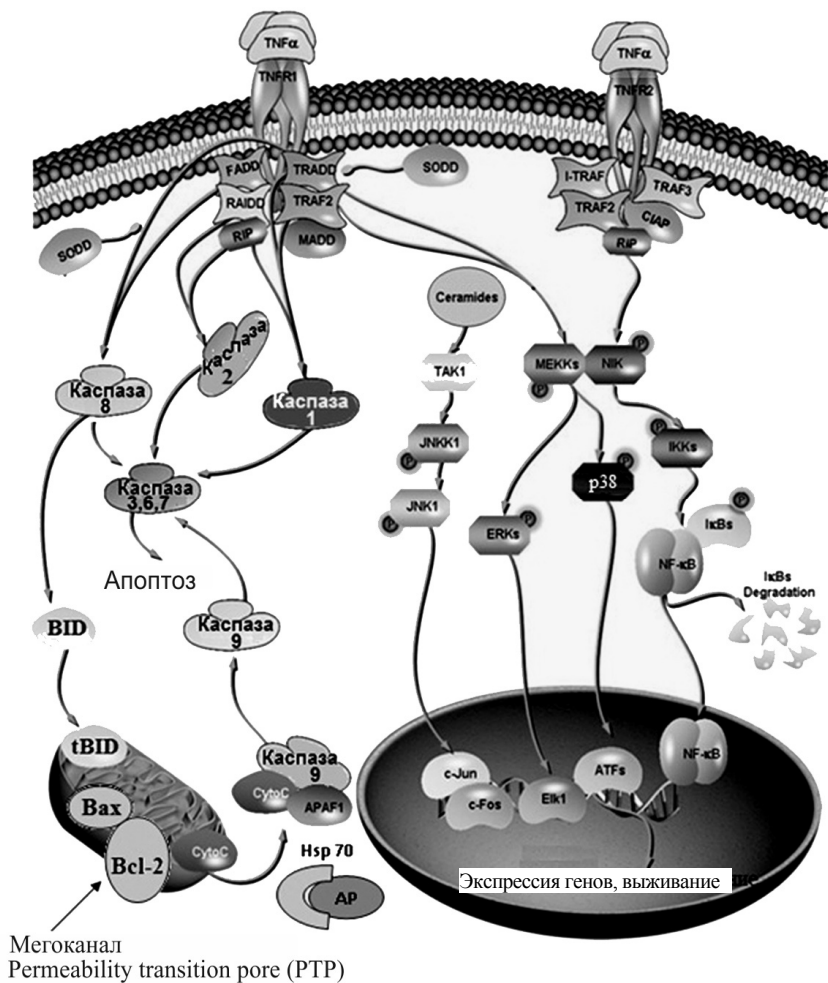


Рис. 43. Пути внутриклеточной передачи сигналов, запускающих апоптоз

Каспаза-8 может также активировать прокаспазы 3, 6 и 7 в результате более сложного пути сигнальной трансдукции, включающего протеолитическое расщепление сигнального цитозольного белка BID (BH3-interacting death domain) с образованием tBid (truncated Bid). tBid изменяет конформацию другого белка – Bax. Bax взаимодействует с белком Bcl-2, образуя белковые комплексы, представляющие собой неспецифические каналы для

всех небольших молекул. Данный мегоканал PTP (Permeability transition pore), что в переводе означает «пора, вызывающая переход (мембраны митохондрий) в состояние высокой проницаемости». Далее через эту пору высвобождается цитохром *c*. В цитозоле цитохром *c*, который известен как компонент дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий, функционирует как проапоптотический фактор (*Apaf-2*). В этом случае он взаимодействует с другим проапоптотическим фактором, который называется *Apaf-1* (Apoptotic protease activating factor-1 – в переводе фактор, активирующий апоптотические протеазы или просто фактор, активирующий апоптоз). Образовавшийся белковый комплекс активирует иницирующую каспазу-9. Более детально этот путь будет рассмотрен в следующем разделе.

