



Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Международный государственный экологический
университет имени А. Д. Сахарова»

Факультет экологической медицины

Кафедра биохимии и биофизики

С. Б. БОКУТЬ

КУРС ЛЕКЦИЙ
ПО ПАТОБИОХИМИИ
Обмен белков и углеводов
в норме и при патологии

Часть 1

Минск
2008

УДК 577(075.8)
ББК 28.070я73
Б78

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
МГЭУ им. А. Д. Сахарова (протокол № 9 от 23 мая 2007 г.).

Автор:

зав. кафедрой биохимии и биофизики МГЭУ им. А. Д. Сахарова,
кандидат биологических наук *С. Б. Бокуть*.

Рецензенты:

заведующий лабораторией химии липидов
Института биоорганической химии НАН Беларуси,
доктор химических наук *М. А. Кисель*;
доцент кафедры молекулярной и экологической генетики
МГЭУ им. А. Д. Сахарова, кандидат биологических наук *В. В. Селявко*.

Бокуть, С. Б.

Б78 Курс лекций по патобиохимии : обмен белков и углеводов в норме и при патологии / С. Б. Бокуть. — Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2008. — Ч. 1. — 136 с.

ISBN 978-985-6823-61-2. (Часть I)

ISBN 978-985-6823-60-5.

Данный курс лекций предназначен для биохимиков, физиологов, генетиков, химиков, медиков, для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, химических и медицинских специальностей.

УДК 577(075.8)
ББК 28.070я73

ISBN 978-985-6823-61-2 (Часть I)
ISBN 978-985-6823-605

© Учреждение образования
«Международный государственный
экологический университет
имени А. Д. Сахарова», 2008

Процессы катаболизма сопряжены с целым рядом проблем. В то же время недостаточность ферментов биосинтеза встречается намного реже. Дело, вероятно, в том, что врожденное нарушение биосинтеза чаще оказывается абсолютно летальным и приводит к спонтанному абортированию плода.

Д. Мецлер

ВВЕДЕНИЕ

Обмен веществ – сложная система химических реакций, которые можно условно разделить на реакции пластического и энергетического обмена, а также реакции, лежащие в основе осуществления общей регуляции метаболизма. Главными целями этих реакций являются генерирование энергии при катаболизме пищевых веществ, образование строительных блоков в ходе гидролиза поступающих извне биополимеров, сконструированных по чужим генетическим программам, и синтез собственных полимеров, строение которых соответствует индивидуальной генетической программе организма, а также создание и инактивация сигнальных молекул.

Общая биохимическая схема обмена веществ включает множество цепочек последовательных реакций, целые каскады и циклы химических превращений, объединенных между собой связующими метаболическими путями.

Как равновесная система разнонаправленных процессов обмен веществ не может быть целиком изменен в каком-то одном направлении. При любой форме патологии скорость и эффективность различных химических реакций изменяется разнонаправленно. Так, при инсулинозависимом сахарном диабете усиливаются глюконеогенное образование глюкозы и распад гликогена, но тормозятся цикл Кребса и пентозофосфатный путь. При фенилкетонурии снижается уровень образования меланина, но усиливается продукция фенилэтиламина.

Для регуляции обмена веществ эволюционно сформировались разнообразные механизмы, выступающие в роли инструментов тонкой настройки метаболизма, т. е. эти инструменты обеспечивают коррекцию каталитической активности ферментов, а также способствуют изменению конформационных параметров и, как следствие, аффинности рецепторных белков к своим лигандам.

Эти формы контроля основаны на химической сигнализации с участием субстратов, ионов, гормонов, нейромедиаторов и антител. У многоклеточных организмов, млекопитающих и, в конечном итоге, у человека эволюционный процесс привел к формированию высокоспецифичных вариантов химической сигнализации, включающих участие эндокринных, нейромедиаторных и нейроэндокринных регуляторов, взаимодейст-

вующих между собой. Регуляторные сигналы и антисигналы образуют информационные сети, такие как, например, идиотип-антиидиотипическая сеть иммунологических взаимодействий.

При осуществлении сигнальной регуляции метаболизма активация и инактивация ферментов могут происходить также на *посттрансляционном уровне*, причем в роли аллостерических регуляторов могут выступать разные химические сигналы – ионы, гормоны и сами субстраты. Большое регуляторное значение может иметь адресное закрепление ферментов в тех или иных компартментах клетки и на соответствующих биомембранах органелл. Известную роль играет возможность изменения с помощью гормонов *проницаемости клеточных мембран*, что позволяет варьировать условия протекания метаболических процессов и доступность метаболитов в различных частях клетки.

Аллостерические механизмы метаболической регуляции, возникшие у одноклеточных организмов, не исчезли, а, наоборот, сохраняют свою актуальность и у высших организмов. Так, например, именно аллостерическим посттрансляционным путем кортикостероиды активируют у человека ключевой фермент катаболизма триптофана – *триптофаноксигеназу*.

Регуляторные сигнальные химические воздействия могут непосредственно или через посредников воздействовать и на клеточный геном, изменяя порядок и скорость *транскрипции генов*. При этом происходит комплементарное взаимодействие химического регулятора с элементами генетического аппарата, воспринимающими и расшифровывающими сигнал. Сигнал способен вызвать изменение транскрипции матриц, обеспечивающих биосинтез ферментов или рецепторов, которые используются в ходе метаболического процесса. Кроме того, может модулироваться скорость и характер *посттранскрипционной* модификации матриц и судьба долгоживущих РНК.

Наконец, химические биорегуляторы способны вмешиваться и в процесс *трансляции*, влияя на его инициацию и эффективность.

Регуляторные механизмы обмена веществ таковы, что при гарантии поддержания динамической оптимальности внутренней среды они могут с помощью минимальных информационных воздействий обеспечивать осуществление целого ансамбля метаболических сдвигов. Это дает возможность метаболизму в целом быть гибким и достигать соответствующих целей в разных условиях, при различном наборе пищевых молекул с максимальной эффективностью и при минимальном количестве побочных продуктов.

ЛЕКЦИЯ 1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Исследования процессов секреции пищеварительных соков и переваривания пищи являются практически самыми ранними биохимическими исследованиями, стоящими у истоков формирования современной науки – биохимии. Основными историческими вехами на этом пути были открытие способности желудка секретировать соляную кислоту и описание ферментативного гидролиза белка и крахмала с участием желудочного сока и слюны соответственно.

Открытие продукции желудком соляной кислоты принадлежит американскому врачу Вильяму Бюмону. В 1822 году он оперировал пациента с ранением желудка. Пациент оправился от ранения, но у него осталась желудочная *фистула* и В. Бюмон воспользовался возможностью получать и изучать желудочный сок в любое время суток – как в момент принятия пищи, так и после. Химический анализ желудочного сока показал, к большому удивлению исследователя, присутствие неорганической соляной кислоты в достаточно высокой концентрации. Это наблюдение позволило впоследствии сформулировать общий принцип уникальной секреции различных неорганических веществ и гидролитических ферментов специализированными клетками и железами желудочно-кишечного тракта.

На основании более поздних дополнительных исследований принцип ферментативной деградации питательных веществ получил всеобщее признание. В частности, немецкий анатом и физиолог Теодор Шванн в 1836 году описал способность желудочного сока расщеплять альбумин в присутствии разбавленной кислоты. В результате проведенных экспериментов Т. Шванн пришел к выводу, что в желудочном соке присутствует некий фактор, деградирующий альбумин в кислой среде, который он назвал *пепсином* (от греч. *pepsis* – переваривание). В настоящее время процессы секреции пищеварительных соков, переваривания и всасывания питательных веществ и электролитов изучены достаточно детально.

Основные группы питательных веществ, как известно, представлены белками, жирами и углеводами. Различные типы продуктов питания могут целиком удовлетворять пищевым потребностям человека, даже если они отличаются по соотношению в них белков, углеводов и жиров, а также по соотношению перевариваемого и неперевариваемого материала. Не подвергающиеся изменениям компонентами растительных продуктов представлены волокнистым материалом (клетчаткой), который не переваривается ни ферментами человека, ни ферментами кишечной флоры. Волокнистый материал представлен главным образом углеводами, такими как целлюлоза (β -1,4-глюкан) и пектины (смеси метильных эфиров полигалактуроновой кислоты, полигалактозы и полиарабинозы).

Диеты, включающие высокое содержание клетчатки, в наше время пользуются определенной популярностью вследствие того, что, как полагают, волокнистый материал пищевых продуктов растительного происхождения препятствует развитию рака толстого кишечника.

Знание природы белков и углеводов, входящих в пищевой рацион человека, чрезвычайно важно с клинической точки зрения. Большая часть белков и углеводов в продуктах питания людей представлена нормальными, т. е. обычными, легко расщепляемыми составляющими (ингредиентами). Однако присутствие в продуктах питания некоторых компонентов может послужить причиной возникновения желудочно-кишечных расстройств у отдельных пациентов, поскольку эти компоненты не в состоянии перевариваться в их пищеварительном тракте. Исключение из числа продуктов питания некоторых их видов, вызывающих нарушение пищеварения, и замена их другими могут полностью устранить существующие проблемы с питанием у отдельных людей. Примерами компонентов пищи, которые могут вызывать нарушения пищеварения, служат *глутеин* – одна из белковых фракций пшеницы – и *лактоза* – главный дисахарид молока.

Органы желудочно-кишечного тракта имеют множественные функции в переваривании

Совокупность поглощаемых питательных веществ состоит из большого числа полимеров, которые должны быть расщеплены до мономеров перед тем, как они всосутся и станут доступными для всех клеток организма. Процесс расщепления и всасывания питательных веществ представляет собой сложную последовательность реакций, катализируемых пищеварительными ферментами. Основные этапы этого процесса сводятся к следующему:

- ◆ механическое размельчение пищи и смешивание твердых частиц с пищеварительными соками, секретлируемыми железами желудочно-кишечного тракта;
- ◆ секреция пищеварительных ферментов, которые гидролизуют макромолекулы до олигомеров, димеров и мономеров;
- ◆ секреция электролитов (кислот и оснований), создающих оптимальные условия для функционирования пищеварительных ферментов;
- ◆ секреция желчных кислот, выступающих в роли детергентов, которые сольбилизируют липиды и облегчают их всасывание;
- ◆ гидролиз олигомеров и димеров питательных веществ ферментами поверхности тонкого кишечника;
- ◆ транспорт мономерных молекул и электролитов из просвета тонкого кишечника через эпителиальные клетки в кровь и лимфу.

Выполнение этих многочисленных функций системы пищеварения зависит от деятельности специализированных клеток желудка, желез и эпителиальных клеток тонкого кишечника, входящих в состав желудоч-

но-кишечного тракта человека. Основные органы, причастные к пищеварению, и их функции представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Органы пищеварения и их основные функции

Орган	Основная функция в процессе переваривания и всасывания
Слюнные железы	Секреция сока и пищеварительных ферментов
Желудок	Секреция HCl, протеолитических и липолитических ферментов
Поджелудочная железа	Секреция NaHCO ₃ и ферментов для полостного пищеварения
Печень	Продукция желчных кислот
Желчный пузырь	Хранение и накопление желчи
Тонкий кишечник	Завершающие стадии расщепления питательных веществ и всасывание мономеров и электролитов
Толстый кишечник	Всасывание электролитов

Поджелудочная железа и тонкий кишечник являются основными органами пищеварения и всасывания питательных веществ. К счастью, оба органа имеют огромные резервные возможности. Например, нарушения пищеварения, обусловленные дисфункцией поджелудочной железы, становятся действительно проблемой только тогда, когда скорость секреции ферментов этой железой уменьшается до величины, составляющей менее одной десятой нормальной скорости секреции. Выработка печенью желчи является важнейшим моментом для эффективного всасывания липидов, которое зависит от присутствия желчных кислот в необходимых количествах. В противоположность сказанному переваривание пищи в желудке не является определяющим для адекватного питания и потеря этой функции может быть компенсирована поджелудочной железой и тонким кишечником. Вместе с тем нормальное функционирование желудка существенно повышает эффективность и тонкую «настройку» процесса пищеварения в целом. В частности, желудок выполняет функцию перемешивания пищи и предварительный гидролиз белков. Эти ранние стадии ферментативной обработки белков хотя и незначительны, но чрезвычайно важны для стимуляции функции поджелудочной железы и желчного пузыря. Образующиеся в результате предварительного гидролиза белков в желудке более короткие пептиды и свободные аминокислоты выступают в роли соединений – стимуляторов, координирующих выделение пищеварительного сока поджелудочной железой и выброс желчи в просвет тонкого кишечника, посредством чего обеспечивается эффективность протекания всего процесса пищеварения.

Поджелудочная железа поставляет ферменты для переваривания в тонком кишечнике

Со времени открытия Т. Шванном желудочного протеолитического фермента – *пепсина* утвердилось мнение, что расщепление пищевых биополимеров катализируется водорастворимыми ферментами и данный

процесс протекает в просвете желудка и тонкого кишечника. Однако оказалось, что не желудок, а поджелудочная железа является главным органом, обеспечивающим синтез и секрецию подавляющего большинства ферментов, необходимых для переваривания пищи. Количество секретируемых гидролитических ферментов составляет около 30 г белка в сутки у взрослого здорового человека. Ферменты поджелудочной железы вместе с желчью изливаются в просвет второй (нисходящей) половины *двенадцатиперстной кишки* так, что большая часть реакций расщепления протекает дистальнее этого места – в тонком кишечнике. Известно, что ферменты, продуцируемые поджелудочной железой, не могут полностью расщепить питательные вещества до состояния, в котором они могут всосаться. Даже после длительного контакта белков и углеводов с ферментами поджелудочной железы существенная часть сахаров и аминокислот присутствует в виде димеров, тримеров и олигомеров, конечное расщепление которых зависит от энзимов, действующих на поверхности тонкого кишечника, т. е. в пределах главных обкладочных клеток эпителия – *энтероцитов*.

Обращенные к просвету кишечника поверхности плазматических мембран *энтероцитов* сильно увеличены за счет множества регулярно расположенных выступов диаметром 100 нм, называемых *микроворсинками*, которые имеют вид *щетки* и образуют *щеточную каемку* на полюсном (апикальном) полюсе энтероцитов (рис. 1.1). Эти пальцевидные выросты плазматической мембраны эпителиальных клеток кишечника сильно увеличивают ее поверхность и, следовательно, скорость поступления мономеров в клетку. Внешние плазматические мембраны энтероцитов содержат многочисленные ферменты – ди- и олигосахаридазы, amino- и дипептидазы, а также эстеразы, которые и обеспечивают окончательное расщепление димеров и олигомеров сахаров и аминокислот до мономеров (табл. 1.2).

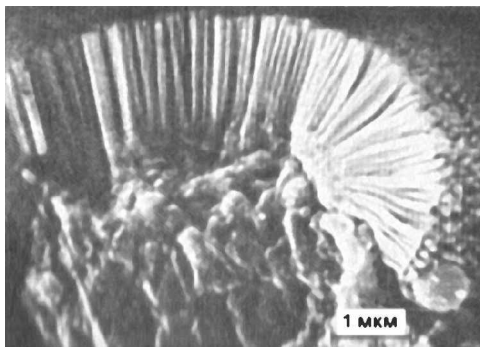


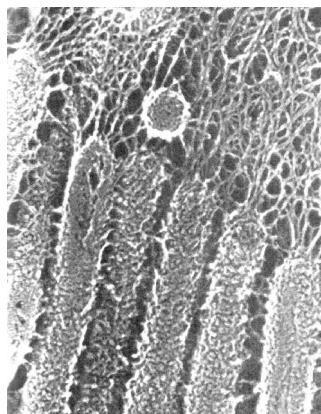
Рис. 1.1. Микрофотография щеточной каемки, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Хорошо видно, насколько велика площадь поверхности, через которую происходит всасывание продуктов пищеварения [17, с. 746]

Таблица 1.2. Субстратная специфичность ферментов энтероцитов

Фермент (тривиальное название)	Субстрат
Мальтаза	Мальтоза
Сахараза	Сахароза
Глюкоамилаза	Амилоза
β -глюкозидаза	Глюкозилцерамид
Эндопептидаза 24.11	Расщепление внутренних пептидных связей по гидрофобным аминокислотам
Аминопептидаза N	Олигопептид с нейтральной N-концевой аминокислотой
Аминопептидаза A	Олигопептид с кислой N-концевой аминокислотой
Дипептидиламинопептидаза IV	Олигопептиды с X-Pro или X-Ala на N-конце
γ -Глутамилтрансфераза	Глутатион + аминокислота
Энтеропептидаза (энтерокиназа)	Трипсиноген

Многие из этих ферментов выступают из мембраны в полость кишечника примерно на 100 Å, удерживаясь в плазматической мембране за счет полипептидного «якоря», который сам по себе не принимает участия в каталитическом акте. Субстратами этих ферментов служат продукты гидролиза белков и углеводов, образующиеся под действием ферментов поджелудочной железы. Энзимы плазматической мембраны энтероцитов относятся к классу *гликопротеидов*, которые достаточно устойчивы к действию протеолитических и липолитических ферментов поджелудочной железы и действию детергентов. Совокупность гидролитических ферментов на поверхности микроворсинок формирует так называемый *гликокаликс*, который хорошо различим на электронных микрофотографиях (рис. 1.2).

Рис. 1.2. Гликокаликс на поверхности микроворсинок эпителиальных клеток тонкого кишечника (выявлено методом глубокого протравливания). Поверхность каждой микроворсинки покрыта серией выпуклостей, которые, как полагают, представляют собой интегральные белки. Гликокаликс, покрывающий верхушки микроворсинок, состоит из сети гликопротеидов и пищеварительных ферментов [18]



Следующим местом переваривания питательных веществ является цитоплазма энтероцитов. Внутриклеточное пищеварение в энтероцитах имеет определенное значение в основном для гидролиза ди- и трипептидов, которые способны проникать через плазматическую мембрану этих клеток.

Пищеварительные ферменты секретируются в виде зимогенов

Слюнные железы, слизистая оболочка желудка и поджелудочная железа содержат специализированные клетки, предназначенные для синтеза, «упаковки» в везикулы и выброса ферментов в просвет желудочно-кишечного тракта. Такой способ секреции называют *экзокринным* вследствие того, что выделение определенных продуктов биосинтеза осуществляется не в кровь, а непосредственно в полость соответствующего органа пищеварения (рис. 1.3).

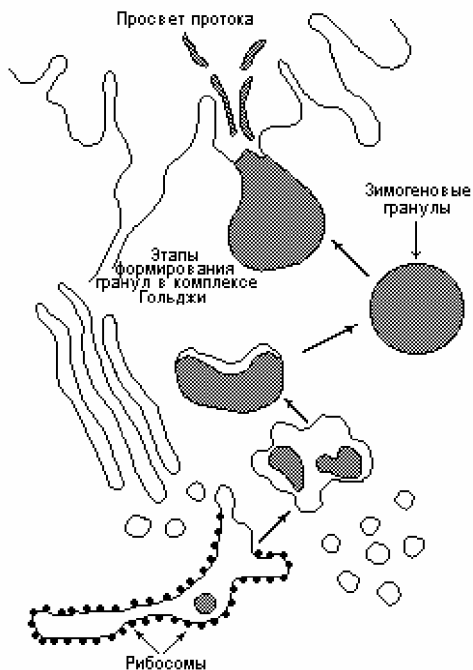


Рис. 1.3. Схематическое изображение процесса секреции проферментов (зимогенов) ацинарной клеткой поджелудочной железы (по рисунку G. Palade из [1, т. 2])

Белки, предназначенные для секреции, синтезируются на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), который особенно развит в таких экзокринных клетках. N-концевые аминокислотные

участки синтезируемых секреторных белков содержат специфические сигнальные последовательности, которые обеспечивают закрепление рибосом на мембранах ЭПР посредством «протаскивания» N-конца белка через мембрану во внутривезикулярное пространство эндоплазматического ретикула. Аминокислоты, формирующие сигнальную последовательность, могут быть обрезаны при последующем процессинге. Секреторные белки затем транспортируются от эндоплазматического ретикула в комплекс Гольджи в составе небольших мембранных везикул. В цистернах эндоплазматического ретикула и в аппарате Гольджи происходит гликозилирование многих белков под действием фермента *гликозилтрансферазы*.

Впоследствии секреторные белки упаковываются в более крупные везикулы диаметром приблизительно 1 мкм, которые выполняют функцию контейнера до получения клеткой сигнала к секреции. Различные протеазы, фосфолипаза А и другие гидролазы образуются и хранятся в форме неактивных предшественников, называемых *проэнзимами*, или *зимогенами*. Поэтому такие везикулы-контейнеры называют *зимогеновыми гранулами*, которые отграничены типичной клеточной мембраной, имеющей трехслойное строение, хорошо видимое с помощью электронного микроскопа высокого разрешения.

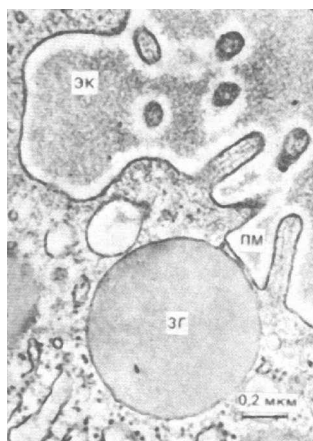


Рис. 1.4. Экзоцитарное выделение секреторных гранул в экзокринной части поджелудочной железы. Зимогеновая гранула (ЗГ) приближается к внутренней поверхности плазматической мембраны (ПМ). Соединение двух мембран в результате цисслияния приводит к образованию экзоцитарной инвагинации (ЭК) [19, с. 106]

Когда клетка получает соответствующий сигнал, гранулы перемещаются к плазматической мембране, сливаются с ней и содержимое везикул в ходе *экзоцитоза* изливается в просвет желудочно-кишечного

тракта (рис. 1.4). Активация зимогенов происходит только после их высвобождения из клетки.

Регуляция секреции осуществляется под действием секретогенных соединений

Процессы секреции ферментов и электролитов тонко и координированно регулируются. Физиологическая регуляция секреции осуществляется с помощью секретогенных соединений, которые взаимодействуют с соответствующими рецепторами на базальной стороне экзокринных клеток. В роли таких стимулирующих соединений могут выступать гормоны, нейромедиаторы, соединения фармакологического назначения, а также некоторые бактериальные токсины. Как правило, различные экзокринные клетки характеризуются различным набором рецепторов. Взаимодействие секретогенных соединений с соответствующими рецепторами инициирует целую цепь событий, которые завершаются слиянием внутриклеточных мембран зимогеновых гранул с плазматическими мембранами клеток, что приводит к выбросу гранулярного содержимого во внеклеточное пространство. В настоящее время достаточно подробно изучены два главных сигнальных пути (рис. 1.5).