Еще несколько путей сигнальной трансдукции, запускаемых в результате взаимодействия TNF- α с TNFR1, начинаются на уровне MADD (MAPK-activating death domain) и RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain). Эти белки взаимодействуют и активируют соответственно прокаспазу-1 и прокаспазу-2. Оба активированных фермента в свою очередь катализируют протеолиз прокаспаз 3, 6 и 7, в результате чего, как и после протеолиза каспазой-8, возникают зрелые каспазы.

Кроме рассмотренных адаптерных и сигнальных белков, распространяющих по клетке сигнал о начале апоптоза, с рецептором TNFR1 взаимодействует еще один достаточно крупный белок (60 kDa), блокатор («глушитель») доменов смерти – SODD (Silencer of death domains). Функцией SODD является блокирование домена смерти рецептора TNFR1. Увеличенная экспрессия SODD в клетке блокирует проапоптотический эффект TNF- α .

Роль внеклеточных АФК в иницировании апоптоза. Известно, что клетку можно послать в апоптоз посредством как тех АФК, которые генерируются ее митохондриями, так и АФК, поступающих извне. В последнем случае важную роль играет фосфолипид плазматической мембраны клетки – фосфатидилсерин. В этой мембране фосфатидилсерин обычно присутствует только во внутреннем липидном слое. Такое асимметричное распределение данного фосфолипида обусловлено действием особой транспортной АТФ-азы, переносящей фосфатидилсерин из внешнего липидного слоя плазматической мембраны во внутренний. Эта АТФ-аза либо инактивируется окисленной формой фосфатидилсерина, либо просто не узнает окисленный фосфолипид. Вот почему окисление фосфатидилсерина посредством АФК ведет к его появлению во внешнем слое плазматической мембраны. По-видимому, существует специальный рецептор, обнаруживающий фосфатидилсерин в наружном липидном слое. Предполагается, что этот рецептор, связав фосфатидилсерин, посылает внутрь клетки сигнал апоптоза.

Фосфатидилсерин играет ключевую роль в так называемом принудительном апоптозе, вызываемом определенным типом лейкоцитов. Клетка

с фосфатидилсерином во внешнем слое клеточной мембраны узнается этими лейкоцитами, которые посылают ее в апоптоз. Один из апоптогенных механизмов, используемых лейкоцитами, состоит в том, что они начинают выделять в межклеточное пространство вблизи клетки-мишени белки перфорин и гранзимы (рис. 44). Перфорин проделывает отверстия во внешней мембране клетки-мишени. Гранзимы входят в клетку и запускают в ней апоптоз. Другой апоптогенный механизм включает секрецию лейкоцитами фактора некроза опухолей альфа, молекулярный механизм действия которого был рассмотрен в предыдущем разделе.

Лейкоциты для принуждения клетки-мишени войти в апоптоз способны подвергать ее бомбардировке супероксидом, генерируемым NADPH-оксидазным комплексом, расположенным на внешней стороне плазматической мембраны лейкоцита. Супероксид и другие АФК, образующиеся из него, окисляют фосфатидилсерин плазматической мембраны клетки-мишени, тем самым запуская или усиливая сигнал о начале апоптоза.

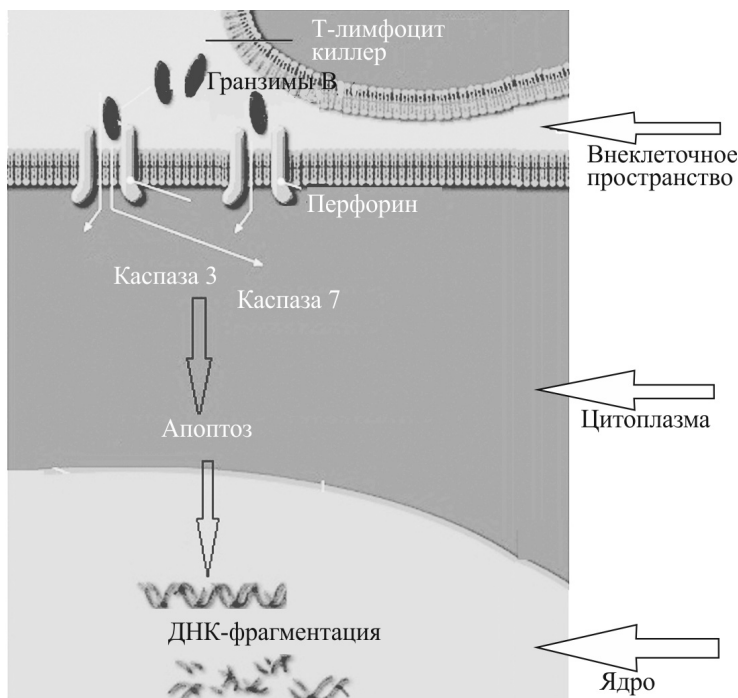


Рис. 44. Молекулярный механизм принудительного апоптоза посредством перфорина и гранзимов

13.7. Сигнальная трансдукция при внутриклеточном иницировании апоптоза (intrinsic pathway)

Роль митохондрий в иницировании апоптоза. Роль митохондрий в иницировании апоптоза опосредована процессом образования пор. Поры в мембранах митохондрий могут образовываться не только в результате формирования белкового комплекса BAX-BC12, но и структурно-функциональных нарушений. В процессе функционирования митохондрий даже в нормальных условиях происходит постоянная утечка электронов с дыхательной цепи, локализованной на внутренней мембране на кислород и образование так называемых активных форм кислорода (АФК). При различных воздействиях на клетки, например гипоксии или гипероксии, этот процесс может существенно усиливаться. Под действием АФК во внутренней мембране митохондрий образуются неспецифические каналы, проницаемые для любых низкомолекулярных веществ, аналогичные рассмотренным выше РТП, вызывающих переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости. Возникновение таких пор ведет к нарушению осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. В обычных условиях этот баланс поддерживается в основном ионами K^+ и Cl^- . С открытием пор во внутренней мембране она становится проницаемой для этих ионов, и их содержание в обоих компартментах выравнивается. Теперь только высокомолекулярные соединения, прежде всего белки, для которых мембрана по-прежнему непроницаема, обуславливают разницу в осмотическом давлении. Поскольку в матриксе белков гораздо больше, чем в межмембранном пространстве, вода начинает поступать в матрикс, стремясь разбавить находящийся там белковый раствор. В результате матрикс набухает, гребни (складки) внутренней мембраны расправляются, а внешняя мембрана, площадь которой меньше площади внутренней мембраны, разрывается. При этом все белки, растворенные в межмембранном пространстве, выходят в цитозоль. Среди этих белков находятся цитохром *c* и *апоптозвызывающий фактор* (AIF), играющие важную роль в иницировании апоптоза.

Механизм включения апоптоза посредством AIF состоит в активации нуклеазы, расщепляющей ядерную ДНК, что приводит к характерным для апоптоза изменениям в ядре клетки. Самоубийство клетки, опосредованное цитохромом *c*, происходит более сложным образом. Цитохром *c* (Araf-2), вышедший из митохондрии в цитозоль, связывается с цитозольным белком, названным «первый фактор», активирующим апоптоз (Araf-1). С Araf-1 связываются также дезоксиАТФ и несколько молекул прокаспазы 9. После образования комплекса прокаспазы 9 расщепляется на каспазу 9 и более короткий пептид, не обладающий какой-либо активностью. Каспаза 9 атакует прокаспазы 3, 6, и 7, расщепляя их с образованием активных каспаз.

Если повреждения имеют место лишь в небольшой части внутриклеточной популяции митохондрий, большинство из них удаляется путем аутофагоцитоза еще до образования мембранных пор. В случае если все большее количество митохондрий становятся суперпродукентами АФК и процесс аутофагии не способен их полностью элиминировать, концентрации цитохрома *c* и проапоптических белков в цитозоле клетки, содержащей много дефектных митохондрий, достигают значений, необходимых для активации апоптоза. В результате происходит очистка ткани от клеток, митохондрии которых образуют слишком много АФК.