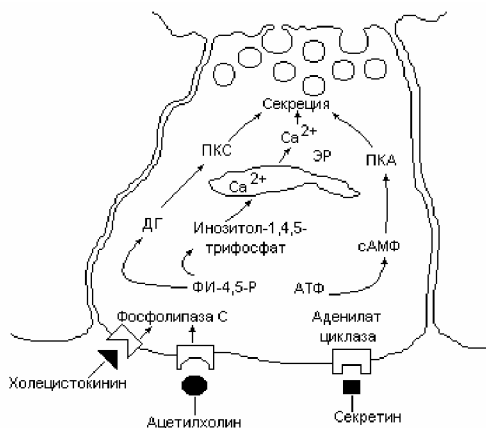


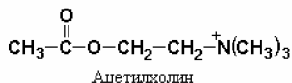
Рис. 1.5. Клеточная регуляция экзокринной секреции в клетках поджелудочной железы: ЭР – эндоплазматический ретикулум; ДГ – диацилглицерол; ПКС – протеинкиназа С; ПКБ – протеинкиназа В; ФИ-4,5-Р₂ – фосфатидинозитол-4,5-дифосфат [20]

Первый из них заключается в активации фосфатидинозитолспецифичной фосфолипазы С, под действием которой образуется инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол. Последние, в свою очередь, запускают высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула в цитоплазму (инозитол-1,4,5-трифосфат) или активируют протеинкиназу С (диа-

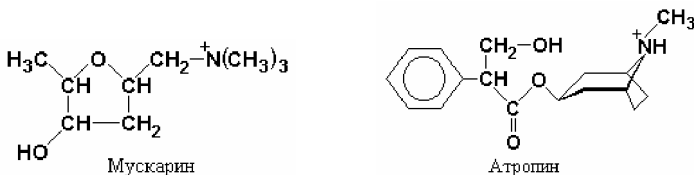
цилглицерол) соответственно. Другой сигнальный путь заключается в активации аденилатциклазы, что обеспечивает повышение уровня циклического АМР, усиливающего активность протеинкиназы А. Различные секретогенные соединения активируют один из этих сигнальных путей.

Всю совокупность секретогенных веществ принято разделять на три класса.

К *первому классу* относят *ацетилхолин*, который стимулирует секрецию слюнных желез, секрецию ферментов желудка и поджелудочной железы, а также секрецию электролитов.

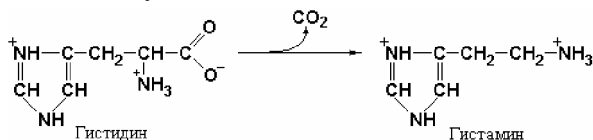


Ацетилхолин, вероятно, является главным нейромедиатором, стимулирующим процессы секреции. Ацетилхолиновые рецепторы экзокринных клеток относятся, как известно, к рецепторам мускаринового типа вследствие того, что они блокируются атропином.



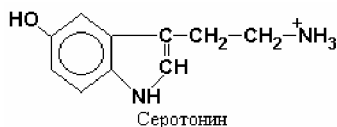
Этот блокирующий эффект атропина большинство людей испытало на себе. В стоматологических кабинетах дантисты часто используют данный блокатор для «высушивания» полости рта в процессе лечения зубов.

Второй класс секретогенных соединений включает некоторые *биогенные амины*. Одним из таких хорошо известных биогенных аминов является *гистамин*, служащий мощным стимулятором секреции HCl обкладочными клетками желудка.



Этот амин взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами в желудке, называемыми H₂-рецепторами, которые расположены на базальной стороне плазматической мембраны обкладочных клеток. До сих пор не существует единого мнения относительно того, какие клетки продуцируют *гистамин*, участвующий в регуляции секреции HCl. В клинической практике этот биогенный амин и многие его аналоги, действующие как антагонисты гистамина, используются для коррекции у пациентов в зависимости от конкретной ситуации, скорости продукции HCl.

Еще одним биогенным амином, присутствующим в довольно больших количествах в желудочно-кишечном тракте, является 5-гидрокситриптамин (серотонин).



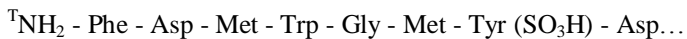
Предполагается, что серотонин принимает участие в процессах продукции NaCl клетками слизистой оболочки тонкого кишечника.

К *третьему классу* секретогенных веществ относятся специфические «пищеварительные» пептидные гормоны. В желудочно-кишечном тракте присутствуют многочисленные специализированные эпителиальные клетки, содержащие большие количества биологически активных аминов или пептидов. «Пищеварительные» пептидные гормоны локализованы в особых гранулах, обычно расположенных близко к базальному полюсу этих клеток, и выбрасываются непосредственно в кровь. Наиболее важными секретогенными соединениями, относящимися к третьему классу, являются *гастрин*, *холецистокинин (панкреозимин)* и *секретин*.

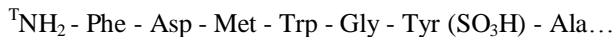
Гастрин существует главным образом в двух формах – в виде длинного пептида из 34 аминокислотных остатков (G-34-II) или короткого пептида из 17 аминокислотных остатков (G-17-II), который является C-концевым фрагментом G-34-II. Кроме фракции гастринина, состоящей из пептидов G-34-II и G-17-II, в организме присутствует также гастрин G-I, который отличается отсутствием остатка серной кислоты по тирозину, характерному для гастринина G-II. Присутствие сульфатированного тирозина значительно повышает эффективность действия гастринина. Функциональная активность гастринина принадлежит последним пяти аминокислотным остаткам на C-конце молекулы. Синтезированный химическим путем пентапептид содержащий только эти пять аминокислот, используется в клинической практике для специфической стимуляции секреции HCl и пепсина.

Термины *холецистокинин* и *панкреозимин* относятся к одному и тому же пептиду. Различные его названия указывают на разные активности, проявляемые пептидом, и эти названия были даны до разработки эффективных методов очистки пептида до гомогенного состояния, которые впоследствии показали, что речь идет об одном и том же полимере. Данный «пищеварительный» гормон обеспечивает сокращение желчного пузыря (холецистокининовая активность), а также стимулирует секрецию ферментов поджелудочной железы (панкреозиминовая активность). *Холецистокинин* выделяется эпителиальными эндокринными клетками тонкого кишечника. Особенно интенсивная секреция характерна для двенадцатиперстной кишки, и эта секреция стимулируется присутствием аминокислот и пептидов, образованных в результате первичного протеолиза

пищевых белков под действием пепсина, а также стимулируется свободными жирными кислотами и кислым значением рН. Полагают, что холецистокинин и гастрин в эволюционном смысле являются родственными пептидами вследствие того, что имеют на С-концах весьма сходные аминокислотные последовательности:



Холецистокинин

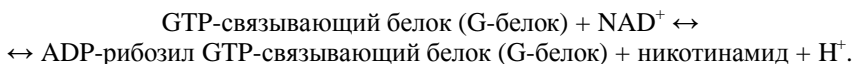


Гастрин

NH_2 -Phe – амид С-концевой аминокислоты фенилаланина.

Секретин представляет собой полипептид, состоящий из 27 аминокислот. Этот пептид выделяется особыми эндокринными клетками тонкого кишечника. Увеличение его секреции в значительной степени стимулируется значениями рН в просвете кишечника ниже 5. Главная биологическая активность секретина связана с выделением поджелудочной железой пищеварительного сока, обогащенного бикарбонатом натрия (NaHCO_3). Продуцируемый поджелудочной железой NaHCO_3 необходим для нейтрализации желудочного сока, поступающего в двенадцатиперстную кишку. Секретин также является синергистом панкреозимина, обеспечивающим дополнительную стимуляцию секреции панкреатических пищеварительных ферментов.

Токсин патогенного микроорганизма *Vibrio cholerae* действует в обход рецепторов и становится секретогенным соединением, катализируя ADP-рибозилирование GTP-связывающего белка (G-белка), который в свою очередь обеспечивает стимуляцию аденилатциклазы:



Транспорт растворенных веществ может происходить между эпителиальными клетками и через клетки эпителия тонкого кишечника

Движение растворенных веществ через слой эпителиальных клеток тонкого кишечника определяется уникальными свойствами этих клеток, особенно свойствами их плазматических мембран, а также комплексами, определяющими межклеточные взаимодействия. *Область плотных контактов* простирается вокруг периметра каждой клетки наподобие опоясывающей зоны и соединяет смежные клетки. Таким образом, *область плотных контактов* представляет собой часть барьера между двумя внеклеточными пространствами на каждой стороне эпителия, т.е. между просветом желудочно-кишечного тракта и интерстициальным пространством с другого полюса эпителиальных клеток. Область плотных контак-

тов также разграничивает полостную и базальную части плазматической мембраны эпителиальных клеток (рис. 1.6).

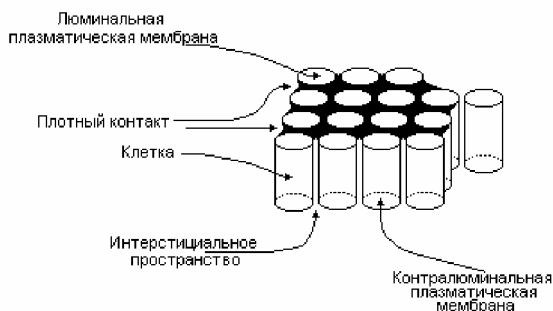


Рис. 1.6. Область плотных контактов простирается вокруг периметра каждой клетки наподобие опоясывающей зоны и соединяет смежные клетки

В принципе существуют два альтернативных пути переноса растворенных веществ через слой эпителиальных клеток – это трансцеллюлярный транспорт (перенос веществ через клетки) и парацеллюлярный путь, осуществляющийся через *плотный контакт* между клетками (рис. 1.7).

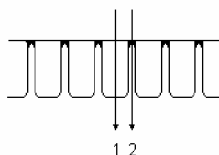


Рис. 1.7. Схема путей транспорта веществ через слой эпителиальных клеток тонкого кишечника: 1 – трансцеллюлярный перенос; 2 – парацеллюлярный перенос

Трансцеллюлярный перенос веществ связан с преодолением как минимум двух барьеров, образованных люминальной (обращенной к полости кишечника) и базальной частями плазматической мембраны эпителиальных клеток. Вследствие такой сложной комбинации различных барьеров на пути всасывания питательных веществ для понимания транспортных свойств эпителия в целом необходимо рассмотрение биохимических и биофизических аспектов процесса, а также вопросов, связанных с взаимным влиянием одних барьеров на другие.

Одна из главных функций эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта состоит в активном транспорте питательных веществ, электролитов и витаминов с одной стороны эпителия на другую. Молекулярно-клеточные основы такого направленного движения растворенных в воде веществ должны заключаться в различных свойствах люминальной и контралюминальной (апикальной и базальной) областей плаз-

матической мембраны эпителиальных клеток. Клетки тонкого кишечника демонстрируют замечательный пример дифференциации и специализации двух типов мембран в составе одной клетки (табл. 1.3).

Апикальные и базальные области плазматических мембран существенно различаются по морфологии (внешнему виду), ферментному составу, химическому составу и транспортным функциям.

Таблица 1.3. Ферменты и транспортные системы апикальной и базальной сторон плазматической мембраны энтероцитов

Ферменты и транспортные системы	Апикальная сторона	Базальная сторона
Внешний вид	Многочисленные микроворсинки, образующие щеточную каемку	Очень немногочисленные микроворсинки
Ферменты	Ферменты, расщепляющие ди- и олигосахариды, аминопептидаза, дипептидаза, γ -глутамилтрансфераза, щелочная фосфатаза и др.	Na^+ , K^+ - АТРаза, аденилатциклаза
Транспортные системы	Na^+ -зависимый транспорт моносахаридов, нейтральных аминокислот, желчных кислот	Облегченный транспорт моносахаридов и нейтральных аминокислот

Апикальная поверхность плазматической мембраны находится в контакте с хилусом (полужидкой массой частично переваренной пищи) и обеспечивает окончательное переваривание питательных веществ с помощью «встроенных» в эту мембрану пищеварительных ферментов. Кроме того, апикальная поверхность связана с процессом всасывания питательных веществ с участием собственных систем транспорта, которые осуществляют концентрирующее поглощение этих веществ. Такие транспортные системы моносахаридов, аминокислот, пептидов и электролитов довольно хорошо изучены.

С другой стороны, базальная область плазматической мембраны, которая контактирует с интерстициальной жидкостью, капиллярами и лимфой, имеет свойства, сходные со свойствами большинства клеток. Она включает рецепторы гормональной и нейрональной регуляции клеточных функций, Na^+ , K^+ -АТРаза для удаления Na^+ из клеток и транспортные системы поступления питательных веществ как в кровь, так и для нужд самих энтероцитов. Следовательно, базальная часть мембраны содержит транспортные системы, необходимые для вывода питательных веществ, поглощенных из хилуса, чтобы они стали доступными для всех клеток организма. Некоторые транспортные системы базальной части мембраны могут катализировать как вывод питательных веществ из энтероцитов при повышении их внутриклеточной концентрации в результате приема пищи, так и их поступление в клетку, когда уровень питательных веществ в крови превышает внутриклеточный уровень.

Всасывание и секреция электролитов

Транспорт ионов Na^+ не только играет важнейшую роль в процессах всасывания или секреции NaCl , но и принимает участие в функционировании механизмов, обеспечивающих поступление питательных веществ в эпителиальные клетки. Движущей силой транспорта ионов Na^+ является Na^+, K^+ -АТРаза, локализованная исключительно в базальной части плазматической мембраны энтероцитов. Na^+, K^+ -АТРазная реакция протекает в следующей стехиометрии: при гидролизе 1 моля АТФ происходит выталкивание из клетки 3 молей Na^+ с одновременным поглощением 2 молей K^+ . Таким образом, данный фермент поддерживает высокую концентрацию K^+ в цитозоле и низкую концентрацию Na^+ , тем самым прямо или косвенно формируя электрохимический потенциал, составляющий около -60 mV в цитоплазме относительно внеклеточного раствора (рис. 1.8).

Трансэпителиальный перенос NaCl осуществляется за счет комбинации действия Na^+, K^+ -АТРазы и «пассивных» транспортных систем в плазматической мембране, которые обеспечивают поступление Na^+ и Cl^- в клетку.

Всасывание NaCl связано с поступлением Na^+ в клетку через апикальную область плазматической мембраны и его выталкиванием из клетки под действием Na^+, K^+ -АТРазы.

Этот процесс протекает в эпителиальных клетках верхнего отдела кишечника, которые обладают особой транспортной системой, локализованной в мембранах *щеточной каемки*. Данная транспортная система катализирует электростатически нейтральный обмен ионов Na^+ и H^+ (рис. 1.9).

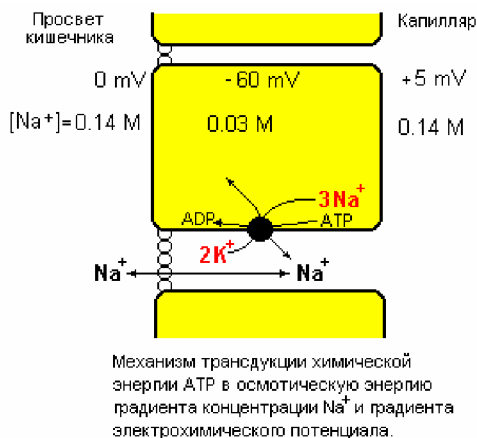


Рис. 1.8. Формирование электрохимического потенциала в энтероцитах [20]

Поглощение ионов Na^+ энтероцитами в свою очередь инициирует всасывание Cl^- за счет специфического обмена ионов Cl^- и HCO_3^- в апикальной части плазматической мембраны, как показано на рис. 1.9. В це-

лом верхние отделы кишечника участвуют не только в поглощении NaCl пищи, но и в процессах реабсорбции NaCl, секретируемого клетками экзокринных желез после каждого приема пищи.

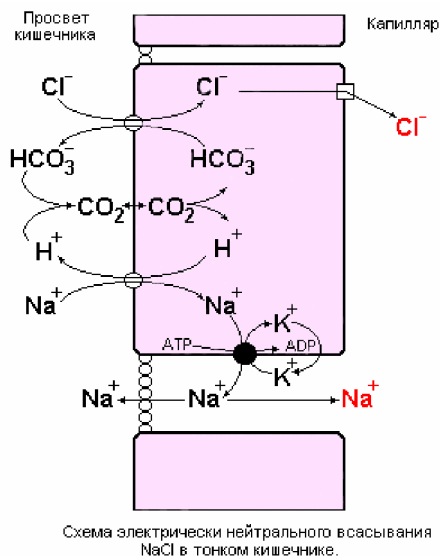


Рис. 1.9. Модель электрически нейтрального всасывания NaCl в тонком кишечнике [20]

Как известно, эпителиальные клетки большинства отделов желудочно-кишечного тракта способны также секретировать электролиты и пищеварительные соки (жидкости). Основными секретируемыми ионами опять же являются ионы Na^+ и Cl^- . Выделение воды, являющейся растворителем компонентов пищеварительных соков, происходит пассивно и зависит от осмотических сил, возникающих при секреции растворимых в воде веществ. Следовательно, выделение NaCl способствует секреции водной фазы.

Механизмы секреции NaCl также тесно связаны с активностью Na^+, K^+ -АТФазы, локализованной в базальной части мембраны. Участие Na^+, K^+ -АТФазы в секреции NaCl доказано с помощью ингибиторного анализа *in vitro*. Известно, что сердечные гликозиды являются сильными ингибиторами данного фермента. Добавление сердечных гликозидов существенно снижает секрецию клетками хлорида натрия. Однако участие Na^+, K^+ -АТФазы в секреции NaCl, т. е. в движении данного электролита с капиллярной стороны клеток эпителия на противоположную (полостную) сторону, с трудом поддается логическому объяснению, так как в норме Na^+, K^+ -АТФаза выталкивает ионы Na^+ из клеток именно на капиллярную сторону. Это должно означать, что активный транспорт Na^+ через плазматические мембраны при его секреции имеет направление, противоположное трансэпителиальному потоку NaCl при его всасывании.

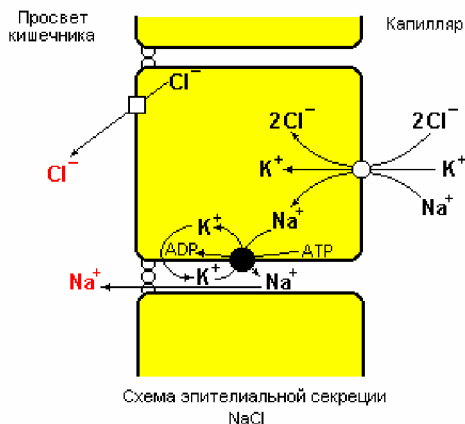
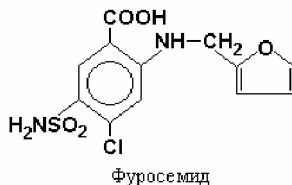


Рис. 1.10. Модель эпителиальной секреции NaCl [20]

Данный парадокс с успехом разрешается, если иметь в виду, что в этом случае направление движения ионов Na^+ связано и зависит от секреции ионов Cl^- через апикальную поверхность плазматической мембраны. Кроме того, было обнаружено, что ионы Na^+ могут использовать для выхода в полость кишечника путь через плотный контакт (рис. 1.10). Таким образом, проницаемость *плотного контакта* для H_2O , Na^+ и других ионов видоизменяет активный трансэпителиальный поток растворимых веществ.

В свою очередь процесс секреции Cl^- зависит от сопряженного поглощения клетками двух ионов Cl^- и ионов Na^+ и K^+ с помощью специфического переносчика на базальной части мембраны и от функционирования специфических каналов для Cl^- на апикальной части мембраны. Переносчик ионов Na^+ , K^+ и 2Cl^- идентифицируется специфическим ингибитором – общеизвестным диуретиком фуросемидом.



Этот переносчик использует энергию градиента Na^+ для накопления в цитоплазме ионов Cl^- . Впоследствии открывание каналов для Cl^- обеспечивает его выброс в полость кишечника. В поджелудочной железе за образование секрета, содержащего высокие концентрации ионов Na^+ и Cl^- , отвечают так называемые ацинарные клетки. Этот секрет способствует переносу пищеварительных ферментов из *ацинуса*, где они выделяются, в полость двенадцатиперстной кишки.

По мере продвижения секрет обогащается в протоках выделяющимся бикарбонатом натрия (NaHCO_3). Концентрация HCO_3^- в конечном панкреатическом соке может достигать величины, равной 120 мМ. На рис. 1.11 показана схема эпителиальной секреции NaHCO_3 . Высокая проницаемость плотного контакта необходима для того, чтобы внеклеточная концентрация Na^+ уравнивалась с внутриклеточной и полостной

концентрацией Na^+ во время секреции NaCl и NaHCO_3 . Следует обратить внимание на то, что в процесс продукции поджелудочной железой NaHCO_3 включается специфическая H^+ -АТРаза, выталкивающая протоны (H^+) на базальную сторону плазматической мембраны клетки. Удаление протонов из клетки сопровождается электростатически нейтральным обменом Na^+/H^+ через эту же мембрану.

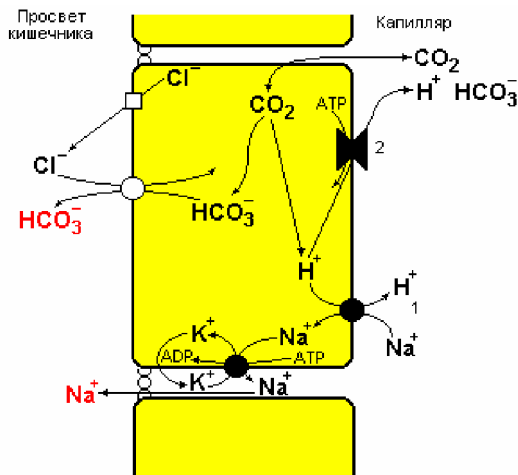


Схема процесса секреции NaHCO_3 эпителиальными клетками поджелудочной железы.

- 1 - электрохимически нейтральный обмен Na^+/H^+
2 - H^+ -АТРаза

Рис. 1.11. Модель эпителиальной секреции NaHCO_3 : 1 – электрически нейтральный обмен Na^+/H^+ ; 2 – H^+ -АТРаза [20]

У больных холерой под действием кишечной инфекции, вызванной токсином холерного вибриона (*Vibrio cholerae*), отмечается обильная, угрожающая жизни секреция жидкости и электролитов клетками кишечника. Данное состояние (диарея) является результатом действия холерного энтеротоксина, продуцируемого возбудителем. Холерный токсин активирует аденилатциклазу путем АДФ-рибозилирования $G_{\alpha s}$ -белка, принимающего участие в регуляции активности аденилатциклазы, и таким способом «включает» активную секрецию электролитов.