Иницирование апоптоза при повреждении ДНК. Повреждение ядерной ДНК наиболее опасно для любой эукариотической клетки. У эукариот существует специальный белок p53, это фактор транскрипции, названный стражем генома. Он отслеживает появление разрывов в ДНК и в ответ на это: 1) активирует гены, кодирующие те белки, которые обеспечивают репарацию ДНК; 2) блокирует (если первое не помогает) синтез белков клеточного деления и 3) включает программу апоптоза, если количество повреждений ДНК превышает некий критический уровень. Наличие таких механизмов обуславливает высокую степень консерватизма генома, абсолютно необходимую для сохранения достижений биологической эволюции. Очевидно, что отдельным клеткам лучше умереть, чем оставаться живыми с неправильной ДНК. Например, у мышей с мутацией в гене, кодирующей p53 и выключающей его функцию, повреждение ДНК в клетках кожи (кератиноцитах), вызванное воздействием УФ-излучения, не приводило к развитию в них апоптоза, но при этом многократно возрастала вероятность неопластической трансформации и иницирования канцерогенеза.

Иницирование апоптоза вследствие денатурации клеточных белков. Известно, что белок теплового шока hsp70 (heat shock protein 70) участвует в ренатурации денатурированных белков. При этом образуется комплекс – денатурированный белок hsp70, неизбежно ведет к снижению концентрации свободного hsp70 в цитозоле. Оказывается, кроме способности ренатурировать денатурированные белки hsp70 обладает антиапоптотической активностью, так как блокирует взаимодействие Araf-1 с цитохромом *c*, препятствуя тем самым развитию апоптоза. Очевидно, что денатурация белков, ведущая к снижению концентрации свободного hsp70, должна активировать апоптоз в результате снятия блокады апоптотического пути, требующего Araf-1.

В заключение можно сделать вывод, что клетка погибает путем апоптоза, если происходит: а) повреждение ДНК (активируется проапоптотический белок p53); б) денатурация белков (связывается антиапоптотический белок hsp70); в) окислительная модификация липидов (потеря фосфолипидной асимметрии и формирование неспецифических мембранных каналов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Геннис, Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции : пер. с англ. / Р. Геннис. – М., 1997.
- Дерябин, Д. Г.* Функциональная морфология клетки : учеб. пособие / Д. Г. Дерябин. – М., 2005.
- Зинченко, В. П.* Внутриклеточная сигнализация : учеб. пособие / В. П. Зинченко, Л. П. Долгачева ; под ред. А. Ю. Буданцева. – Пушкино, 2003.
- Камкин, А. Г.* Физиология и молекулярная биология мембран клеток : учеб. пособие / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. – М., 2008.
- Костюк, В. А.* Биорадикалы и биоантиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Минск, 2004.
- Луценко, В. К.* Молекулярная патофизиология / В. К. Луценко. – М., 2004.
- Молекулярная биология клетки : учеб. пособие : в 3 т. / Б. Албертс [и др.]. – М., 1994. – 3 т.
- Основы физиологии человека : учебник : в 2 т. / под ред. Б. И. Ткаченко. – СПб., 1994. – 2 т.
- Пальцев, М. А.* Межклеточные взаимодействия / М. А. Пальцев, А. А. Иванов. – М., 1995.
- Физиология человека : в 4 т. / под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. – М., 1985. – 4 т.
- Физиология человека : в 3 т. : пер. с англ. / под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. – 3-е изд. – М., 2005. – Т. 1.
- Физиология человека : в 2 т. / под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько. – М., 1997. – 2 т.
- Ченцов, Ю. С.* Введение в клеточную биологию : учебник / Ю. С. Ченцов. М., 2005.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	3
Г л а в а 1. КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ	
1.1. Молекулярная организация (жидкостно-мозаичная модель) и химический состав.....	4
1.2. Основные функции клеточных мембран	8
1.3. Трансмембранный транспорт	8
1.4. Осмос и осмотическое давление.....	14
Г л а в а 2. БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ	
2.1. Энергетические процессы в цитоплазме, гликолиз	17
2.2. Энергетические процессы в митохондриях	19
2.3. Общий энергетический баланс окисления глюкозы в аэробной клетке.....	27
Г л а в а 3. КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ	
3.1. Структура и функции эндоплазматического ретикулума.....	29
3.2. Аппарат Гольджи, его структура и физиологическая роль	33
3.3. Лизосомы.....	35
3.4. Микротельца	41
Г л а в а 4. ЦИТОСКЕЛЕТ	
4.1. Общие представления о структуре, функции цитоскелета	43
4.2. Актиновые филаменты.....	43
4.3. Структура и функции микротрубочек.....	46
4.4. Структура и функции промежуточных филаментов.....	48
4.5. Внеклеточные структуры, коллаген	50
Г л а в а 5. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ	
5.1. Основные типы гуморальной коммуникации и классификация гуморальных сигналов.....	52
5.2. Различия в сигнальной трансдукции посредством гидрофобных и гидрофильных молекул, каскадный механизм	53
5.3. Молекулярные механизмы десигнализации	57
Г л а в а 6. ЭНДОКРИННАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ	
6.1. Основные гормоны, регулирующие метаболизм и развитие	59
6.2. Нейропептиды.....	67