Современный способ лечения холеры основан на оральном введении раствора, содержащего 110 мМ глюкозы, 99 мМ Na^+ , 74 мМ Cl^- , 39 мМ HCO_3^- и 4 мМ K^+ . Данный способ разработан исходя из того факта, что совместный транспорт глюкозы и Na^+ (см. лекцию 6) не зависит от сАМР и аденилатциклазного пути.

Транспортная система, обеспечивающая всасывание глюкозы, при заболевании холерой не страдает. Поэтому данный подход обеспечивает поглощение энтероцитами ионов Na^+ в присутствии глюкозы и восста-

новление в организме потерь NaCl, связанных с болезнью. Основное преимущество предложенного метода терапии холеры состоит в простоте применения и низкой стоимости по сравнению с внутривенным введением жидкости [61].

Секреция соляной кислоты обкладочными клетками желудка

Известно, что обкладочные клетки экзокринных желез желудка вырабатывают соляную кислоту, которая выбрасывается в полость желудка. При этом концентрация протонов (H^+) в полости желудка может достигать значения, равного 0,14 М, что составляет величину рН желудочного сока, равную 0,8. Поскольку величина рН плазмы крови равна 7,4, обкладочные клетки должны переносить протоны против градиента концентрации, разница которой равняется $10^{6,6}$.

В процесс секреции соляной кислоты включается K^+ -зависимая H^+ -АТРаза (K^+, H^+ -АТРаза). Этот фермент является уникальным для обкладочных клеток желудка и локализован только на апикальной стороне плазматической мембраны. K^+, H^+ -АТРаза связывает (сопрягает) процесс гидролиза АТФ с обязательным электростатически нейтральным обменом K^+ и H^+ , продуцируя выброс протонов и поступление ионов K^+ в клетку (рис. 1.12).

В стационарном состоянии HCl может вырабатываться в соответствии с данным механизмом только в том случае, если апикальная часть мембраны проницаема для K^+ и Cl^- , а базальная обеспечивает обмен Cl^- и HCO_3^- . Обмен Cl^- и HCO_3^- необходим для постоянного поступления в клетку ионов Cl^- и для предотвращения защелачивания цитоплазмы. Таким образом, в стационарных условиях секреция HCl в полость желудка должна быть сопряжена с переносом HCO_3^- в плазму крови.

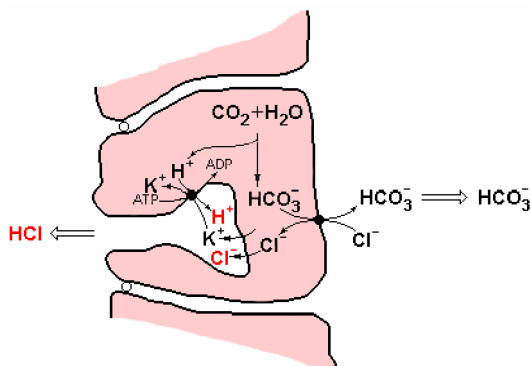


Рис. 1.12. Модель секреции соляной кислоты обкладочными клетками стенки желудка [20]

ЛЕКЦИЯ 2. ОБМЕН БЕЛКОВ. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

В процессах обмена веществ *обмен белков* занимает ведущее место, поскольку мономерные звенья пищевых белков – аминокислоты – в первую очередь служат строительным материалом для любой клетки. Аминокислоты пищевых белков в равной степени необходимы как для продукции пищеварительных ферментов (многочисленные протеиназы желудочно-кишечного тракта, внутриклеточные протеиназы и пептидазы), принимающих участие в процессах переваривания пищи, так и для синтеза пептидных гормонов, осуществляющих тонкую регуляцию функций разных систем организма. Пищевые белки необходимы для последующего синтеза протеинов плазмы крови, которые принимают участие в поддержании *онкотического* (осмотического) баланса, а также для синтеза белков-переносчиков *малых молекул*, в том числе и *сигнальных молекул*. Роль белков в функционировании иммунной системы также сложно переоценить. В целом белки осуществляют все метаболические процессы клетки и всего организма, выполняя уникальные каталитические функции.

Белки как компоненты пищевых продуктов выполняют также энергетическую функцию. Большая часть аминокислот, так называемых *глюкогенных*, превращается в процессе метаболизма в глюкозу. Другая часть аминокислот – *кетогенных* – превращается в оксикислоты и жирные кислоты. Последние служат структурными элементами для синтеза триацилглицеролов, которые накапливаются в адипозной ткани. Однако роль и значение белков в процессах обмена веществ совершенно не определяются их энергетической ценностью. Энергия, получаемая при распаде белка, может быть без всякого ущерба для организма компенсирована энергией распада жиров и углеводов. Важно другое – организм человека и животных не может обходиться без регулярного поступления белков извне. Опыты на лабораторных животных показывают, что даже довольно длительное исключение жиров и углеводов из рациона не вызывает каких-либо тяжелых расстройств метаболизма и, соответственно, не влияет на состояние подопытных животных. Но кормление их в течение нескольких дней пищей, не содержащей белка, приводит к серьезным метаболическим сдвигам, а *продолжительное безбелковое питание* неизбежно заканчивается гибелью животного.

Таким образом, без белка, без составляющих его аминокислот не может быть обеспечено воспроизводство основных структурных элементов клеток, тканей и органов, а также образование ряда важнейших макромолекул, таких как ферменты, пептидные гормоны, иммуноглобулины, транспортные белки и многие другие.

Баланс азота и азотистое равновесие

Основная масса азота в потребляемой пище приходится на долю белков. Результаты многочисленных анализов разных компонентов в продуктах питания на содержание в них азота показывают, что без какой-либо значительной ошибки основное количество этого важнейшего элемента вводится в организм в составе белка. При обмене белков содержащийся в них азот выделяется из организма в виде азотистых веществ, главными из которых являются *мочевина* и *аммиак*.

Для оценки общего состояния обмена белков большое значение приобретает определение *азотистого баланса*, т. е. разницы между количеством азота, введенного в организм с продуктами питания, и количеством азота, выведенного из организма в виде конечных азот-содержащих продуктов обмена. Азотистый баланс может быть *положительным*, равным нулю и *отрицательным*.

Если азота выводится меньше, чем его было введено, т.е. имеет место накопление данного элемента в организме, то в этом случае обмен белков характеризуется *положительным азотистым балансом*. В норме положительный азотистый баланс присущ растущему организму или отмечается у женщин во время беременности. Состояние положительного азотистого баланса можно представить в виде схемы (рис. 2.1).

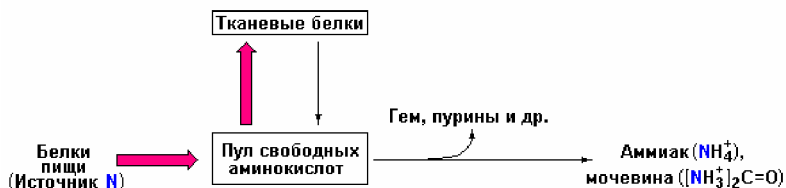


Рис. 2.1. Схема, иллюстрирующая состояние основных метаболических путей, характерных для положительного азотистого баланса в организме млекопитающих и человека [20]

Азотистый баланс может быть равен нулю, если азота выводится из организма столько же, сколько его поступило с пищей. В данном случае принято говорить об *азотистом равновесии*. Взрослый человек находится в состоянии азотистого равновесия, если он получает достаточное количество белка в продуктах питания. При некотором увеличении количества белка в пище соответственно увеличивается и количество экскретируемого азота. При небольшом уменьшении количества вводимого белка уменьшается и количество выведенного азота, но в обоих случаях баланс азота равен нулю.

Если азота выводится из организма больше, чем его было введено, то имеет место *отрицательный азотистый баланс*. Это означает, что в организме происходит процесс распада белков клеток, тканей и органов,

который не компенсируется белками пищи (рис. 2.2). Отрицательный азотистый баланс наблюдается при различных заболеваниях, связанных с усиленным распадом тканевых белков (метаболический стресс), при нехватке в продуктах питания незаменимых аминокислот, а также при белковом голодании.

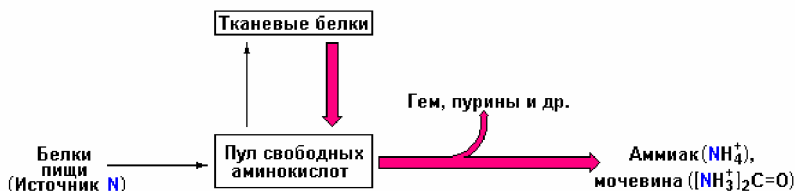


Рис. 2.2. Схема, иллюстрирующая состояние основных метаболических путей, характерных для отрицательного азотистого баланса в организме млекопитающих и человека [20]

Совершенно естественно возникает вопрос о пределах возможного увеличения или уменьшения количества белка в пище. Если кормить подопытных животных таким образом, чтобы полностью покрыть энергетические потребности организма углеводами и жирами, но исключить из рациона белки, то азотистый баланс неизбежно становится отрицательным. Это происходит по той причине, что организм продолжает выделять с мочой азотистые вещества, являющиеся продуктами обмена белков. Поскольку животные не получают белка извне, выделение азотистых веществ указывает на то, что в организме происходит распад белка собственных органов и тканей. Необходимость распада собственных белков при белковом голодании связана с функциональной деятельностью различных органов, а именно: продукцией белоксодержащих секретов эндокринных и экзокринных желез (синтез пептидных гормонов, пищеварительных ферментов), отмиранием и удалением некоторых тканей и образований (рост волос, ногтей, слущивание эпидермиса), разрушением и новообразованием клеток крови, слизистой кишечника и т. д. Естественно, что азотистый баланс при таком рационе все время остается отрицательным, и если эксперимент длится достаточно долго, то это неизбежно приводит к гибели животных.

В медицинской научной литературе имеется описание подобных наблюдений и на людях-добровольцах, которые в течение достаточно продолжительного времени находились на такой диете, включающей крахмал, сахар, жиры и необходимые минеральные добавки. На основании подсчета количества выделяемых при безбелковой диете азотистых веществ было установлено, что взрослый человек после 8–10 дней белкового голодания начинает выделять постоянное количество азота, близкое к 53 мг в сутки на 1 кг веса тела. Для человека со средней массой 70 кг это составляет 3,71 г азота, или 23,2 г белка в сутки. Это минимальное коли-

чество белка (23,2 г), соответствующее экскреции 3,71 г азота, было названо немецким физиологом Максом Рубнером «коэффициентом изнашивания». Следует, однако, иметь в виду, что «коэффициент изнашивания» представляет собой лишь среднестатистическую величину, которая в действительности зависит от ряда конкретных факторов и может существенно отклоняться от приведенных значений.

Нормы белка в питании

В связи со сказанным возникает закономерный вопрос: какое же количество белка должно присутствовать в продуктах питания, чтобы обеспечить сохранение здоровья и нормальную жизнедеятельность организма человека?

Исходя из того, что «коэффициент изнашивания» у взрослого человека составляет около 23 г белка в сутки, казалось бы достаточным введение в организм именно этого количества протеина, что обеспечивало бы покрытие расхода белков, связанного с их распадом в органах и тканях. Однако, как было показано, азотистое равновесие устанавливается при гораздо больших количествах белка в пище, чем этого требует «коэффициент изнашивания». В среднем азотистое равновесие устанавливается у человека при употреблении не менее 30–45 г белка в сутки. Это минимальное содержание, необходимое для поддержания азотистого равновесия при условии полной компенсации энергетических потребностей организма, получило название «физиологический минимум белка».

Возможность достижения азотистого равновесия у человека при потреблении 30–45 г белка в сутки послужила обоснованием для рекомендаций, высказываемых некоторыми учеными о допустимости пользования низкими нормами белка в питании. Однако неполноценная диета может казаться безвредной лишь в определенные промежутки времени. Часто неполноценность той или иной диеты сказывается лишь на потомстве. Поэтому речь должна идти не о голодной норме белка в питании человека, а об оптимальном его содержании в рационе.

В частности, по данным Департамента продовольствия и питания Национальной академии наук США, пересмотренным в 1989 году, рекомендованное количество белка в продуктах питания должно составлять 58–66 г/сут. для мужчин и 44–50 г/сут. для женщин.

Рекомендованное количество белка в диете, обоснованное российскими врачами-диетологами, составляет около 100 г/сут. в умеренном климате и не менее 120 г/сут. в жарком климате. Указанные нормы белка рекомендованы людям, занимающимся в первую очередь умственным трудом или полностью механизированным физическим трудом.

Одним из проявлений неправильного, несбалансированного по белку и энергетическим потребностям питания является истощение или, как его еще называют, *маразм*. Истощение вызывается хроническим недостатком калорий в пище у детей. Это заболевание развивается у грудных

детей после перехода от кормления их грудным молоком на искусственную пищу, приготовленную из злаковых и других растений и содержащую, как правило, мало калорий и неполноценный растительный белок. Для состояния *маразма* характерна задержка роста, резко выраженная атрофия мышечной системы, общая слабость и анемия. Недостаточное поступление пищевых белков в раннем детстве, даже если оно впоследствии компенсируется нормальной диетой, приводит в любом случае к отставанию в физическом и умственном развитии.

Данные проявления недоедания особенно характерны для развивающихся стран, где чаще всего от этого страдают дети и подростки. Смертность детей из-за неполноценного питания в странах с нехваткой продовольствия очень велика – более половины из них не доживает до 5-летнего возраста. Маразм – это одно из проявлений большого числа заболеваний, главной причиной которых следует считать не столько общий недостаток продуктов питания, сколько их несбалансированность по полноценному белку.

Другим проявлением неправильного питания является *квашиоркор* (*kwashiorkor*), которое определяется как неадекватное употребление белковой пищи при нормальном энергетическом балансе. Название заболевания произошло от африканского слова, в переводе означающего «отнимание от груди». В слаборазвитых странах детей кормят грудным молоком сравнительно долго, однако, когда их отнимают от груди (причиной этого служит обычно появление следующего ребенка), дети начинают получать пищу с недостаточным количеством белка. Квашиоркор характеризуется обманчивым упитанным внешним видом, который обусловлен в первую очередь отеком. Их ткани из-за сниженного количества белков в плазме крови раздуваются и становятся отечными, вследствие чего нарушается нормальное распределение воды между кровью и тканями. Дегенеративные процессы развиваются также в печени, почках и в поджелудочной железе. Другими проявлениями заболевания являются сухость и ломкость волос, диарея, различные формы дерматита, задержка роста и умственного развития.

Наиболее выраженным следствием нехватки белка в продуктах питания у детей, страдающих квашиоркором, является сильно сниженная способность организма противостоять инфекциям. Эти дети имеют резко сниженное количество Т-лимфоцитов, а также страдают от дефектов, связанных с генерацией фагоцитов и продукцией иммуноглобулинов, интерферона и других компонентов иммунной системы.

Говоря о необходимости поддерживать достаточное количество белков в рационе, не следует, однако, забывать и о том, что избыточное содержание белка в продуктах питания имеет свои отрицательные стороны.

Например, в США большинство населения употребляет белок в количествах гораздо больших, чем это необходимо для поддержания азотистого баланса. Средний американец потребляет 99 г белка, 68 % которого

приходится на долю продуктов животного происхождения. Многочисленные исследования показывают, что здоровый взрослый человек может употреблять такое количество белка без особого вреда для здоровья. Однако исследования, проведенные в последнее время, дают доказательства того, что высокое содержание белка в рационе может служить причиной нарушения обмена кальция (Ca^{+2}) в организме. В некоторых работах приводятся данные, свидетельствующие о том, что повышенное содержание белка в пище вызывает увеличение потерь кальция, который выводится почками, что в свою очередь сильно ускоряет процесс деминерализации костей с возрастом.

С другой стороны, более серьезные клинические проблемы могут возникать при одновременно высоком содержании в пище как белка, так и высококалорийных компонентов. Наиболее часто встречающимся заболеванием, вызванным неправильным избыточным питанием, является *ожирение*. Биохимические механизмы предрасположенности к ожирению все еще не до конца ясны, но большинство исследователей придерживается мнения, что такие нарушения метаболизма являются результатом расстройств *термопродукции*. Обычно избыточное употребление высококалорийной пищи приводит к тому, что часть калорий превращается в тепло, а не запасается в виде жира. Этот процесс называется *индуцированной диетой термогенезом*. Существует предположение, что употребление высококалорийной пищи способствует гиперпродукции инсулина, который при участии симпатической нервной системы стимулирует метаболические процессы, обеспечивающие рассеивание энергии в виде тепла. У грызунов – крыс и мышей – за регуляцию теплопродукции отвечает специализированная адипозная ткань, называемая *бурым жиром*. У человека эта адипозная ткань дает незначительный вклад в теплопродукцию, а основным местом термогенеза является скелетная мускулатура. При склонности к ожирению у отдельных людей наблюдается не теплопродукция, а эффективное превращение калорий в жир. Хотя, как отмечалось ранее, биохимические механизмы теплопродукции в тканях-мишенях и их регуляция до сих пор не до конца выяснены – все же имеется предположение, что речь может идти о нарушении функционирования *холостных циклов*.

Биологическая ценность белков

Весьма важно, что распад тканевых белков при отсутствии или ограничении белка в продуктах питания можно снизить, если в рацион ввести некоторое количество *полноценного белка*, или так называемых *незаменимых аминокислот* [21, 22]. Незаменимые аминокислоты при этом способствуют вовлечению в ресинтез белка заменимых аминокислот, сберегая тем самым часть тканевых белков. Хорошо известно, что в ряде случаев врачи-диетологи вынуждены предлагать пациентам различные виды диеты, содержащие очень небольшое количество белка.

Одним из таких патологических состояний является *хроническая почечная недостаточность*, которая характеризуется накоплением в организме конечных продуктов катаболизма белков, главным образом мочевины. В этом случае необходимо ограничение белка в диете, поскольку образующиеся конечные токсические продукты в первую очередь ответственны за клиническое проявление *почечной недостаточности*. Очень легко поддерживать пациентов в состоянии азотистого равновесия в течение длительного времени, если их диета включает минимальное количество белка, равное 40 г/день.

Однако диеты, содержащие более низкие количества белка, ставят ряд проблем. Одна из них заключается в тонком балансировании между количеством белка, достаточном для того, чтобы избежать отрицательного азотистого баланса, но настолько малом, чтобы предотвратить накопление продуктов распада [23]. Основными параметрами такой диеты являются необходимые количества полноценного белка и достаточное количество углеводов и жиров для восполнения ежедневных энергетических потребностей. Существенный момент – присутствие незаменимых аминокислот для поддержания положительного азотистого баланса; с другой стороны, организм должен быть в состоянии синтезировать заменимые аминокислоты из других азот-содержащих метаболитов; и, наконец, диета должна включать углеводы и жиры, которые позволяют сберечь белки пищи от энергетического метаболизма в ущерб пластическому обмену. При тщательном подходе к составлению подобных диет удастся снизить количество белка в продуктах питания до 20 г/сут.

Для удовлетворения потребностей организма в протеине существенным является не только количество, но и *качество* белков в составе пищи. Различные белки, как известно, отличаются процентным содержанием отдельных аминокислот. Поэтому в зависимости от *аминокислотного состава* для покрытия потребности в белке одного белка нужно больше, а другого меньше. В этом смысле большое значение приобретает *биологическая ценность белков*, которая определяется также *степенью его усвоения* организмом.

Биологическая ценность того или иного белка тем выше, чем ближе его аминокислотный состав к составу белков данного организма. В тесной связи с вопросом о биологической ценности белка находится представление о так называемых *жизненно необходимых (незаменимых аминокислотах)*. В экспериментах на лабораторных животных потребность в белках обеспечивалась добавлением смесей чистых аминокислот, из которых исключалась та или иная аминокислота. На основании оценки состояния животного делали выводы о значении исследуемых аминокислот для роста и развития животных. Было показано, что для нормального роста крыс необходимо 10 незаменимых аминокислот. Дальнейшие эксперименты в этом же направлении свидетельствовали, что наличие незаменимых аминокислот имеет также непосредственное отношение к под-

держанию азотистого баланса. Отсутствие в пище любой из незаменимых аминокислот приводит к отрицательному азотистому балансу. Следует, однако, иметь в виду, что механический перенос результатов экспериментов с одного вида животных на другие недопустим. Например, аминокислота глицин не является незаменимой для крыс, но незаменима для цыплят. Различные результаты были получены также на собаках и крысах.

Изучение азотистого обмена у взрослых здоровых людей, которым пищевой белок в рационе заменяли равноценным количеством смеси свободных аминокислот, позволило сделать вывод о том, что человеку для сохранения *азотистого равновесия, поддержания массы тела, трудоспособности и удовлетворительного самочувствия* необходимо присутствие в пище *девяти* аминокислот: *триптофана, фенилаланина, лизина, гистидина, треонина, метионина, лейцина, изолейцина и валина*. Суточная потребность в незаменимых аминокислотах варьирует от 0,5 г (для триптофана) до 2,0 г (для лейцина, фенилаланина и метионина) (табл. 2.1).

Новорожденным и детям для роста необходима еще одна, десятая, аминокислота – *аргинин*. У взрослых людей аргинин образуется в достаточных количествах в печени при функционировании цикла мочевинообразования (или, как его еще называют, орнитинового цикла), однако детскому организму для одновременного синтеза мочевины и синтеза белков аргинина не хватает вследствие еще недостаточно четкого функционирования цикла мочевинообразования.

Таблица 2.1. Незаменимые аминокислоты

Аминокислота, г		Аминокислота, г	
Аргинин*	0	Метионин	2,02
Гистидин**	-	Фенилаланин	2,02
Изолейцин	1,30	Треонин	0,91
Лейцин	2,02	Триптофан	0,46
Лизин	1,50	Валин	1,50

* – необходим только новорожденным и детям для роста

** – незаменимая аминокислота, но точная суточная пока не определена

Питательные свойства белков можно оценить с помощью двух характеристик – *химической* и *биологической ценности*. В первом случае белок подвергают полному гидролизу, определяют его аминокислотный состав и сравнивают с аминокислотным составом стандартного белка, полученного, например, из молока или яиц. Этот способ дает возможность оценить его потенциальную химическую ценность. Мерой *биологической ценности* белка служит величина, обратно пропорциональная количеству данного белкового продукта, которое необходимо для поддержания азотистого равновесия у взрослого человека. Если в данном белке присутствуют все незаменимые аминокислоты в необходимых пропорциях и все они могут всасываться в кишечнике, то биологическая

ценность такого белка условно равна 100. Для полностью перевариваемых белков с неполным содержанием аминокислот или с полным содержанием аминокислот, но не полностью перевариваемых это значение будет заведомо ниже. В соответствии с этим критерием биологическая ценность белка, в котором отсутствует хотя бы одна незаменимая аминокислота, будет равна нулю.

Таким образом, биологическая ценность того или иного белка определяется не только аминокислотным составом, но и степенью усвоения белка, возможностью его расщепления пищеварительными ферментами. В частности, такие белковые вещества, как волосы, шерсть, перья и другие, не могут использоваться организмом в качестве пищевых продуктов, потому что они не подвергаются протеолитическому расщеплению ферментами пищеварительного тракта человека и большинства животных. Даже хищные животные имеют весьма ограниченные возможности переваривать подобные белковые образования.

Основываясь на аминокислотном составе и способности перевариваться в желудочно-кишечном тракте человека и животных, белки пищи принято разделять на *полноценные* и *неполноценные*. Различными методами, позволяющими разделять сложные белковые смеси на отдельные фракции, удалось выделить некоторые индивидуальные белки растительного происхождения, которые отличаются полным отсутствием тех или иных незаменимых аминокислот. К таким белкам относят *глюадин* пшеницы, *зеин* кукурузы. Опыты с кормлением ими животных показали невозможность их использования для поддержания азотистого равновесия, и такие белки получили название *неполноценных*. Однако ни человек, ни животные никогда не употребляют в пищу отдельные чистые белковые фракции. В природе вообще не существует животных или растительных тканей, в которых полностью отсутствовали бы незаменимые аминокислоты. Поэтому, характеризуя белковые продукты питания, уместно говорить лишь об их большей или меньшей биологической ценности.

Хотя растительные белки в целом по питательной ценности уступают животным, тем не менее при определенной их комбинации организм обеспечивается полной и сбалансированной смесью аминокислот. Так, например, *белки кукурузы содержат мало лизина, но достаточное количество триптофана, тогда как белки бобов богаты лизином, но содержат мало триптофана*. В отдельности ни один из этих белков нельзя считать полноценным. Однако смесь бобов и кукурузы содержит необходимое человеку количество незаменимых аминокислот. Такая смесь, известная под названием *суккоташ* (блюдо из кукурузы и бобов), интуитивно была «составлена» индейцами Нового Света. Жители Востока также издавна научились комбинировать определенные растительные продукты для получения полной с точки зрения питательной ценности смеси аминокислот (примером такой комбинации может служить сочетание риса с соевыми бобами). В Центральной и Южной Америке, где недостаток

белков в пище был обычным явлением, Международный комитет по проблемам питания включил в рацион полноценную питательную смесь, известную под названием «Inсараgina», содержащую сравнительно дешевые растительные белки, главным образом кукурузы, сорго и хлопковых растений.

Обмен простых белков

В живом организме с момента зарождения и до смерти одновременно происходят процессы отмирания и разрушения клеток, внеклеточного вещества тканей и органов и воспроизводство их, замена новыми. Эти процессы идут настолько интенсивно, что в течение жизни организма его ткани и клетки успевают смениться многократно (примером могут служить эритроциты, полностью обновляющиеся за 3–4 месяца). Поэтому по степени важности в процессах обмена веществ пластическая функция белков неизмеримо превосходит их энергетическую роль.

Общее ежедневное количество белков, которые подлежат перевариванию в организме человека, состоит из 70–100 г белка пищи и 35–200 г эндогенного белка, представленного экскретируемыми пищеварительными ферментами и белками отмирающих клеток. Переваривание белков и всасывание продуктов гидролитического расщепления является весьма эффективным процессом у здорового человека.

За исключением короткого промежутка времени после рождения (постнатальный период) у человека сколько-нибудь заметного всасывания интактных олиго- и полипептидов в кишечнике не происходит. Важнейший и глубочайший смысл процесса переваривания белков заключен в лишении полипептидных молекул пищи видовой специфичности. Действительно, каждый вид организмов, каждый орган или ткань содержат свои характерные, специфические белки, поэтому при усвоении белков пищи, которые чужеродны для данного организма, они прежде всего должны быть лишены их *видовой специфичности*. С этой целью в пищеварительном тракте происходит «разложение» белков на индифферентный материал – аминокислоты или (частично) простейшие ди- и трипептиды. Такое «разложение» белковых веществ на более простые, лишённые видовой специфичности соединения, способные всасываться в кровь, осуществляется с помощью пищеварительных протеолитических гидролаз, расщепляющих в белках пищи пептидные связи:



Эти пищеварительные гидролазы называют *пептидазами* (*протеазами*, *протеиназами*). Данный класс гидролитических ферментов подразделяют на *эндопептидазы*, которые расщепляют внутренние пептидные связи и образуют большие фрагменты полипептидов, и олигопептидов и

экзопептидазы, отщепляющие по одному аминокислотному остатку либо с С-, либо с N-конца полипептидной цепи. По этому признаку экзопептидазы далее подразделяют на карбокси- и аминопептидазы. Эндопептидазы играют важнейшую роль на начальных стадиях расщепления белков до более коротких фрагментов, которые впоследствии с большей эффективностью подвергаются деградации под действием экзопептидаз.

Специфичность действия различных протеолитических ферментов на пептидные связи, образованные теми или иными аминокислотами, объясняется существованием строгого соответствия между структурой активного центра фермента и структурой участка полипептидной цепи, прилегающего к гидролизуемой связи, т. е. строением радикала. Атакуемость белка соответствующей протеиназой зависит также от конформации молекулы белка в целом. Именно поэтому денатурированные нагреванием белки (т. е. подвергшиеся термообработке мясные и рыбные продукты, вареные яйца), а также белки, набухшие под действием соляной кислоты желудочного сока, перевариваются значительно эффективнее, чем белки нативные, хотя при этом их первичная структура остается одинаковой.

Протеиназы, входящие в состав желудочного, поджелудочного и кишечного соков, воздействуют на пептидные связи в различных участках полипептидных цепей. Поэтому только в результате комбинированного воздействия всего комплекса протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта осуществляется гидролиз белков до конечных продуктов, представленных свободными аминокислотами, а также ди- и трипептидами, которые всасываются эпителиальными клетками тонкого кишечника.

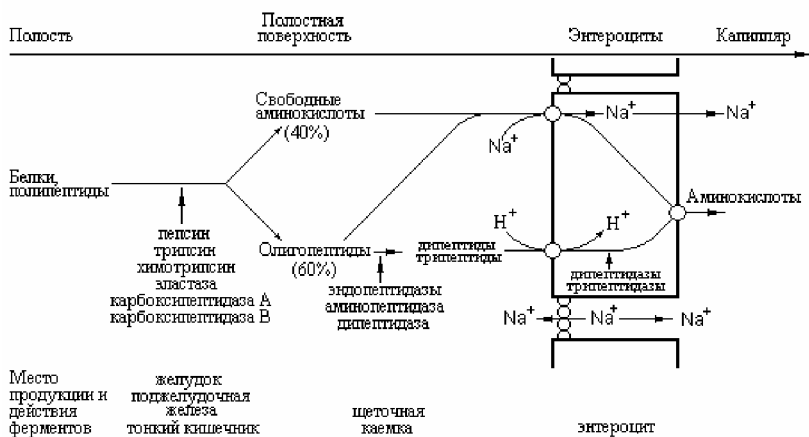


Рис. 2.3. Схема, отражающая последовательные стадии расщепления белков до аминокислот, ди- и трипептидов в желудочно-кишечном тракте [20]

Таким образом, как показано на рис. 2.3, процесс переваривания белков может быть условно разделен на желудочную, панкреатическую и интестинальную фазы в зависимости от участия тех или иных протеиназ, имеющих соответствующее происхождение.

Переваривание белков в желудке

Хорошо известно, что в полости рта белки никаким изменениям не подвергаются вследствие отсутствия в слюне протеолитических ферментов. Переваривание белков начинается в желудке. Выделяют три основных фактора, обеспечивающих инициацию процесса переваривания:

- ◆ стимуляция выделения *гастрина* присутствием белка пищи в желудке;
- ◆ в свою очередь *гастрин* обеспечивает секрецию *обкладочными клетками* слизистой желудка *соляной кислоты*;
- ◆ секреция *пепсиногена* *главными клетками* слизистой желудка.

Желудочный сок характеризуется присутствием высокой концентрации HCl и, следовательно, низким значением pH ($\text{pH} \approx 2,0$), а также наличием протеиназ семейства *пепсина*. Высокая кислотность содержимого желудка имеет чрезвычайно важное физиологическое и биохимическое значение:

- ◆ во-первых, сильно кислая среда обеспечивает набухание и денатурацию пищевых белков. При этом глобулярные белки утрачивают третичную структуру, вследствие чего внутренние пептидные связи становятся доступными для действия протеиназ;
- ◆ во-вторых, присутствие соляной кислоты обеспечивает инициацию аутокаталитического процесса превращения пепсиногена в пепсин и создает оптимальные условия для проявления его протеолитической активности. Так, оптимальное значение pH желудочного сока для нормального функционирования пепсина человека составляет 1,5–2,5. При pH 5–6 пепсин практически не проявляет протеолитической активности;
- ◆ наконец, высокая концентрация соляной кислоты препятствует развитию в полости желудка микрофлоры, действуя как антисептик, тем самым предотвращая зарождение гнилостных процессов. Хорошо известно, что при гастритах при недостаточной кислотности желудочного сока гнилостные процессы в желудке являются причиной появления у больных неприятного запаха изо рта.

В лабораторной клинической практике для тестирования состояния желудка обычно определяют как «свободную» соляную кислоту, так и *общую кислотность* желудочного сока. Для этого определенный объем желудочного сока титруют 0,1 N раствором щелочи в присутствии индикаторов – фенолфталеина для определения общей кислотности и диметиламиноазобензола при определении свободной HCl. Область перехода окраски фенолфталеина лежит в пределах pH 8,2–10,0, что позволяет определить всю совокупность кисло реагирующих веществ (свободная HCl,

кислота, связанная с белками, фосфаты, органические кислоты и др.) в желудочном соке.

Диметиламиноазобензол изменяет окраску в пределах значений рН 2,4–4,0. Эта область рН соответствует моменту нейтрализации щелочью практически всей свободной НСІ. Кислотность желудочного сока выражают в миллилитрах 0,1 N раствора NaOH, расходуемого на титрование 100 мл сока, – *титрационных единиц*.

При нормальной функции желудка общая кислотность колеблется обычно в пределах 40–60 титрационных единиц, а свободная соляная кислота – 20–40 единиц.

В настоящее время разработаны беззондные методы определения кислотности желудочного сока. Суть этих методов состоит в использовании ионообменных смол с присоединенным хинином. При введении такой смолы в полость желудка соляная кислота связывается с катионитом, вытесняя хинин, который всасывается в кровь и выводится из организма с мочой. По количеству выделившегося хинина судят о содержании НСІ в желудочном соке.

Действие пепсина

Важнейшую роль в переваривании белков в желудке играет протеиназа – пепсин, который секретируется *главными клетками* слизистой желудка в каталитически неактивной форме – в виде *пепсиногена*. Активный пепсин образуется из предшественника – *пепсиногена* (мол. масса 40000 Да) при удалении 44 аминокислотных остатков с N-конца белковой молекулы. Расщепление пептидной связи между аминокислотными остатками в положениях 44 и 45 в пепсиногене может происходить либо посредством автоактивации внутримолекулярной реакции гидролиза при рН ниже 5,0, либо в присутствии следов пепсина за счет автокатализа. Освобождающийся N-концевой пептид остается связанным с остальной частью молекулы фермента и действует как ингибитор пепсина при рН выше 2,0. Этот ингибирующий эффект устраняется либо при снижении рН до значений, меньших 2,0, либо в результате дальнейшей деградации N-концевого пептида под действием пепсина. Далее образовавшийся пепсин активирует другие молекулы пепсиногена и весь процесс приобретает лавинообразный характер.

Пепсины являются уникальными белками хотя бы потому, что чрезвычайно устойчивы к действию кислот. Фактически эти протеиназы активны только в сильнокислой среде и не активны при нейтральном значении рН. Механизм катализа зависит от присутствия в активном центре фермента двух карбоксильных групп, принадлежащих двум остаткам аспарагиновой кислоты, причем одна карбоксильная группа находится в ионизованной форме, а другая – в недиссоциированном состоянии. По этой причине пепсины относят к семейству *карбоксипротеиназ*. Характерной особенностью карбоксипротеиназ является их ингибирование

пепстатином, который оказывает ингибирующее действие в очень низких концентрациях, порядка 10^{-10} М.

Основной желудочной протеиназой является пепсин А (мол. масса 33000 Да), который преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные *аминогруппами ароматических аминокислот* – тирозина, фенилаланина и триптофана, а также связи Ala-Ala и Ala-Ser.

Нервнорефлекторные механизмы отделения желудочного сока и регуляция желудочной секреции достаточно подробно рассматриваются в курсах физиологии. Тем не менее необходимо остановиться на некоторых аспектах действия гуморальных факторов. К числу таких факторов относятся *гистамин*, являющийся продуктом декарбоксилирования аминокислоты гистидина под действием гистидин-декарбоксилазы (рис. 2.4) и «пищеварительный» гормон *гастрин*, выполняющий наиболее важную роль в стимуляции секреции желудочного сока. Образование гастрина в слизистой оболочке привратника желудка и поступление его в кровь резко усиливается при поступлении в желудок пищи.

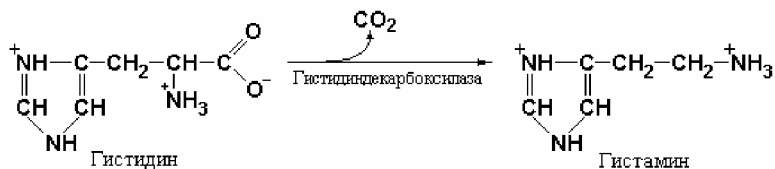


Рис. 2.4. Схема, иллюстрирующая процесс образования гистамина – продукта декарбоксилирования аминокислоты гистидина под действием гистидиндекарбоксилазы

Сравнение активностей этих двух факторов показывает, что полипептид гастрин обладает в 500 раз более высокой способностью стимулировать функцию желудка, чем гистамин. Однако при введении человеку в кровь даже 1 мг гистамина обнаруживается интенсивное отделение желудочного сока. Подобная *гистаминовая проба* используется в лабораторной клинической практике для дифференциальной диагностики *ахилий* – патологических состояний, характеризующихся неспособностью желудка секретировать пепсин и HCl. Отсутствие секреции в ответ на введение гистамина свидетельствует об атрофическом изменении слизистой желудка. В ходе активации пепсина не весь пепсиноген принимает участие в этом процессе. Частично он всасывается в кровь, доставляется в почки и переходит в состав мочи. Присутствующий в моче пепсиноген получил специальное название *уропепсиногена*. В клинических лабораториях, особенно в педиатрической практике, часто определяется активность уропепсиногена (уропепсина) для оценки функционального состояния и секреторной функции слизистой желудка у детей. При пониженной секреции желудочного сока и при наличии атрофических процес-

сов активность уропепсина резко снижается, а при гиперсекреторных состояниях, например при *язвенной болезни* – повышается.

В клинической практике определяют также активность пепсина, особенно при отсутствии свободной HCl в желудочном соке. Это позволяет отличать *анацидные состояния* (отсутствии HCl при наличии пепсина) от истинных *ахилий*, при которых секреция желудка практически отсутствует.

Основными продуктами гидролиза белка под действием пепсина являются большие пептидные фрагменты и некоторое количество свободных аминокислот. Значение переваривания белков в желудке сводится, в первую очередь, к появлению пептидов и аминокислот, которые действуют в качестве стимуляторов синтеза и выброса *холецистокинина*. Поэтому пептиды, образованные в результате гидролитического расщепления пищевых белков под действием желудочных протеиназ, являются инструментом инициации панкреатической фазы переваривания белка.

ЛЕКЦИЯ 3. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ. АКТИВАЦИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЗИМОГЕНОВ

Как только кислое содержимое желудка попадает в тонкий кишечник, в нем под влиянием низкого pH начинается секреция гормона *секретин*, поступающего в кровь. *Секретин* в свою очередь стимулирует выделение поджелудочной железой бикарбоната, что приводит к нейтрализации HCl желудочного сока. В результате pH резко возрастает от 1,5–2,5 до ~7,0. При нейтральном значении pH в тонком кишечнике продолжается переваривание белков под действием протеиназ поджелудочной железы. Секреция этих протеиназ стимулируется гормоном *холецистокинином*, продукция которого зависит от поступления в двенадцатиперстную кишку свободных аминокислот.

Пищеварительный сок поджелудочной железы содержит большое количество *проэнзимов эндопептидаз* и *карбоксипептидаз*. Эти зимогены активируются только после того, как попадут в просвет тонкого кишечника. Ключевым ферментом, ответственным за их активацию, является *энтерокиназа* – протеиназа, продуцируемая эпителиальными клетками двенадцатиперстной кишки. Энтерокиназа активирует панкреатический трипсиноген посредством отщепления *гексапептида* NH₂ – Val – (Asp)₄ – Lys с N-конца этого зимогена, превращая его тем самым в активный трипсин (рис. 3.1).

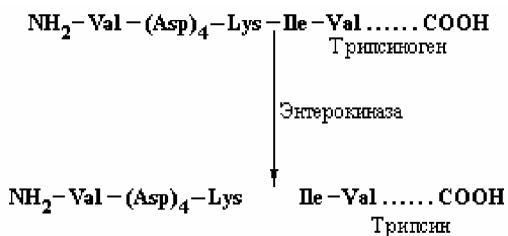


Рис. 3.1. Схема, иллюстрирующая процесс активации трипсина под действием энтерокиназы

Далее активный трипсин способен автокаталитически активировать другие молекулы трипсиногена. Более того, он также действует на другие проэнзимы, такие как химотрипсиноген, проэластаза и прокарибоксипептидазы А и В (рис. 3.2). Поскольку трипсин играет роль общего мощного активатора панкреатических пищеварительных ферментов, в соке поджелудочной железы присутствует низкомолекулярный пептид, действующий как ингибитор трипсина и предотвращающий преждевременную ак-

тивацию тех незначительных количеств трипсина, которые могут оказаться в клетках поджелудочной железы или ее протоках.

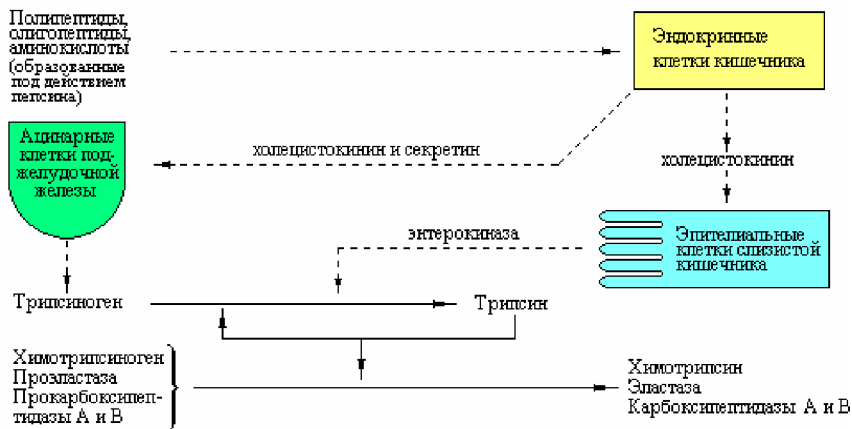


Рис. 3.2. Схема, иллюстрирующая последовательность стадий секреции и активации панкреатических ферментов

Субстратная специфичность трипсина, химотрипсина и эластазы – основных панкреатических эндопептидаз – отражена в табл. 3.1. Панкреатические протеолитические ферменты активны только при значениях рН, близких к нейтральному, поэтому эффективность их каталитического действия зависит, как было указано ранее, от секреции бикарбоната, нейтрализующего соляную кислоту желудочного сока. Перечисленные эндопептидазы относят к семейству *сериновых протеиназ*, содержащих в активных центрах специфический остаток серина (у химотрипсина это Ser-195), ответственный за протеолитическую активность ферментов. Характерной особенностью сериновых протеиназ является их способность необратимо ингибироваться при действии *органических фторфосфатов*, конкретнее, при взаимодействии остатка активного серина с *диизопропилфторфосфатом* (см. далее).

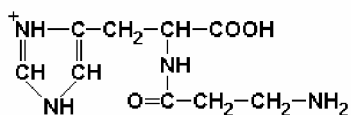
Полипептиды и олигопептиды, образованные в результате протеолиза под действием пепсина и панкреатических эндопептидаз, подвергаются дальнейшей деградации в просвете тонкого кишечника при участии карбоксипептидаз А и В. Эти белки являются металлоферментами, для проявления активности которых необходимо присутствие в активном центре атома Zn, и, следовательно, механизм их действия должен отличаться от механизма катализа карбокси- и сериновых протеиназ.

В результате комбинированного действия панкреатических пептидаз образуются свободные аминокислоты и короткие пептиды, состоящие из 2–8 аминокислотных остатков. Пептиды, образующиеся на данной стадии переваривания пищевого белка, содержат до 60 % аминного азота.

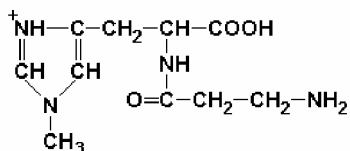
Участие пептидаз тонкого кишечника в расщеплении коротких пептидов

Поскольку секрет поджелудочной железы не содержит каких-либо заметных количеств *аминопептидаз*, окончательное переваривание олиго- и дипептидов зависит от функционирования ферментов щеточной камеры тонкого кишечника. Полостная поверхность плазматических мембран эпителиальных клеток кишечника особенно богата ферментами, проявляющими эндопептидазную и аминопептидазную активность, а также содержит дипептидазы с различной субстратной специфичностью. Конечными продуктами процесса *пристеночного пищеварения* являются свободные аминокислоты, ди- и трипептиды. Аминокислоты и короткие пептиды способны всасываться эпителиальными клетками при помощи специфических транспортных систем. Поступающие в энтероциты ди- и трипептиды гидролизуются в цитоплазме этих клеток до аминокислот и только после этого покидают клетки, направляясь в кровяное русло. Присутствие в цитоплазме эпителиальных клеток кишечника дипептидаз объясняет появление в воротной вене (после принятия пищи) практически только свободных аминокислот.

Фактическое отсутствие пептидов в крови ранее служило доказательством того, что при полостном пищеварении происходит полный гидролиз белков пищи до свободных аминокислот. Однако в настоящее время установлено, что большая часть аминного азота пищи всасывается в виде простейших пептидов, которые гидролизуются внутриклеточно. Исключение из этого общего правила составляют ди- и трипептиды, содержащие *пролин* или *оксипролин*, а также включающие необычные аминокислоты, такие как β -Ala в *карнозине* (β -аланилгистидине) и *ансерине* [β -аланил (N^2 -метил) гистидине], присутствующие в мясе цыплят.



Карнозин (β -аланил-L-гистидин)



Ансерин [β -аланил (N^2 -метил)-L-гистидин]

Дипептиды карнозин и ансерин являются «плохими» субстратами для дипептидаз цитоплазмы энтероцитов и поэтому транспортируются в неизменном виде из эпителиальных клеток кишечника в кровяное русло.

Сериновые протеиназы.