Глава 7. АУТОКРИННАЯ И ПАРАКРИННАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ. ТКАНЕВЫЕ ГОРМОНЫ

7.1. Цитокины	69
7.2. Лейкотриены	70
7.3. Простагландины	72
7.4. Простые неорганические молекулы в системе межклеточной коммуникации	74

Глава 8. РЕЦЕПЦИЯ БИОСИГНАЛОВ

8.1. Основные типы поверхностных клеточных рецепторов, их структурные и функциональные особенности	78
8.2. Рецепторы, управляющие трансмембранными ионными каналами	78
8.3. Рецепторы, сопряженные с G-белками	79
8.4. Рецепторы, обладающие собственной ферментативной (протеинкиназной) активностью или связанные с протеинкиназами	82

Глава 9. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ БИОСИГНАЛОВ

9.1. Модульный принцип в формировании трехмерной структуры внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции	84
9.2. Протеинкиназные каскады	89
9.3. Сигнализация через NF-κB белки (ядерный фактор κB)	90

Глава 10. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВТОРЫЕ ПОСРЕДНИКИ

10.1. Сигнальная трансдукция посредством циклических нуклеотидов	93
10.2. Роль ионов кальция в процессах внутриклеточной передачи сигнала	95
10.3. Сигнальная трансдукция посредством инозитолфосфолипидов	99
10.4. Другие пути внутриклеточной передачи сигнала с помощью ионов кальция	103

Глава 11. РОЛЬ КЛЕТОК В ПОДДЕРЖАНИИ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА. ВОСПАЛЕНИЕ

11.1. Общая характеристика воспаления	108
11.2. Характеристика основных типов лейкоцитов	109
11.3. Биосигнализация воспаления (сигнальная роль АФК и пероксидов)	112

Глава 12. МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ КРУПНЫХ АРТЕРИЙ. АТЕРОСКЛЕРОЗ

12.1. Липопротеиды, их классификация и механизмы модификации	118
12.2. Межклеточная передача сигнала при атерогенезе. Сигнальные эффекты модифицированных липопротеидов низкой плотности	124
12.3. Механизмы противовоспалительного действия антиоксидантов	126

Глава 13. МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ: АПОПТОЗ И НЕКРОЗ

13.1. Биологическое значение апоптоза	129
13.2. Морфофизиологические признаки апоптоза и некроза	130
13.3. Генетические механизмы апоптоза	132
13.4. Биохимические механизмы апоптоза	133
13.5. Биосигнализация апоптоза	133
13.6. Сигнальная трансдукция в случаях внешнего инициирования апоптоза (extrinsic pathway)	134
13.7. Сигнальная трансдукция при внутриклеточном инициировании апоптоза (intrinsic pathway)	139

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141
-------------------------	-----

Учебное издание

Костюк Владимир Андреевич

ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Пособие

Редактор *Т. А. Беланко*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Т. К. Раманович*
Компьютерная верстка *А. А. Микулевича*
Корректор *О. С. Гладкова*

Подписано в печать 29.09.2016. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 8,37. Уч.-изд. л. 9,38. Тираж 100 экз. Заказ 602.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.