Механизм действия химотрипсина и карбоксипептидазы

Ранее уже отмечалось, что поджелудочная железа ответственна за продукцию целой группы протеолитических ферментов, гидролизующих пептидные связи, образованные разными аминокислотами. Ферменты, участвующие в переваривании белков, и их специфичность в отношении пептидных связей, образуемых разными аминокислотами, приведены в табл. 3.1. Наиболее важным и полно изученным представителем интестинальных протеиназ, относящихся к семейству *сериновых протеиназ*, является химотрипсин. Химотрипсин представляет собой пищеварительный фермент, синтезируемый в виде зимогена *ацинарными* клетками поджелудочной железы.

Таблица 3.1. Субстратная специфичность протеиназ желудочно-кишечного тракта

Активный фермент	Зимоген	Активатор	Расщепляемая пептидная связь
Карбоксипроотеиназы			
Пепсин А	Пепсиноген А	Автоактивация, активный пепсин	Tyr, Phe, Trp
Сериновые протеиназы			
Трипсин	Трипсиноген	Энтерокиназа Трипсин	Arg, Lys
Химотрипсин Эластаза	Химотрипсиноген Проэластаза	Трипсин Трипсин	Tyr, Phe, Trp, Met Ala, Gly, Ser
Zn-содержащие пептидазы			
Карбоксипептидаза А	Прокарбоксипептидаза А	Трипсин	Val, Leu, Ile, Ala с С-конца
Карбоксипептидаза В	Прокарбоксипептидаза В	Трипсин	Arg, Lys
Аминопептидаза	Проаминопептидаза	Трипсин	Отщепление N-концевых остатков (за исключением Pro)

Внутри ацинарных клеток новосинтезированные молекулы белка транспортируются из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, где они окружаются белково-липидной мембраной – так образуются зимогеновые гранулы, которые в электронном микроскопе выглядят как очень плотные тельца (рис. 3.3).

Зимогеновые гранулы, содержащие химотрипсиноген, накапливаются в верхушке ацинарных клеток и затем под действием гормонального или нейронального сигнала выбрасываются в проток, ведущий в двенадцатиперстную кишку.

Химотрипсиноген представлен одной полипептидной цепью из 245 аминокислот. Цепь стабилизирована пятью дисульфидными мостиками. Активация химотрипсиногена осуществляется под действием трипсина,

расщепляющего пептидную связь между аргинином-15 и изолейцином-16. Образующийся при этом активный π -химотрипсин действует на другие молекулы химотрипсиногена (рис. 3.4).

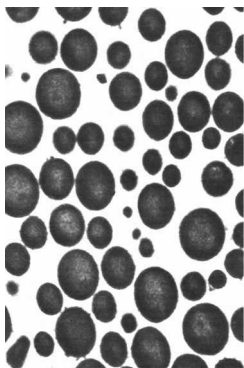


Рис. 3.3. Электронная микрофотография зимогеновых гранул в ацинарных клетках поджелудочной железы (по рисунку G. Palade из [2, т. 2])

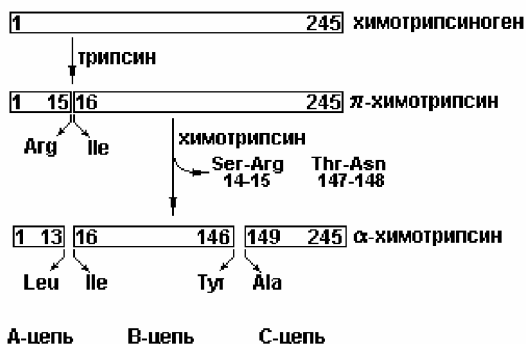


Рис. 3.4. Схема, иллюстрирующая последовательность стадий активации химотрипсина

Далее π -химотрипсин подвергается дополнительному протеолитическому действию химотрипсина с выщеплением двух дипептидов Ser₁₄—Arg₁₅ и Thr₁₄₇—Asn₁₄₈ и образованием стабильной формы фермента – α -химотрипсина.

Поскольку химотрипсин является одним из наиболее полно изученных ферментов, целесообразно рассмотреть его структуру и механизм действия более детально. Молекула α -химотрипсина состоит из трех полипептидных цепей, соединенных двумя межцепочечными дисульфидными связями (рис. 3.5).

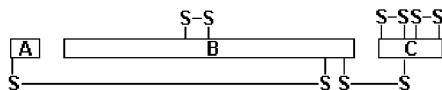


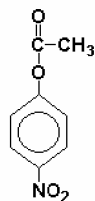
Рис. 3.5. Схема организации молекулы α -химотрипсина, стабилизированной двумя межцепочечными дисульфидными мостиками и тремя внутрицепочечными дисульфидными связями

Молекулярная масса α -химотрипсина составляет около 25 000 Да. Молекула имеет компактную эллипсоидную форму размером $51 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$. Все заряженные группы, за исключением трех, необходимых для катализа, находятся на поверхности молекулы.

Равновесие реакции гидролиза сдвинуто практически полностью в сторону расщепления пептидных связей. Однако химотрипсин способен гидролизовать с высокой скоростью далеко не каждую пептидную связь. Он действует избирательно на связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот и аминокислот с гидрофобными радикалами большого размера, например метионина.

Характерной особенностью химотрипсина является его способность гидролизовать эфирные связи. По существу, значительная часть сведений о механизме действия химотрипсина была получена при изучении гидролиза сложных эфиров.

Как было показано, химотрипсин катализирует гидролиз пептидных и эфирных связей в два отдельных этапа. Впервые это было обнаружено при изучении кинетики гидролиза сложноэфирной связи *n*-нитрофенилацетата.



Анализ реакции показал, что высвобождение в ходе гидролиза одного из продуктов – *n*-нитрофенола – происходит в две стадии: сначала *n*-нитрофенол высвобождается взрывообразно, а затем он образуется уже с меньшей стационарной скоростью.

В общих чертах процесс гидролиза *n*-нитрофенилацетата сводится к образованию ферментсубстратного комплекса, затем эфирная связь в субстрате расщепляется и *n*-нитрофенол высвобождается, при этом ацетильная группа субстрата остается ковалентно связанной в активном центре фермента. Далее вода атакует ацетилферментный комплекс с образованием ацетат-иона и регенерированного фермента (рис. 3.6).

Быстрая начальная фаза высвобождения *n*-нитрофенола связана с образованием ацилферментного комплекса, показанного на рис. 3.6 значком (*). Этот этап называют ацилированием. Второй этап, называемый деацилированием, соответствует стационарной стадии реакции, являющейся одновременно лимитирующей. Ацилферментный комплекс оказался настолько стабильным, что в определенных условиях его удается выделить. После того как при pH 3 был выделен в чистом виде этот промежуточный ацилферментный комплекс, удалось охарактеризовать ме-

сто, по которому происходит присоединение ацильной группы к ферменту. Оказалось, что ацильная группа связана с атомом кислорода специфического остатка серина – серина-195 (Ser-195). Именно по этой причине химотрипсин относят к группе *сериновых протеиназ*. Этот остаток серина проявляет необычайно высокую реакционную способность. Его можно специфически пометить *органическим фторфосфатом – диизопропилфторфосфатом* (рис. 3.7).

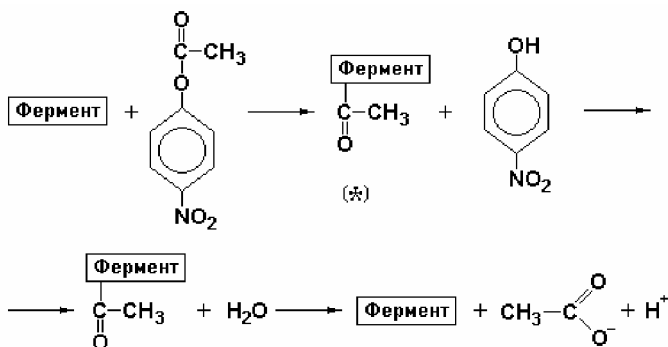


Рис. 3.6. Ацилирование – образование ацетилферментного комплекса в качестве промежуточного продукта; деацилирование – гидролиз промежуточного ацетилферментного комплекса

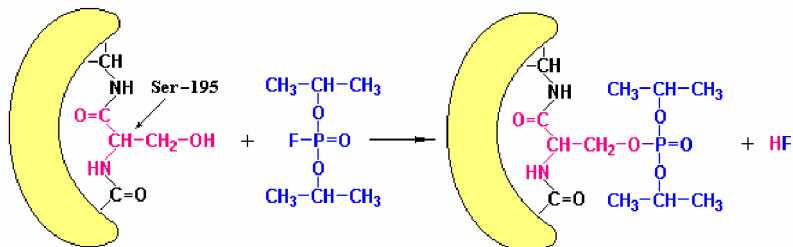


Рис. 3.7. Схема инактивации химотрипсина диизопропилфосфатом (ДПФФ) за счет образования диизопропилфосфорильного производного серина-195

О повышенной реакционной способности серина-195 говорит тот факт, что остальные 27 остатков серина в химотрипсине абсолютно не взаимодействуют с диизопропилфторфосфатом (ДПФФ). Кстати, химотрипсин – не единственный фермент, который ингибируется ДПФФ. Многие другие протеолитические ферменты, такие как *трипсин, эластаза, тромбин, бактериальный субтилизин*, также специфически реагируют с ДПФФ, полностью теряя при этом активность. Как и в случае химотрипсина, данные протеиназы взаимодействуют с ДПФФ за счет одного-единственного остатка серина. Таким образом, уместно говорить о существовании целого семейства *сериновых протеиназ*.

В каталитических актах химотрипсина, однако, принимает участие не только боковой радикал Ser-195. Было показано, что в активном центре фермента важную роль играет также остаток гистидина – His-57. Доказать его участие в катализе удалось с помощью так называемой *аффинной метки*, которая связывается с химотрипсином подобно субстрату с одной стороны и образует ковалентную связь с определенной группой в активном центре – с другой.

Такой меткой для химотрипсина является соединение *тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон*, строение которого приведено на рис. 3.8.

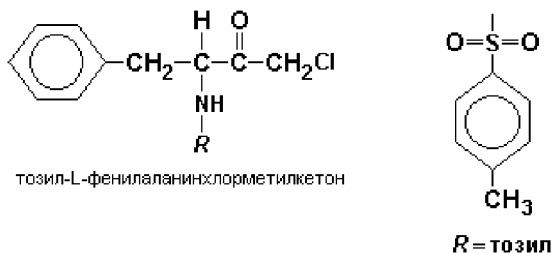


Рис. 3.8. Структура тозил-L-фенилаланинхлорметилкетона, используемого в качестве аффинной метки химотрипсина (R – тозильная группа)

Наличие в молекуле метки боковой цепи, представленной фенилаланином, обеспечивает ее специфическое взаимодействие с ферментом. Реакционноспособная группа метки – хлорметилкетон – взаимодействует только с остатком His-57 и алкилирует один из атомов азота гистидинового кольца. Взаимодействие такой аффинной метки с химотрипсином полностью лишает его ферментативной активности. Существует несколько доказательств высокой специфичности взаимодействия метки с химотрипсином:

- ♦ во-первых, аффинная метка высоко стереоспецифична. D-изомер метки с химотрипсином не взаимодействует;
- ♦ во-вторых, конкурентный ингибитор химотрипсина – β -фенилпропионат тормозит процесс взаимодействия метки с белком;
- ♦ в-третьих, скорость инактивации химотрипсина при добавлении метки находится в такой же зависимости от pH, как скорость катализа.

Схема взаимодействия тозил-L-фенилаланинхлорметилкетона с His-57 приведена на рис. 3.9.

Таким образом, для проявления каталитической активности химотрипсина принципиальным является присутствие в активном центре фермента остатков Ser-195 и His-57. Как было установлено позже, рядом с этими остатками в молекуле химотрипсина находится также остаток аспарагиновой кислоты – Asp-102. Рентгеноструктурный анализ показал, что все три остатка находятся рядом друг с другом и создают так называемую *систему переноса заряда* за счет того, что Asp-102 образует во-

дородную связь с His-57, который в свою очередь соединен водородной связью с Ser-195 (рис. 3.10).

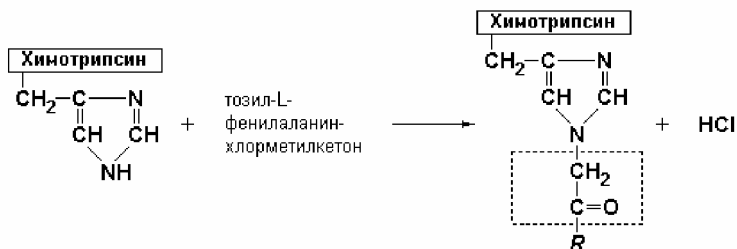


Рис. 3.9. Алкилирование гистидина-57 в химотрипсине при взаимодействии с тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон

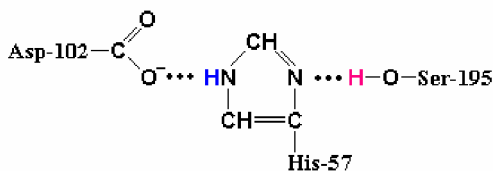


Рис. 3.10. Система переноса заряда в активном центре химотрипсина в отсутствие субстрата [24]

Карбоксилат-ион Asp-102 поляризует имидазольную группу His-57, что повышает его способность осуществлять челночное связывание протона, и при взаимодействии субстрата с молекулой химотрипсина Asp-102 и His-57 акцептирует протон гидроксильной группы Ser-195 (рис. 3.11).

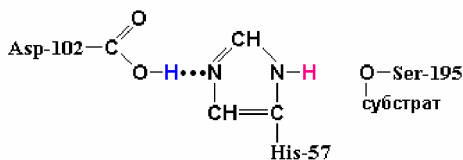


Рис. 3.11. Система переноса заряда в активном центре химотрипсина в присутствии субстрата. При добавлении субстрата происходит промежуточное связывание протона аспаратом-102 и гистидином-57 [24]

Локализация сайтов специфического связывания субстрата и вероятная ориентация гидролизуемой пептидной связи были установлены в результате выполнения рентгеноструктурного анализа комплексов химотрипсина с аналогами субстрата. В частности, было показано на примере изучения комплексов химотрипсина с негидролизующим аналогом субстрата – формил-L-триптофаном существование в ферменте глубокого

гидрофобного кармана вблизи серина-195, который по размеру соответствует боковым радикалам ароматических аминокислот (рис. 3.12).

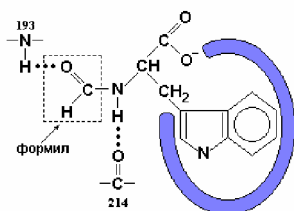


Рис. 3.12. Схематическое изображение связывания формил-L-триптофана химотрипсином

Именно наличием этого глубокого кармана объясняется специфичность химотрипсина в отношении аминокислот с ароматической или иной гидрофобной боковой цепью большого размера. При рентгеноструктурном анализе комплексов химотрипсина с аналогами полипептидных субстратов обнаружено большое число водородных связей между основными цепями фермента и субстрата, которые располагаются так же, как в антипараллельных β -складчатых слоях.

Механизм каталитического действия химотрипсина

Интенсивные и всеобъемлющие рентгеноструктурные и биохимические исследования химотрипсина позволили прийти к определенному выводу относительно механизма его каталитического действия. Как уже упоминалось, His-57 и Ser-195 принимают непосредственное участие в расщеплении пептидной связи субстрата. Гидролиз этой связи начинается с того, что кислородный атом OH-группы Ser-195 атакует атом углерода карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) гидролизуемой пептидной связи субстрата. В результате связь между атомами С и О в карбонильной группе становится одинарной и атом О приобретает отрицательный заряд. При этом четыре разных атома, связанные с углеродом карбонильной группы, располагаются в виде тетраэдра. Образование такого *тетраэдрического промежуточного соединения* оказывается возможным благодаря возникновению водородных связей между отрицательно заряженным атомом кислорода (называемым *оксианионом*) и двумя NH-группами основной цепи фермента (рис. 3.13).

Этот участок химотрипсина называется *полостью оксианиона*. В механизме образования упомянутого промежуточного соединения важнейшую роль играет перенос протона от Ser-195 на His-57.

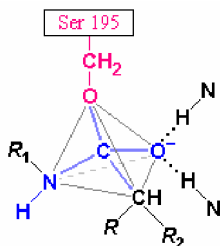


Рис. 3.13. Тетраэдрическое промежуточное соединение в реакциях ацилирования и деацилирования химотрипсина. Стабильность промежуточного соединения обеспечивают водородные связи, образованные NH-группами основной цепи фермента

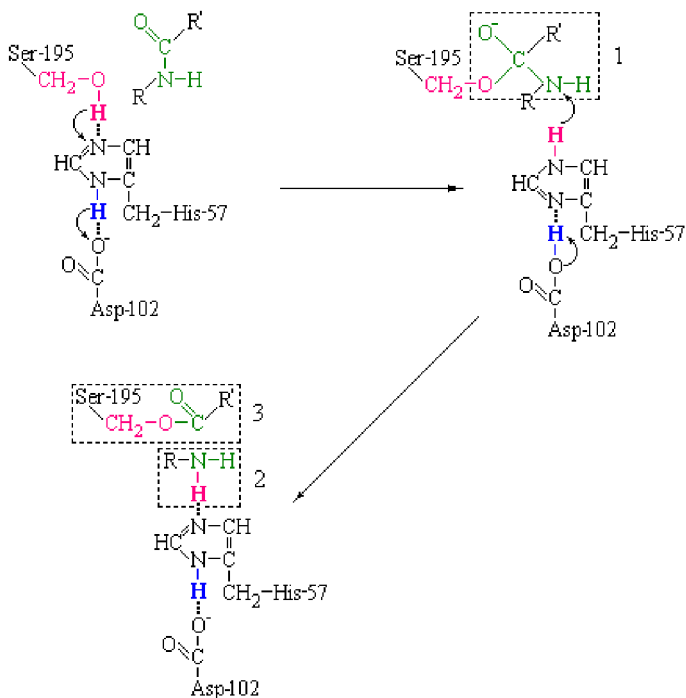


Рис. 3.14. Первый этап гидролиза пептидов химотрипсином – ацилирование. Образуется тетраэдрическое промежуточное соединение, затем аминный компонент субстрата быстро отделяется от фермента, а сам фермент превращается в промежуточный продукт – ацилфермент

Перенос протона значительно облегчается благодаря присутствию системы переноса заряда. Остаток Asp-102 строго ориентирует положение имидазола гистидина-57 и частично нейтрализует заряд, появляю-

щийся на этом кольце. Протон, связанный парой His-Asp, переходит затем к атому азота гидролизуемой пептидной связи, которая в результате разрывается. На этой стадии аминный компонент субстрата соединяется водородной связью с His-57, а кислотный компонент – эфирной (ковалентной) связью с Ser-195, завершая тем самым этап *ацилирования*. Таким образом, при ацилировании химотрипсина образуется промежуточное тетраэдрическое соединение (1) и впоследствии аминный компонент субстрата (2) быстро отделяется от фермента. Сам фермент превращается в промежуточный продукт катализа – ацилфермент (3) (рис. 3.14).

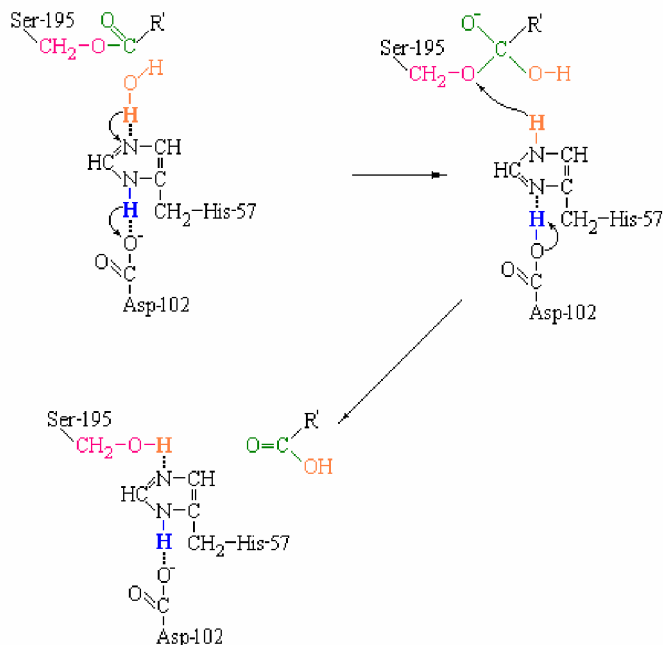


Рис. 3.15. Второй этап гидролиза пептидов химотрипсином – деацилирование. Ацилфермент гидролизуется водой

На следующей стадии – *деацилирования* – аминный компонент диффундирует от фермента, а его место в активном центре занимает вода (рис. 3.15).

По сути *деацилирование* представляет собой процесс, обратный ацилированию. Сначала система переноса заряда отрывает протон от воды. Образующийся при этом ОН-ион взаимодействует с карбонильным атомом углерода, обеспечивая формирование тетраэдрического соединения (см. рис. 3.15). Затем His-57 передает протон на атом кислорода остатка Ser-195, что приводит к высвобождению кислотного компонента субстрата и регенерации фермента.

Механизм активации химотрипсина

Как уже указывалось, процесс активации химотрипсина связан с расщеплением одной-единственной пептидной связи между аргинином-15 и изолейцином-16. В результате такого расщепления конформация фермента претерпевает ряд изменений. Трехмерная структура молекулы химотрипсина была детально исследована и описана Джозефом Краутом, который установил отдельные, наиболее существенные изменения конформации химотрипсина в процессе его активации [25].

К таким ключевым моментам приобретения химотрипсином каталитически активной конформации относятся следующие:

- ♦ гидролиз пептидной связи между Arg-15 и Ile-16 обеспечивает появление новых N- и C-концевых групп;
- ♦ образовавшаяся новая N-концевая группа Ile-16 загибается внутрь и взаимодействует с остатком аспарагиновой кислоты Asp-194, расположенным внутри молекулы химотрипсина;
- ♦ такое электростатическое взаимодействие между положительно заряженной аминокислотной группой Ile и отрицательно заряженной карбоксильной группой Asp-194 инициирует ряд конформационных перестроек, которые приводят к формированию участка связывания субстрата;
- ♦ кроме того, конформационные сдвиги, сопровождающие активацию химотрипсина, обеспечивают *формирование полости оксианиона*;
- ♦ конформационные сдвиги в остальных частях молекулы крайне незначительны.

Таким образом, активация фермента осуществляется путем локальных конформационных перестроек, возникающих в результате гидролиза лишь одной пептидной связи.

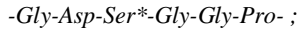
Общие свойства семейства сериновых протеиназ

К семейству сериновых протеиназ относятся многие ферменты, принимающие участие в процессах расщепления белков: химотрипсин, трипсин, эластаза, бактериальный субтилизин и др.

Наиболее близкими структурными особенностями и механизмом действия отличаются три сериновые протеиназы – химотрипсин, трипсин и эластаза:

- ♦ все три фермента секретируются поджелудочной железой в виде зимогенов и активируются путем расщепления одной пептидной связи;
- ♦ первичная последовательность аминокислот для этих трех протеиназ на ~40 % идентична, а степень идентичности аминокислот, составляющих активный центр, еще выше. Именно поэтому новая концевая аминокислота во всех трех ферментах взаимодействует с Asp-194;
- ♦ подобно химотрипсину, трипсин и эластаза содержат в активном центре серин и ингибируются фторфосфатами, в частности диизопропилфторфосфатом;

♦ более того, все три фермента обладают одинаковой аминокислотной последовательностью, окружающей активный серин:



♦ ферменты обладают большим сходством третичной структуры, что реализуется в существовании *систем переноса заряда и полостей оксианиона*;

♦ механизмы катализа почти одинаковы вследствие присутствия *систем переноса заряда и полостей оксианиона*, которые способствуют образованию *тетраэдрических промежуточных соединений*.

Однако, несмотря на большое сходство структуры и механизмов действия, сериновые протеиназы чрезвычайно сильно отличаются по субстратной специфичности. Как показали результаты рентгеноструктурного анализа, разница в субстратной специфичности обусловлена небольшими отличиями участков связывания субстрата. В химотрипсине присутствует глубокий гидрофобный карман для связывания ароматических и больших неполярных боковых цепей субстрата. В трипсине в результате одной замены в кармане остатка Ser на отрицательно заряженный остаток аспарагиновой кислоты Asp обеспечивается связывание последней с положительно заряженными остатками Arg и Lys субстрата. В эластазе же нет такого глубокого кармана для субстрата, потому что два остатка Gly, характерные для химотрипсина, заменены остатками Val и Thr, которые имеют гораздо большие размеры, чем глицин, что объясняет специфичность эластазы по отношению к небольшим незаряженным радикалам аминокислот, образующих пептидные связи.

Нарушения процессов переваривания белков

Известно редкое, к счастью, заболевание – *стеаторрея* (или упорный понос), связанное с изменением каталитической функции протеолитических ферментов кишечника. Такие измененные ферменты не способны гидролизовать некоторые водорастворимые белки злаков, к которым относится *глиадин*. Накапливающийся в процессе переваривания *глиадин* вызывает существенные повреждения эпителиальных клеток кишечника. Поэтому из рациона больных *стеаторреей* необходимо исключить зерновые продукты.

Другим известным тяжелым заболеванием, нередко со смертельным исходом, является *острый панкреатит*. Эта болезнь характеризуется нарушением регуляции активности панкреатических протеиназ и липаз и сопровождается преждевременной активацией протеолитических и липолитических ферментов поджелудочной железы. В результате эти мощные ферменты воздействуют на ткани самой железы, разрушая их, а также стенки пронизывающих орган кровеносных сосудов. Под действием активированных зимогенов происходит глубокая и чрезвычайно болезнен-

ная деструкция органа, что может привести, в конце концов, к летальному исходу.

В норме существует множество путей защиты поджелудочной железы от действия синтезируемых ею протеолитических и липолитических ферментов.

Прежде всего все панкреатические ферменты синтезируются в виде зимогенов. Кроме того, в клетках ацинарной ткани зимогены заключены в зимогеновых гранулах, окруженных защитной белково-липидной мембраной. Еще одна мера защиты ацинарных клеток от разрушающего действия пищеварительных гидролаз заключается в присутствии в секрете поджелудочной железы ингибиторов, инактивирующих те небольшие количества активных протеиназ, которые могут в ней оказаться. Ключевую роль в данном случае играет ингибитор трипсина, поскольку именно трипсин выполняет главную функцию активатора не только протеиназ, но и панкреатической фосфолипазы A_2 .

Существует несколько уровней регуляции активности панкреатических протеиназ. Первый заключается в превращении зимогенов в активные формы под действием трипсина. Этот очень точный механизм активации, однако, необратим, и, следовательно, должен существовать другой механизм, но уже обеспечивающий остановку протеолиза.

Данную функцию выполняет специфический ингибитор трипсина – белок с молекулярной массой 6000 Да, который прочно связывается в активном центре трипсина. Константа диссоциации комплекса трипсин-ингибитор составляет 10^{-13} М, а период полураспада комплекса равняется нескольким месяцам. Ингибитор обладает таким высоким сродством к трипсину в силу практически идеальной комплементарности его структуры активному центру фермента. Между полипептидными цепями фермента и ингибитора возникает вследствие этой комплементарности большое число водородных связей. Примечательной особенностью такого взаимодействия является необычная устойчивость комплекса к действию 8 М мочевины или 6 М гуанидингидрохлорида, хотя в обычных случаях эти денатурирующие агенты всегда вызывают диссоциацию олигомеров белка на субъединицы.

Таким образом, присутствие ингибитора трипсина успешно предотвращает преждевременное образование свободных протеолитических ферментов поджелудочной железы.

Механизм действия карбоксипептидазы А

Для наиболее полного переваривания белков в тонком кишечнике присутствует протеолитический фермент панкреатического происхождения, который обеспечивает отщепление аминокислот с С-конца гидролизуемых пептидов и полипептидов. Особенно легко гидролизуются пептидные связи, образованные с С-концевыми ароматическими кислотами (рис. 3.16).

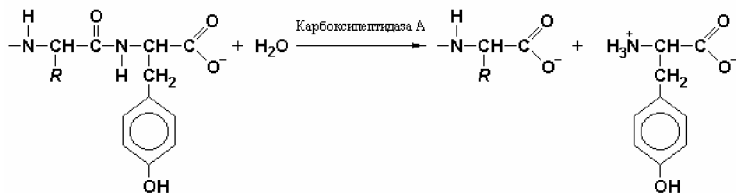


Рис. 3.16. Реакция, катализируемая карбоксипептидазой А

Прежде чем перейти к более подробному рассмотрению механизма действия карбоксипептидазы А, необходимо остановиться на двух особенностях фермента:

- ♦ связывание субстрата носит характер *индуцированного соответствия*, которое выражается в значительных изменениях структуры фермента после взаимодействия с субстратом;
- ♦ в активном центре карбоксипептидазы А содержится атом цинка, который вместе с другими группами вызывает *смещение* (перераспределение) *электронов* в субстрате, облегчая процесс гидролиза.

Трехмерную структуру карбоксипептидазы А с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2 Å описал в 1971 году Вильям Липскомб [26, 27]. Фермент содержит одну полипептидную цепь из 307 аминокислот, имеет компактную эллипсоидную форму с размерами 50×42×38 Å. С белком прочно связан атом цинка, расположенный в углублении близко к поверхности. Атом цинка образует координационные связи в виде тетраэдра с двумя гистидинами (His-69 и His-196) основной цепи, боковой цепью глутаминовой кислоты – Glu-72 и молекулой воды (рис. 3.17).

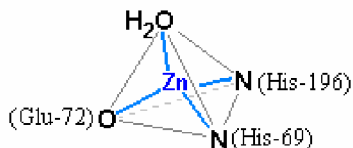


Рис. 3.17. Ион цинка, расположенный в активном центре карбоксипептидазы А, образует четыре координационные связи с радикалами двух остатков гистидина и остатком глутаминовой кислоты. Четвертую координационную связь занимает молекула воды

Рядом с атомом цинка располагается большой неполярный «карман» для связывания ароматического радикала субстрата.

Представления о характере взаимодействия субстрата с карбоксипептидазой А возникли на основе данных, полученных при изучении структуры комплекса фермента с глицилтирозином – дипептидом, который крайне медленно гидролизует (рис. 3.18). Было показано, что в

связывании субстрата принимает участие остаток глутаминовой кислоты – Glu-270, а также остатки аргинина (Arg-145) и тирозина (Tyr-248).

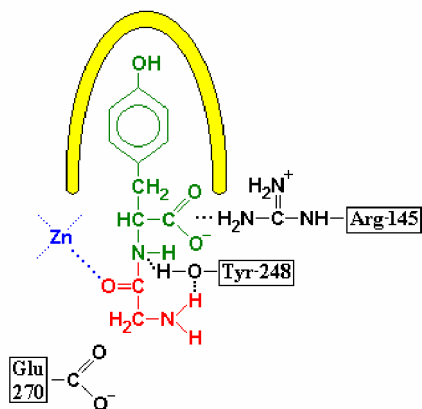


Рис. 3.18. Схематическое изображение связывания глицилтирозина в активном центре карбоксипептидазы А. Показан постулированный каталитически активный комплекс. Остаток глицина выделен красным цветом, остаток тирозина – зеленым

Отрицательно заряженная С-концевая карбоксильная группа субстрата электростатически взаимодействует с положительно заряженным радикалом Arg-145. Ароматический радикал глицилтирозина связывается в гидрофобном кармане фермента. Водород NH-группы расщепляемой пептидной связи образует водородную связь с OH-группой Tyr-248. Карбонильный кислород гидролизуемой пептидной связи вступает в координационную связь с атомом Zn, а концевая аминогруппа глицилтирозина образует через встроенную воду (не показано) водородную связь с карбоксильной группой Glu-270. Последний тип взаимодействия, скорее всего, не имеет места в активном ES-комплексе и, вероятно, является причиной низкой скорости гидролиза глицилтирозина.

Связывание глицилтирозина вызывает структурную перестройку активного центра, в результате чего каталитические группы фермента принимают правильную ориентацию согласно модели индуцированного соответствия. Боковые цепи Arg-145 и Glu-270 перемещаются на 2 Å, в то время как гидроксифенил Tyr-248 перемещается на 12 Å, т. е. на расстояние, равное ¼ диаметра молекулы фермента. Взаимодействие кислорода карбонильной группы расщепляемой пептидной связи с атомом цинка приводит к вытеснению воды из четвертого координационного положения (см. рис. 3.17). По крайней мере, еще четыре молекулы воды вытесняются из неполярного «кармана» фермента при связывании в нем тирозиновой боковой цепи субстрата. При перемещении Tyr-248 его гидроксильная группа, находившаяся на поверхности фермента, оказывается

вблизи пептидной связи субстрата. В результате закрывается полость активного центра и тем самым завершается ее превращение из области, заполненной водой, в гидрофобную область.

На основе данных рентгеноструктурного анализа были предложены два механизма действия карбоксипептидазы А [28]. Один механизм реализуется при гидролизе эфиров, тогда как другой обеспечивает расщепление пептидных связей. Поскольку нас в первую очередь интересует гидролиз именно пептидных связей, ограничимся рассмотрением последнего механизма.

В соответствии со вторым механизмом катализа, остаток глутаминовой кислоты Glu-270 активирует молекулу воды. Образующийся ОН⁻ ион атакует карбонильный атом углерода расщепляемой связи. Одновременно Tyr-248 отдает протон на ее NH-группу и пептидная связь расщепляется.

Возникает закономерный вопрос: а какова роль атома цинка в катализе? Взаимодействие цинка с кислородом карбонильной группы сильно поляризует связь C = O, а неполярное окружение цинка усиливает его способность индуцировать диполь. Сильной поляризации карбонильной группы способствует также близость отрицательно заряженной карбоксильной группы Glu-270. Таким образом, карбоксипептидаза А индуцирует такое смещение электронов на субстрате, которое повышает скорость катализа (рис. 3.19).

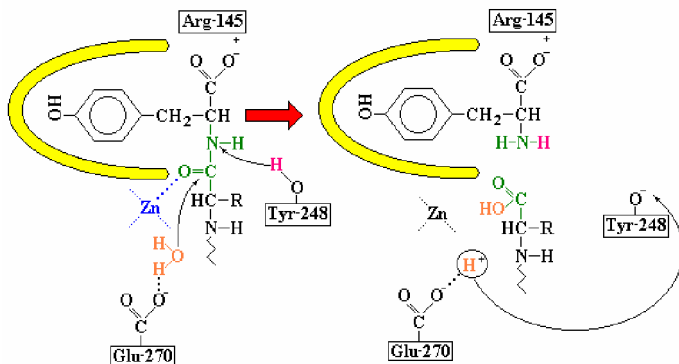


Рис. 3.19. Возможный механизм каталитического действия карбоксипептидазы А. Остаток Glu-270 активирует молекулу воды, которая атакует карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи. Гидролиз осуществляется прямо, без промежуточного образования ангидрида Glu-270, постулируемого для другого механизма катализа

Таким образом, карбоксипептидаза А, отщепляющая С-концевые аминокислоты от олигопептидов, служит примером фермента, в основе каталитического действия которого лежит принцип существенных структурных изменений в области активного центра. Пример карбоксипепти-

дазы А иллюстрирует ту важную роль, которую играет в катализе *индуцированное соответствие* формы фермента форме субстрата.

Всасывание свободных аминокислот

В результате согласованного действия желудочных и панкреатических эндо- и экзопептидаз, а также олигопептидаз щеточной каемки энтероцитов пищевые белки расщепляются с образованием преимущественно свободных аминокислот и небольшого количества ди- и трипептидов, которые должны всосаться в кровь (рис. 3.20).

Тонкий кишечник обладает высокой всасывающей способностью по отношению к аминокислотам. Большая часть L-аминокислот может транспортироваться через эпителиальный слой клеток против градиента концентрации, хотя необходимость такого транспорта *in vivo* не очевидна, так как концентрация аминокислот в просвете кишечника обычно выше, чем в плазме, на 0,1–0,2 мМ.

Аминокислотный транспорт в тонком кишечнике характеризуется всеми особенностями транспорта, зависящего от переносчиков. Это энергезависимость, селективность в отношении L-изомеров и зависимость от температуры. Кроме того, на эффективность транспорта оказывают влияние генетические дефекты компонентов транспортных систем, обнаруженные у людей.

На основе генетического анализа и экспериментальных данных, полученных при исследовании транспорта аминокислот, было выявлено по меньшей мере шесть различных транспортных систем для L-аминокислот, которые локализованы в мембранах щеточной каемки энтероцитов. Эти транспортные системы различаются по специфичности, проявляемой к преимущественному переносу определенных групп аминокислот, а именно:

- ◆ нейтральных аминокислот с короткой или полярной боковой цепью (Ser, Thr, Ala);
- ◆ нейтральных аминокислот с ароматической или гидрофобной боковой цепью (Phe, Tyr, Met, Val, Ile, Leu);
- ◆ иминокислот (Pro, окси-Pro);
- ◆ β-аминокислот (β-Ala, таурин);
- ◆ основных аминокислот и цистина (Lys, Arg, Cys-Cys);
- ◆ кислых аминокислот (Asp, Glu).

Как следует из рис. 3.20, механизм трансэпителиального транспорта L-аминокислот, по-видимому, подобен механизму транспорта D-глюкозы. На апикальной поверхности плазматических мембран клеток щеточной каемки были обнаружены Na^+ -зависимые транспортные системы аминокислот и, соответственно, Na^+ -независимые системы идентифицированы на базальной части плазматических мембран эпителиальных клеток тонкого кишечника. Подобно транспорту D-глюкозы, прямым источником энергии для переноса аминокислот служит электрохимический

градиент концентрации ионов Na^+ и, косвенно, энергии гидролиза АТФ. При трансмембранном переносе всасывающиеся аминокислоты никаким химическим модификациям не подвергаются.

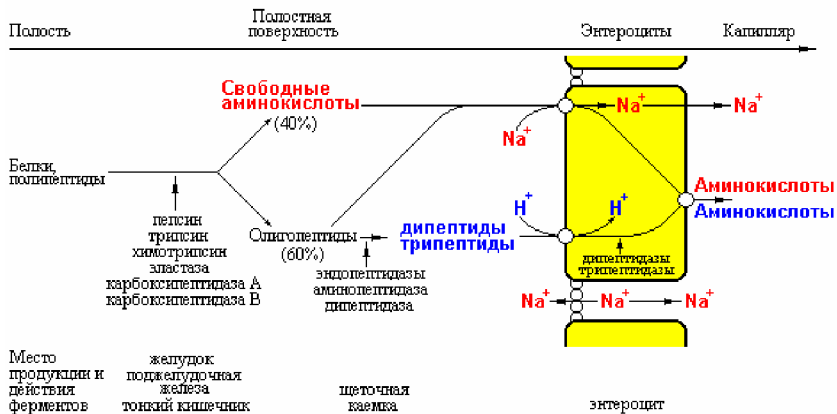


Рис. 3.20. Схема последовательных стадий расщепления белков до аминокислот и коротких пептидов в желудочно-кишечном тракте, а также Na^+ -зависимого транспорта свободных аминокислот и H^+ -зависимого переноса ди- и трипептидов в энтероциты

С другой стороны, всасывание ди- и трипептидов зависит от функционирования H^+ -зависимой транспортной системы. Эти пептиды подвергаются расщеплению под действием олигопептидаз энтероцитов до свободных аминокислот, которые транспортируются в кровь с участием Na^+ -независимых систем базальной мембраны эпителиальных клеток кишечника.

Всасывание интактных белков

Эпителиальные клетки тонкого кишечника плода и новорожденных способны всасывать интактные белки. Поступление белков в клетки происходит посредством *эндоцитоза*. Этот процесс более правильно называть *пиноцитозом* из-за небольших размеров везикул, поступающих внутрь клетки. Полагают, что пиноцитоз белков клетками тонкого кишечника чрезвычайно важен для осуществления переноса антител матери (γ -глобулинов) в организм плода и новорожденного. Пиноцитозное поступление белков несущественно для питания, и поэтому после рождения эффективность процесса снижается. Однако продолжение функционирования пути поступления интактных белков посредством пиноцитоза даже с невысокой эффективностью в неонатальный период может быть необходимым для абсорбции достаточных количеств макромолекул с целью индукции антителообразования.

Ацидурия нейтральных аминокислот (болезнь Хартнупа)

Хорошо известно, что как ферментативные, так и транспортные функции клеток находятся под контролем соответствующих генов, а следовательно, зависят от опосредуемых мутационным процессом изменений. Примером повреждения процесса эпителиального транспорта аминокислот на генетическом уровне является болезнь Хартнупа, названная по имени исследователя, впервые описавшего ее. Заболевание характеризуется неспособностью эпителиальных клеток кишечника всасывать и почек реабсорбировать нейтральные аминокислоты. В почках, где содержащиеся в плазме аминокислоты попадают в просвет проксимальных канальцев за счет ультрафильтрации, неспособность эпителиальных клеток реабсорбировать нейтральные аминокислоты проявляется в экскреции данных соединений с мочой (*аминоацидурия*). Дефект одной из транспортных систем эпителиальных клеток тонкого кишечника приводит к нарушению всасывания свободных аминокислот, происходящих из пищевых белков. Клинические признаки заболевания сходны с проявлениями, которые наблюдаются при существенном дефиците аминокислот (отрицательный азотистый баланс) и никотинамида (нарушения обмена аминокислот – реакции окислительного дезаминирования и нарушения обмена углеводов). В свою очередь дефицит никотинамида определяется острой нехваткой триптофана, который является необходимым предшественником для биосинтеза этого важного компонента кофакторов NAD^+ и NADP^+ .

Обследование пациентов с болезнью Хартнупа показало присутствие в плазматических мембранах эритроцитов функционирующих транспортных систем для ди- и трипептидов и наличие измененных транспортных систем аминокислот. Таким образом, вследствие того, что генетические дефекты компонентов систем транспорта нейтральных аминокислот ограничивают их поступление в организм, транспорт ди- и трипептидов остается практически единственным путем поступления продуктов расщепления пищевых белков в кровь [29].

ЛЕКЦИЯ 4. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

В результате комбинированного действия комплекса протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта осуществляется полный гидролиз пищевых белков до свободных аминокислот. Обычная диета, как правило, включает большой избыток данных соединений. Это означает, что количество поступающих с пищей аминокислот значительно превышает потребности в них клеток и тканей организма, связанные с необходимостью биосинтеза собственных специфических белков и многих важных низкомолекулярных интермедиатов метаболизма. Вместе с тем аминокислотный состав пищевых белков с точки зрения их биологической ценности далеко не всегда идеален, поэтому некоторые метаболические превращения экзогенных аминокислот могут быть направлены на синтез недостающего количества заменимых аминокислот. В этом случае заменимые аминокислоты образуются из других пищевых компонентов – углеводов и жиров, которые поставляют атомы С, О, и Н. Атомы же N, используемые в образовании заменимых аминокислот, необходимых организму, происходят исключительно из аминокислот пищи. С другой стороны, поскольку аминокислоты не способны накапливаться и запасаться в тканях, их избыточное количество либо окисляется до CO_2 и H_2O с образованием энергии, либо после отщепления аминогрупп запасается в виде гликогена и жиров (рис. 4.1).

Из кишечника аминокислоты всасываются в кровь и через портальную вену транспортируются в печень, а также разносятся кровью по всему организму. В печени они используются для синтеза белков гепатоцитов и белков плазмы крови. Поскольку каждая природная аминокислота является уникальным органическим соединением с ярко выраженными биологическими функциями и метаболизмом, неудивительно, что они оказываются необходимыми также для синтеза многих биологически активных веществ (гормонов, биогенных аминов, пептидов) и специфических азотсодержащих соединений (гема, нуклеотидов, кофакторов, креатина и др.). Многие превращения аминокислот происходят в печени, поэтому можно утверждать, что именно этот орган ответствен главным образом за регуляцию пула свободных аминокислот в организме. Основные направления метаболических путей, связанных с превращениями аминокислот, показаны на рис. 4.1.

Как уже указывалось, определенное количество атомов N, принадлежащих аминокислотам экзогенных аминокислот, используется для повторного синтеза этих важнейших соединений или в других зависящих от аминокислот синтетических процессах. Однако большая часть азота, высвобождающегося в результате деградации избыточных аминокислот, превращается в мочевины и экскретируется почками. Синтез мочевины

осуществляется в печени, которая ответственна также за биосинтез заменимых аминокислот. В печени протекают и процессы деградации всех экзогенных аминокислот.

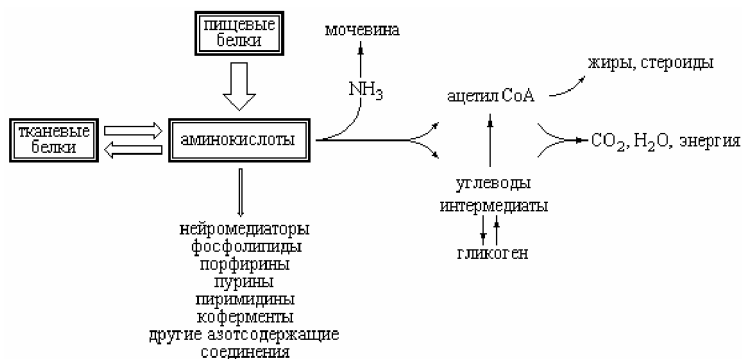


Рис. 4.1. Схема основных направлений метаболических путей, участвующих в формировании и утилизации пула свободных протеиногенных аминокислот

Общие реакции аминокислот

Аминокислоты, не используемые непосредственно для ресинтеза тканевых белков, подвергаются дальнейшим превращениям, совокупность которых описывается как промежуточный обмен аминокислот. Условно промежуточный обмен этих соединений подразделяют на *общие пути обмена аминокислот* и *специфические пути распада и синтеза индивидуальных аминокислот*. К общим относят метаболические пути обмена, включающие реакции *декарбоксилирования*, *переаминирования*, *окислительного дезаминирования*, а также некоторые реакции, приводящие к образованию продуктов промежуточного обмена веществ в организме человека. Поскольку реакции переноса аминогрупп с аминокислоты на соответствующую α -кетокислоту являются наиболее универсальными, рассмотрение общих путей деградации аминокислот целесообразно начать именно с процесса *трансаминирования*.

Трансаминирование аминокислот связано с переносом аминогруппы на акцептор

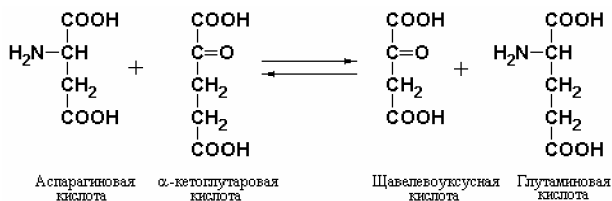
Реакции трансаминирования, катализируемые ферментами *семейства трансаминаз*, называемых также *аминотрансферазами*, являются общими реакциями как для катаболических, так и анаболических путей промежуточного обмена аминокислот. Принцип реакций трансаминирования состоит в переносе аминогруппы от α -аминокислоты (без промежуточного образования свободного аммиака) на α -кетокислоту с образованием новой α -кето- и новой α -аминокислоты.

В количественном отношении перенос аминогрупп на α -кето-кислоты является наиболее важной реакцией метаболизма аминокислот. Реакции *трансаминирования* чрезвычайно важны для синтеза заменимых аминокислот, для процессов распада аминокислот и обмена аминогрупп. Трансаминирование обнаружено *in vivo* для всех основных аминокислот, за исключением *лизина, треонина и пролина*.

Приоритет открытия реакций трансаминирования принадлежит российским биохимикам А. Е. Браунштейну и М. Г. Крицман. В 1937 году этими авторами было обнаружено, что из глутаминовой и пировиноградной кислот с большой скоростью образуются α -кетоглутаровая кислота и аланин, причем было замечено, что эта реакция протекает без промежуточного образования свободного аммиака. Поскольку в реакционной смеси аммиак не обнаруживался, напрашивалось заключение о том, что реакция осуществляется путем переноса аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту.

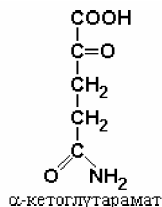
Наиболее изученным ферментом семейства трансаминаз является *цитоплазматическая аспартаттрансаминаза*. Кроме цитоплазматической аспартаттрансаминазы похожий, но другой фермент был обнаружен в митохондриях. Большинство трансаминаз специфичны к α -кетоглутаровой или глутаминовой кислотам в качестве одного из субстратов реагирующей пары. Специфичность же различных трансаминаз к другому субстрату (амино- или кетокислоте) может быть как строгой, так и широкой.

В любом случае аминокислота и соответствующая ей кетокислота находятся в равновесии с α -кетоглутаратом и глутаминовой кислотой:



Поскольку константа равновесия данной реакции близка к 1, фактическое равновесие реакции переаминирования определяется реально действующими концентрациями субстратов, которые в свою очередь зависят от множества клеточных процессов продукции или расхода этих соединений.

Некоторые трансаминазы вместо *глутаминовой кислоты* используют в качестве субстрата *глутамин*. В этом случае в реакции трансаминирования образуется совсем другой продукт – *α -кетоглутарамат*.



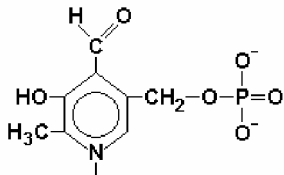
Использование аминокислот, меченых ^{15}N , позволило сформулировать концепцию *динамического равновесия*, отра-

жающую стационарное состояние, в котором находится обмен атомами азота между отдельными аминокислотами. В условиях *in vivo* именно трансаминазы ответственны за активное перераспределение аминогрупп между аминокислотами.

Активность трансаминаз зависит от присутствия кофактора, представленного *пиридоксальфосфатом*.

Кофермент связан с белком ионными взаимодействиями, вдобавок альдегидная группа пиридоксальфосфата образует Шиффово основание с ε-аминогруппой лизина в активном центре белковой молекулы. Механизм реакции переаминирования приведен на рис. 4.2.

Данная схема показывает первую стадию реакции трансаминирования – образование интермедиата, представленного Шиффовым основанием кофактора и аминокислоты-субстрата. В результате внутримолекулярной перестройки этого интермедиата происходит освобождение кетокислоты и образование связанного с ферментом пиридоксаминфосфата, который представляет собой форму фиксации аминогруппы.



Пиридоксальфосфат

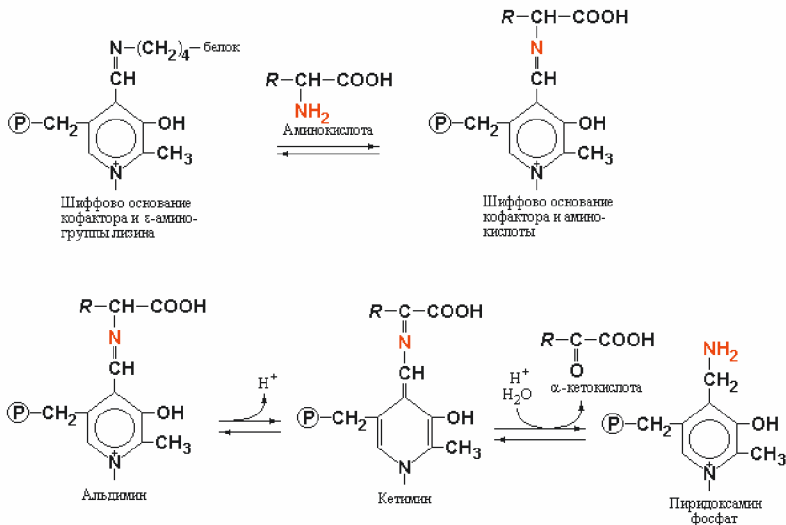
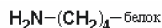


Рис. 4.2. Механизм реакции трансаминирования, предложенный А. Браунштейном и Э. Снеллом

При взаимодействии пиридоксаминфосфата с другой кетокислотой за счет обращения реакции образуется новая аминокислота. Таким обра-

зом, в процессе переаминирования кофермент выполняет функцию переносчика аминогруппы.

Поскольку, как указывалось ранее, константа равновесия реакций переаминирования практически равна единице, данные реакции легко обратимы, что позволяет трансаминазам функционировать и в процессах катаболизма, и в процессах биосинтеза аминокислот. Следовательно, реакции трансаминирования оказываются чрезвычайно важными для синтеза заменимых аминокислот, для процессов распада аминокислот и обмена аминогрупп. Действительно, в результате функционирования трансаминаз происходит образование *десяти заменимых* аминокислот из соответствующих α -кетоналогов.

Окислительное дезаминирование аминокислот. Глутаматдегидрогеназа

Избыток аминокислот относительно того количества, которое необходимо для синтеза тканевых белков, в отличие от жирных кислот и глюкозы, не может запасаться или выделяться в неизменном виде из организма. Экзогенные аминокислоты используются как метаболическое топливо, при этом α -аминогруппы отщепляются от углеродного скелета. Большинство аминогрупп избыточных аминокислот расходуется на образование мочевины, тогда как их углеродные скелеты превращаются в ацетил-S-CoA или сукцинил-S-CoA.

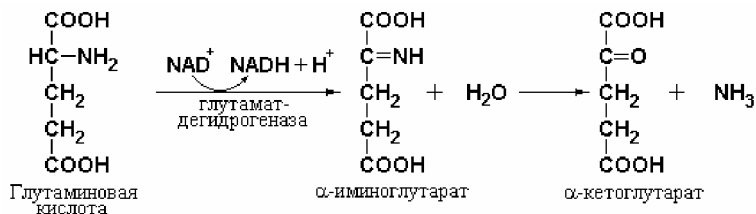
Основным ферментом, обеспечивающим в конечном итоге отщепление аминогрупп от большинства аминокислот, является *глутаматдегидрогеназа*. Функционирование данного фермента теснейшим образом связано с активностью трансаминаз – *аспараттрансаминазы* и *аланин-трансаминазы*. Как уже отмечалось, α -аминогруппы большинства аминокислот переносятся на α -кетоглутарат с образованием глутаминовой кислоты. Это очень важно, так как глутаминовая кислота является единственной аминокислотой в тканях млекопитающих, которая может с существенной скоростью подвергаться окислительному дезаминированию с высвобождением аммиака (NH_4^+). Реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой, показана ниже:



Характерной особенностью данного фермента является его способность использовать в качестве кофакторов как NAD^+ , так и NADP^+ .

Приведенная реакция представляет собой лишь брутто-выражение процесса. В действительности механизм реакции окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты намного сложнее. В такой реакции аминогруппа окисляется вначале до иминогруппы с образованием α -иминокислоты, при этом восстановительные эквиваленты переносятся на NAD^+ или NADP^+ . На второй стадии α -иминокислота неферментативно

присоединяет воду и превращается в соответствующую α -кетокислоту с потерей α -аминного азота в виде NH_4^+ :



При нейтральном значении pH равновесие реакции сдвинуто в сторону образования глутамата. Однако в физиологических условиях, при которых за продукты реакции (NADH и α -кетоглутарат) конкурируют другие ферменты – NADH-оксидаза и α -кетоглутаратдегидрогеназа соответственно, реакция идет в сторону эффективного окисления глутаминовой кислоты. Естественно, что удаление любого из продуктов реакции будет сдвигать равновесные концентрации других реагентов. Поскольку *in vivo* большая часть кофакторов (NADH или NADPH) находится в окисленном состоянии, аммиак постоянно выводится из клетки, а внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты превышает 10^{-3} М, – все вместе это создает условия, благоприятные для окислительного дезаминирования глутамата.

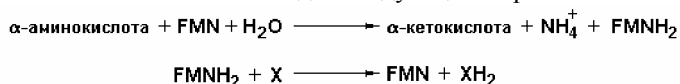
Глутаматдегидрогеназа, локализованная в матриксе митохондрий клеток печени и почек, является сложным белком, состоящим из шести идентичных субъединиц с молекулярной массой 56 000 Да каждая. Фермент характеризуется аллостерической регуляцией активности при действии разных групп веществ. Активаторами фермента являются GDP и ADP, в то время как GTP и ATP ингибируют глутаматдегидрогеназу. Менее активная форма фермента проявляет также слабую аланиндегидрогеназную активность. Указанные свойства глутаматдегидрогеназы свидетельствуют о том, что в тех случаях, когда аминокислоты необходимы в качестве метаболического топлива, активность фермента возрастает. С другой стороны, при повышении уровня нуклеозидтрифосфатов в клетке активность фермента снижается [30].

Оксидазы аминокислот

В печени и почках млекопитающих происходит окислительное превращение экзогенных аминокислот в соответствующие кетокислоты. Большая часть активности в отношении L-аминокислот обусловлена совместным действием трансаминаз и глутаматдегидрогеназы. Однако в этих органах присутствуют еще два фермента, называемые оксидазами D- и L-аминокислот, которые окисляют соответственно D- и L-аминокислоты до α -кетокислот и аммиака с использованием молекулярного

кислорода, в качестве акцептора электронов. Оксидазы аминокислот являются *автоокисляемыми флавопротеидами*, поскольку их восстановленные кофакторы – FAD^+ или FMN – окисляются непосредственно молекулярным кислородом (без участия цитохромов или каких-либо других электрон-транспортных белков). В ходе этих реакций кислород восстанавливается до пероксида водорода – H_2O_2 . Оксидаза D-аминокислот, обладающая чрезвычайно высокой активностью, содержит в качестве кофактора FAD^+ . Оксидаза L-аминокислот характеризуется намного меньшей активностью и зависит от FMN. Эти ферменты не метаболизируют некоторые аминокислоты с заряженной боковой цепью, но, с другой стороны, все же проявляют достаточно широкую субстратную специфичность.

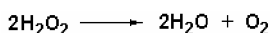
Оксидаза L-аминокислот может также окислять α -оксикислоты. В условиях *in vitro* данные флавопротеиды могут использовать не только молекулярный кислород как акцептор электронов, но и другие окислители, например краситель метиленовый голубой. В этом случае реакция окисления аминокислоты выглядит следующим образом:



В тех случаях, когда окислителем выступает O_2 , одним из продуктов реакции является перекись водорода.



Данное агрессивное соединение эффективно расщепляется в печени и почках под действием чрезвычайно активного фермента каталазы.



На рис. 4.3 показана общая схема окислительного дезаминирования аминокислот, катализируемого оксидазой L-аминокислот.

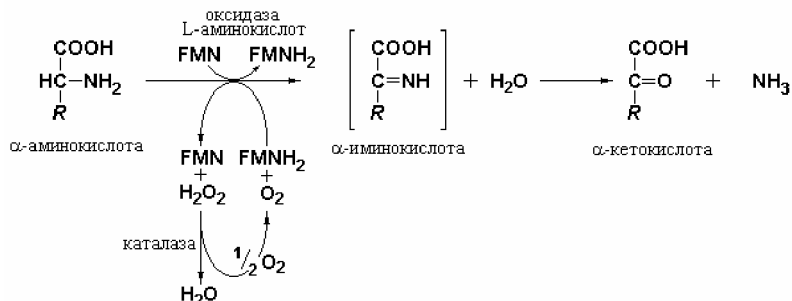


Рис. 4.3. Окислительное дезаминирование, катализируемое оксидазой L-аминокислот. Указанная в квадратных скобках α -иминокислота является нестабильным интермедиатом, который в присутствии воды превращается в α -кетокислоты с образованием NH_3

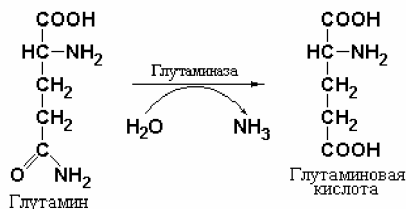
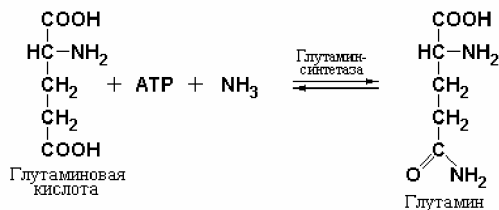
В отсутствие каталазы образующаяся α -кетокислота может декарбоксилироваться неферментативно пероксидом водорода с образованием карбоновой кислоты, имеющей на один атом углерода меньше. Впрочем, маловероятно, чтобы такое декарбоксилирование играло заметную роль в интактных тканях человека.

Реакции аммиака

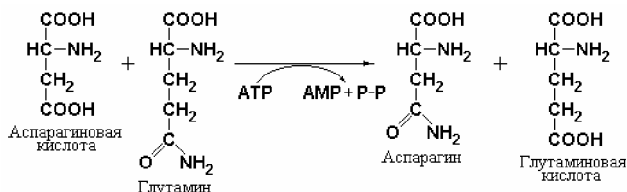
Конечными продуктами распада аминокислот в организме при высоком содержании белка в пищевом рационе являются аммиак, мочевины, углекислый газ и вода. Один из продуктов распада – аммиак – соединение, высокотоксичное для центральной нервной системы, и накопление его в больших количествах представляло бы серьезную опасность для организма. Симптомами *аммиачного отравления* являются своеобразный тремор, нечленораздельная речь, затуманивание зрения, а в тяжелых случаях отравления – коматозное состояние и летальный исход. Эти симптомы подобны тем, которые характерны для *синдрома печеночной комы*, развивающейся при повышении концентрации аммиака в крови и мозге (см. далее).

Большая часть аммиака устраняется при помощи ряда специфических реакций, в результате которых он превращается в нетоксические соединения, подлежащие экскреции. Однако в некоторых случаях связывание аммиака сопровождается синтезом важнейших метаболитов. В организме постоянно протекают реакции синтеза пуриновых колец, присоединение аминокрупп к пиримидинам с образованием цитозина, а также реакции образования аминокислот. Все эти процессы зависят от промежуточного образования *глутамин*, который синтезируется из глутаминовой кислоты и аммиака с участием *глутаминсинтетазы*. Глутамин, являющийся амидом глутаминовой кислоты, представляет собой одну из 20 протеиногенных аминокислот, необходимых для синтеза белка. Кроме того, в почках глутамин является основным источником экскретируемого аммиака. Таким образом, аммиак переносится в кровь в виде нетоксичного, неионизованного амида, который играет важную роль в регуляции рН мочи за счет нейтрализации кислых продуктов обмена аммиаком, высвобождаемым при простом гидролизе амидной группы под действием почечной *глутаминазы*.

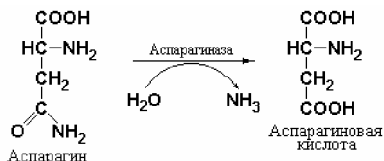
Именно по этой причине уровень глутамин в крови обычно превосходит содержание любой другой аминокислоты. Итак, аммиак, выделяемый при деградации аминокислот в печени, становится доступным в виде глутамин для других органов, отвечающих за синтез пуринов, пиримидинов и других соединений.



Глутамин также поставляет амидные группы для синтеза другого гомолога – аспарагина. Данная реакция является энергозависимой. АТФ необходим для активации β-карбоксильной группы аспартата.



В настоящее время не известно, имеет ли аспарагин какое-либо другое назначение у млекопитающих и человека, кроме как одна из аминокислот, необходимых для синтеза белка. Вместе с тем установлено, что некоторые быстро делящиеся лейкемические клетки утрачивают способность синтезировать аспарагин и зависят от уровня данного амида в крови. Такие предпосылки являются молекулярной основой возможного терапевтического использования *аспарагиназы*, катализирующей реакцию удаления амидной группы из аспарагина.



Использование аспарагиназы позволит лишить неопластические клетки необходимых количеств аспарагина, за счет резкого снижения уровня этого соединения в сыворотке крови [31].

Цикл мочевины

Как уже указывалось, некоторая часть NH_4^+ , образующегося при расщеплении аминокислот, расходуется на биосинтез азотистых соединений. У большинства наземных животных и у человека около 80 % азота экскретируется в виде мочевины. У птиц и пресмыкающихся NH_4^+ превращается в мочевую кислоту, которая и выделяется из организма, тогда как у многих водных животных он экскретируется как таковой. Эти три группы организмов носят название *уротелических*, *урикотелических* и *аммонотелических* соответственно.

У наземных животных и человека мочевина синтезируется в *цикле мочевины*. Эту последовательность реакций впервые описали Ганс Кребс и Курт Хензеляйт в 1932 году (по этой причине цикл мочевины носит название цикла Кребса–Хензеляйта). Цикл мочевины является в сущности первым обнаруженным циклическим метаболическим путем. Один из атомов азота мочевины происходит из аммиака, другой – из аспарагиновой кислоты. Углеродный атом мочевины происходит из CO_2 . Переносчиком этих атомов в цикле служит аминокислота *орнитин*, поэтому другое название цикла мочевинообразования – *орнитиновый цикл*.

Расщепление аминокислот интенсивно происходит во всех органах и тканях человека, однако основная часть мочевины синтезируется в печени. Значение этого органа в обмене азота можно проиллюстрировать на примере явлений *гипераммониемии* и *гепатической комы*.

Синдром гепатической комы является следствием увеличения уровня аммиака в крови (гипераммониемия), превышающего нормальную концентрацию NH_4^+ , составляющую 30–60 μM . Потеря сознания вызывается резкой нехваткой АТФ в мозге. Дело в том, что аммиак способен проникать через гематоэнцефалический барьер и сдвигать равновесие реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой, в сторону образования глутаминовой кислоты, что в свою очередь вызывает снижение концентрации α -кетоглутарата, необходимого для нормального функционирования цикла трикарбоновых кислот.



Гипераммониемия, как правило, вызывается неспособностью ферментных систем пациентов обеспечивать образование мочевины с необходимой скоростью для поддержания физиологической концентрации аммиака в крови. Во многих случаях к возникновению данного состояния причастны нарушения структуры ферментов цикла мочевины. Иногда транзиторная (преходящая) гипераммониемия отмечается у новорожденных при задержке синтеза ферментов цикла мочевины в онтогенезе.

Проявления гипераммониемии могут также наблюдаться в тех случаях, когда происходит нарушение нормального кровотока через печень. Переключение циркуляции крови от портальной системы на довольно интенсивный второстепенный кровоток через нижнюю полостную вену в

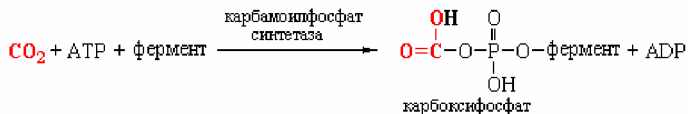
обход печени может иметь место в случае цирроза данного органа. В некоторых случаях такой тип нарушения кровотока в печени устраняется хирургическим путем посредством шунтирования.

Выведение избытка азота с целью некоторой компенсации описанных выше нарушений обмена NH_4^+ может быть обеспечено за счет альтернативных реакций связывания аммиака. В этом случае удаление азота осуществляется благодаря направленному образованию экскретирующихся аминокислот – *глицина* и *глутамина* – в ходе так называемых *анаплеротических* (запасных) реакций. Биохимической основой анаплеротических реакций выведения избытка азота является способность α -кетоглутарата связывать два эквивалента аммиака с образованием глутамина, а также возможность синтеза глицина из аммиака и CO_2 под действием *глицинсинтазы* (см. лекцию 5). При этом осторожное введение органических ароматических кислот – бензойной и/или фенилуксусной – сопровождается образованием их конъюгатов с данными аминокислотами, что может компенсировать нарушения цикла мочевины и предотвращать токсичное действие аммиака (см. далее).

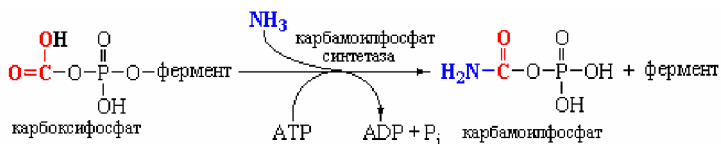
Другой подход к лечению людей, страдающих нарушениями цикла мочевины, состоит в замене в диете некоторых аминокислот на их α -кетоаналоги с тем, чтобы уменьшить поступление азота в организм и направить аминокруппы не на экскрецию, а на синтез необходимых аминокислот для биосинтеза тканевых белков.

Образование карбамоилфосфата – необходимая предпосылка функционирования цикла мочевины

Фактически цикл мочевины начинается с образования цитруллина из диаминокарбоновой кислоты орнитина посредством добавления к последнему NH_3 и CO_2 . Эта реакция зависит от предварительного синтеза *карбамоилфосфата* под действием *карбамоилфосфатсинтазы*, которая локализована в митохондриях гепатоцитов всех уреотетелических организмов, включая человека. В реакции, катализируемой карбамоилфосфатсинтазой, одна молекула АТФ активирует молекулу CO_2 с образованием связанного с ферментом *карбоксифосфата*:



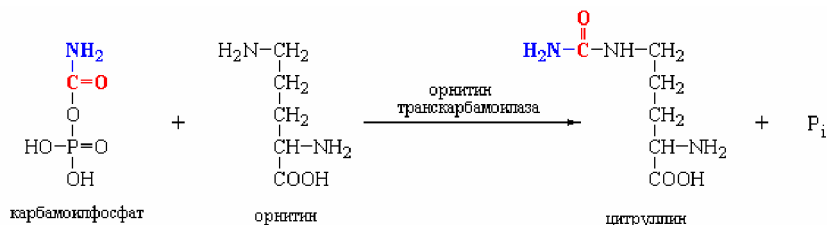
На второй стадии карбоксифосфат реагирует с аммиаком с образованием *карбамата*:



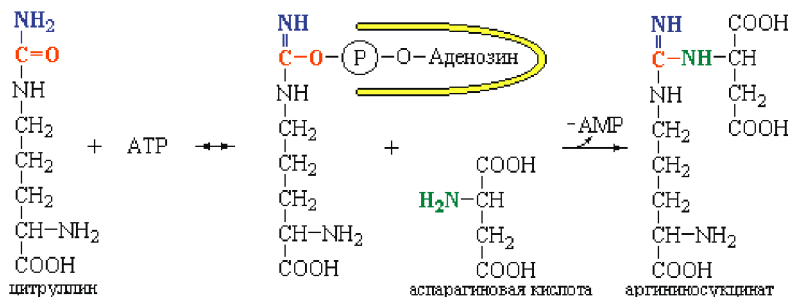
При этом затрачивается вторая молекула АТФ, которая реагирует со связанным с ферментом интермедиатом, что сопровождается высвобождением карбамоилфосфата. Изучение процесса образования мочевины позволило доказать, что в клетках печени присутствуют две различные карбамоилфосфатсинтетазы.

Карбамоилфосфатсинтетаза I является составной частью матрикса митохондрий гепатоцитов, участвует в функционировании орнитинового цикла и зависит от присутствия специфического активатора – N-ацилированного глутамата (N-ацетилглутамата). Цитоплазматическая форма карбамоилфосфатсинтетазы, обозначаемая как карбамоилфосфатсинтетаза II, участвует в биосинтезе пиримидинов и не зависит от ацилированного глутамата в качестве активатора.

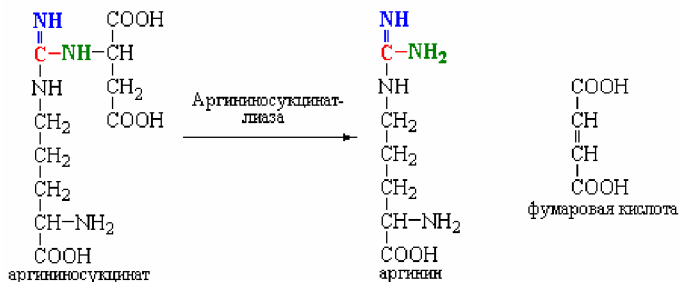
Цитруллин образуется при переносе карбамоильной группы от фосфорилированного производного на δ-аминогруппу орнитина. Реакция катализируется орнитинтранскарбамоилазой и протекает в митохондриях. Реакция высокоспецифична к орнитину, равновесие ее сильно сдвинуто в направлении синтеза цитруллина. Далее образовавшийся цитруллин переносится из митохондрий в цитоплазму гепатоцитов.



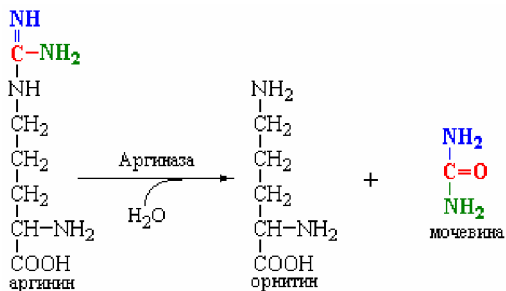
На следующей стадии под действием аргининосукцинатсинтетазы происходит взаимодействие цитруллина с аспарагиновой кислотой.



Следующая стадия зависит от *аргининосукцинатлиазы*, катализирующей реакцию образования аргинина. Вторым продуктом реакции является фумаровая кислота – один из интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Реакция протекает по механизму *трансэлиминирования*. Образовавшийся фумарат может превратиться в щавелевоуксусную кислоту, которая при переаминировании дает аспарагиновую кислоту.



Цикл мочевины завершается гидролизом аргинина до орнитина и мочевины в реакции, катализируемой *аргиназой*.



Аргиназа является тетрамерным белком, активность которого зависит от присутствия ионов Ca^{+2} или Mn^{+2} . Этот фермент широко распространен в организме. Он обнаружен в мозге, почках и других органах, где образование орнитина из аргинина пищевых белков может иметь даже большее значение, чем образование мочевины.

Орнитин, образованный из аргинина, в орнитиновом цикле транспортируется в митохондрии, реагирует с карбамоилфосфатом и начинает следующий раунд синтеза мочевины.

Мочевина диффундирует в кровь и выводится почками. Это соединение не играет никакой роли в метаболизме человека. Однако у растений и микроорганизмов был обнаружен фермент – *уреаза*, который гидролизует мочевину до CO_2 и двух молекул NH_3 . Часть мочевины, синтезируемой в орнитиновом цикле, может диффундировать в кишечник и подвергаться полной деградации с участием *уреазы* кишечной флоры с образованием NH_3 , который вступает в рециклинг в печени. Этот путь

приобретает существенное значение в случае почечной недостаточности, когда очень большие количества мочевины могут поступать в кишечник.

Ранее упоминалось, что высокая концентрация NH_4^+ токсична для человека. Повышение содержания NH_4^+ в крови токсично в силу уже упоминавшихся причин – снижения уровня и скорости образования АТФ в мозге. Мозг же отличается чрезвычайно высокой чувствительностью к снижению содержания АТФ. Поэтому полное блокирование какой-либо стадии цикла мочевины вообще несовместимо с жизнью. Недостаточность или дефект какого-либо из ферментов цикла мочевины в неонатальный период служит причиной развития синдрома печеночной комы и неизбежно приводит к смерти вскоре после рождения.

Регуляция цикла мочевины

Цикл мочевины функционирует с единственной целью – удалить из организма избыток азота в виде аммиака. Избыточные количества аммиака всегда образуются при метаболизме аминокислот, не включаемых непосредственно в процессы биосинтеза белка. Лишь некоторые азотистые соединения пищи, такие как пурины, пиримидины, креатин и никотиновая кислота, включаются в обмен азота, не расщепляясь до аммиака.

В целом способ питания не влияет на процессы деградации избытка аминокислот. Независимо от того, используются ли углеродные скелеты аминокислот для генерирования АТФ или запасаются в виде жира и гликогена, аминогруппы этих соединений высвобождаются в виде аммиака, который должен быть выведен из организма. В состоянии азотистого равновесия количество образуемой мочевины служит показателем так называемого «метаболического износа» – непонятной пока комбинации гибели клеток и их регенерации, обмена белка с частичной, но никогда полной реутилизацией аминокислот. Эти метаболические процессы протекают даже при дефиците белка в жировой и углеводной диете, при этом образование мочевины никогда не прекращается. В любом случае скорость образования мочевины должна строго регулироваться в ходе удаления из организма потенциально токсичного аммиака, который постоянно образуется из аминокислот пищевых белков [32].

Общий контроль цикла мочевины обеспечивается изменением количества того или иного фермента цикла на генетическом уровне. Известно, что в различных ситуациях уровень отдельных ферментов цикла мочевины может изменяться в 10–20 раз.

Длительное голодание, сопровождающееся расщеплением мышечных белков, что также связано с необходимостью выведения аммиака, способствует увеличению в печени уровня ферментов орнитинового цикла.

Тонкая регуляция цикла, по-видимому, происходит на уровне образования карбамоилфосфата (рис. 4.4). *Карбамоилфосфатсинтетаза I* практически неактивна в отсутствие ее специфического аллостерического

наружен в мозге, почках и других органах), – происходит образование орнитина из аргинина пищевых белков, что может иметь даже большее значение для этих органов, чем участие орнитина в детоксикации аммиака путем синтеза мочевины. Известно также, что в клетках слизистой тонкого кишечника синтез орнитина дополнительно может осуществляться из глутаминовой кислоты. Вместе с тем при нормальной диете клетки получают достаточное количество аргинина для поддержания требуемой концентрации орнитина. Общая схема цикла мочевинообразования приведена на рис. 4.5.

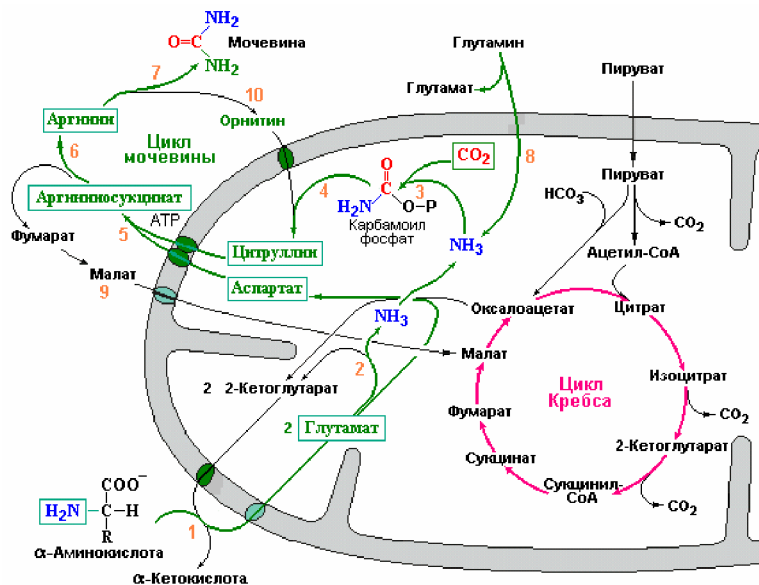
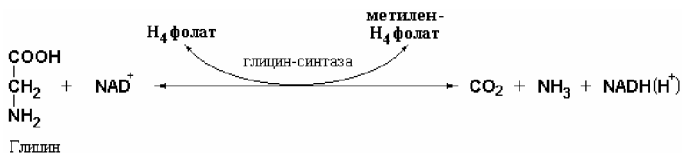


Рис. 4.5. Интеграция цикла мочевинообразования с обменом веществ в митохондриях. Зелеными стрелками показано направление потока атомов азота от аминокислот при их дезаминировании или удаление азота из боковых цепей глутаминна [15]

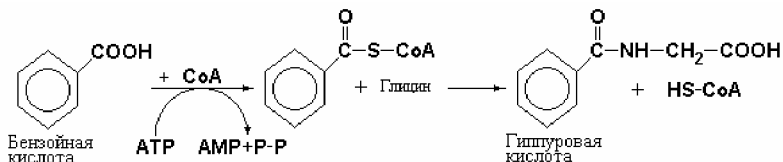
Альтернативные реакции выведения избытка азота

Многие органические кислоты способны экскретироваться в виде конъюгатов с аминокислотами. Это явление было использовано для разработки теста на функциональное состояние печени, который заключается в превращении бензойной кислоты в гиппуровую кислоту. В ходе данной реакции происходит активация карбоксильной группы бензойной кислоты при ее взаимодействии с HS-CoA с образованием бензоил-S-CoA.

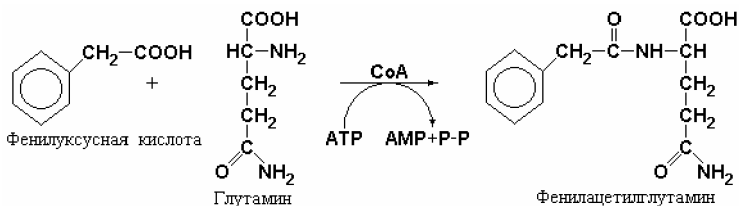
Впоследствии активированная карбоксильная группа переносится на глицин, синтезирующийся из CO_2 и NH_4^+ под действием *глицинсинтазы*.



В результате переноса бензоил-СоА на глицин происходит образование коэнзима А и гиппуровой кислоты, которая выводится с мочой.



Сходная реакция имеет место между гомологом бензойной кислоты – фенилуксусной кислотой и глутамином. Отличие этой реакции заключается в отсутствии накопления интермедиата, представляющего собой тиоэфир с СоА. Тем не менее реакция также зависит от присутствия СоА, но карбоксильная группа фенилуксусной кислоты взаимодействует с α -аминогруппой глутамина.



Эти реакции не имеют большого значения при нормальном метаболизме, но могут играть большую роль при введении ароматических кислот с целью удаления избытка NH_4^+ при нарушениях орнитинового цикла [33].

Наследственные дефекты ферментов цикла мочевины

Значение нормального функционирования цикла мочевины в организме человека трудно переоценить. Известно, что новорожденные с полным отсутствием одного или нескольких ферментов цикла живут всего несколько дней. Многие синдромы, связанные с дефицитом тех или иных ферментов, были идентифицированы и описаны благодаря тому, что эти ферменты все же проявляли некоторую активность. Проведение аналогии с другими мутациями позволяет сделать вывод, что в первую очередь нарушения активности ферментов цикла мочевины связаны с из-

менением величины K_m , но не V_{max} . Однако охарактеризовать более подробно мутации генов, кодирующих эти важнейшие белки у человека, довольно сложно [32].

Вместе с тем в настоящее время уже охарактеризованы основные синдромы, связанные с дефицитом каждого из ферментов цикла мочевины. Разрыв цикла в какой-либо точке по-разному влияет на метаболизм азота, поскольку некоторые интермедиаты могут диффундировать из гепатоцитов, накапливаться в крови и попадать в мочу. Поэтому симптомы, прогнозы и терапия при дефиците различных ферментов отличаются. В целом описано несколько довольно часто встречающихся заболеваний, которые проявляются в задержке умственного развития или сопровождаются комой и смертью в раннем возрасте.

N-ацетилглутаматсинтетаза

Значение активатора карбамоилфосфатсинтетазы было обнаружено при обследовании новорожденных с гипераммониемией и общей гипераминноацидезией. У этих новорожденных клетки печени не обеспечивали какого-либо заметного синтеза *N*-ацетилглутамата. В таких случаях нормальный обмен азота можно поддерживать с помощью диеты, содержащей низкое количество белка, и введением *карбамоилглутамата* – аналога *N*-ацетилглутамата, который также служит активатором *карбамоилфосфатсинтетазы*.

Карбамоилфосфатсинтетаза

В тех случаях, когда у младенцев уровень синтеза карбамоилфосфатсинтетазы составляет 0–50% от нормального содержания фермента в гепатоцитах, также отмечается развитие гипераммониемии. Этим младенцам вводят бензойную кислоту с фенилацетатом, которые достаточно эффективно снимают проявления гипераммониемии [33]. Весьма полезно добавление в низкобелковую диету аргинина, который стимулирует синтез *N*-ацетилглутамата, а последний в свою очередь обеспечивает образование достаточного количества карбамоилфосфата даже при низком уровне фермента в клетках печени. Вообще нехватка карбамоилфосфатсинтетазы сопровождается задержкой умственного развития, которое может быть следствием гипераммониемии в течение определенного контролируемого периода.

Орнитинтранскарбамоилаза

Большая часть заболеваний, связанных с нарушениями цикла мочевины, определяется дефицитом или утратой *орнитинтранскарбамоилазы*. Ранняя смерть может быть предотвращена удалением избытка аммиака, а дальнейшее его накопление устраняется теми же мероприятиями, которые предпринимаются при лечении заболевания, связанного с нехваткой карбамоилфосфатсинтетазы.

Генетический анализ повреждения орнитинтранскарбамоилазы показал, что ген этого белка расположен в X-хромосоме. Поэтому данное заболевание чаще встречается у мальчиков, чем у девочек, у которых в гетерозиготном состоянии повреждение гена не приводит к проявлению симптомов болезни. Кроме аммиака и аминокислот в крови повышается содержание оротовой кислоты. Появление оротата объясняется тем, что избыток карбамоилфосфата проникает в цитоплазму гепатоцитов, где он взаимодействует с аспарагиновой кислотой и приводит к накоплению оротовой кислоты.

Аргининосукцинатсинтетаза

Нехватка данного фермента цикла мочевины приводит к накоплению цитруллина в крови, что сопровождается цитруллинемией. В некоторых случаях большая часть азота выводится именно в виде цитруллина. Кроме ограничения содержания белка в диете терапия этого заболевания основана на дополнительном введении аргинина, необходимого для синтеза белка и синтеза креатина и орнитина, потребность в котором определяется не только функционированием цикла мочевины.

Аргининосукцинатлиаза

При этом виде нарушений работы орнитинового цикла у пациентов с мочой выводится очень большое количество аргининосукцината. Данное заболевание протекает с таким количеством симптомов, что часто бывает сложно подобрать эффективное лечение. Тем не менее ограничение белка, введение бензойной кислоты, фенилацетата и аргинина довольно часто приводят к желаемому результату [33].

Аргиназа

Дефицит аргиназы представляет собой очень редкое заболевание, которое сопровождается различными и многочисленными нарушениями развития и функций центральной нервной системы. При этом заболевании в больших количествах накапливается и выводится не только аргинин, но и его предшественники, а также продукты обмена.

Терапию проводят бензоатом натрия и кетоаналогами незаменимых аминокислот [33].

ЛЕКЦИЯ № 5. ОБМЕН ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Исторически изучение нарушений катаболизма аминокислот у человека сыграло ключевую роль в выяснении путей метаболизма аминокислот у здоровых людей. Многие из уже известных и описанных болезней, связанных с дефектами обмена аминокислот, являются редкими, и большинство практикующих врачей с ними не сталкивается. Однако имеется целая категория наследственных заболеваний с ярко выраженной клинической картиной, вызываемых нарушениями распада аминокислот в нервной ткани. Эти заболевания проявляются в силу наиболее высокой скорости обмена аминокислот в нервной ткани по сравнению с другими тканями организма человека. Поэтому разнообразные наследственные *аминоацидопатии* представляют большой интерес для психиатров, педиатров, консультантов-генетиков и биохимиков, поскольку нарушения обмена аминокислот в мозге являются одной из основных причин *слабоумия*. Аминоацидопатии чаще всего проявляются у детей и нередко заканчиваются фатальным исходом в раннем возрасте. При отсутствии соответствующего лечения данные нарушения обмена становятся причиной необратимых изменений мозга.

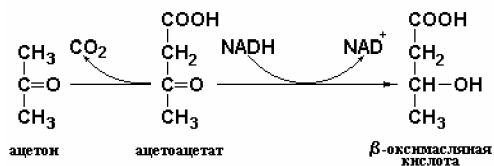
Все сказанное свидетельствует о необходимости разработки методов ранней диагностики той или иной патологии. Поскольку активность ряда ферментов, имеющих отношение к рассматриваемым нарушениям метаболизма, в настоящее время легко тестируется в культуре клеток амниотической жидкости, точный диагноз можно установить еще до рождения путем *амниоцентеза*. Основной принцип лечения в таких случаях заключается в назначении диеты, бедной теми аминокислотами, катаболизм которых нарушен.

Поскольку рассматриваемые метаболические нарушения обусловлены мутациями, приводящими к синтезу соответствующих белков с измененной первичной структурой, наиболее современным способом коррекции генетических дефектов ферментов обмена аминокислот может стать широкое использование технологии рекомбинантных ДНК. В зависимости от характера изменений первичной структуры возникают различные структурные изменения и на других уровнях организации ферментов. Отдельные изменения первичной структуры могут не оказывать какого-либо существенного влияния на активность фермента, тогда как другие изменения способны значительно влиять на трехмерную организацию каталитического или регуляторного центра. Обычно мутантные ферменты (если речь не идет о полной утрате активности) отличаются либо по каталитической эффективности, что выражается в низком значении V_{\max} или высоком K_m , либо по способности связывать аллостерические регуляторы каталитической активности.

В предыдущем разделе был рассмотрен ряд реакций, обеспечивающих удаление из аминокислот α -аминогрупп и превращение последних в мочевины. Стратегия дальнейшего расщепления углеродных скелетов аминокислот состоит в образовании *основных интермедиатов обмена веществ*, которые могут включаться в реакции образования глюкозы или подвергаться последующему окислению в цикле трикарбоновых кислот.

В ходе этих реакций углеродные скелеты двадцати протеиногенных аминокислот направленно превращаются в семь промежуточных соединений: *пировиноградную кислоту, ацетил-S-CoA, ацетоацетил-S-CoA, сукцинил-S-CoA, α -кетоглутаровую кислоту, фумаровую кислоту и щавелевоуксусную кислоту.*

Те аминокислоты, которые расщепляются с образованием ацетил-S-CoA или ацетоацетил-S-CoA, получили название *кетогенных аминокислот*, поскольку в результате их распада увеличивается содержание кетонных тел. Ниже приведена схема, отражающая процессы превращения ацетоуксусной кислоты в ацетон вследствие реакции декарбоксилирования или в β -оксимасляную кислоту в ходе реакции восстановления β -карбонильной группы ацетоацетата



Аминокислоты, распадающиеся до пировиноградной кислоты, α -кетоглутаровой кислоты, сукцинил-S-CoA, фумаровой кислоты или щавелевоуксусной, названы *глюкогенными аминокислотами*. Указанные четыре интермедиата цикла трикарбоновых кислот и пировиноградная кислота могут превращаться в фосфоенолпировиноградную кислоту и затем в глюкозу. В то же время у млекопитающих и человека отсутствуют метаболические пути, которые обеспечивали бы синтез глюкозы из ацетил-S-CoA и ацетоацетил-S-CoA.

Из всех двадцати аминокислот только *лейцин* является исключительно кетогенной аминокислотой. *Изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан* и *тирозин* относятся к кетогенным и глюкогенным аминокислотам одновременно. Остальные четырнадцать аминокислот являются исключительно глюкогенными.

В табл. 5.1 указаны все протеиногенные аминокислоты и отражена взаимосвязь их обмена с обменом углеводов и жиров.

Вполне понятно, что остающийся после отщепления α -аминогруппы углеродный скелет в большинстве случаев представляет собой просто окисленный углеводород, который уже не может быть идентифицирован как специфическое производное какой-либо аминокислоты. Углеродный

скелет подвергается дальнейшей деградации в ходе реакций, подобных реакциям катаболизма других окисленных углеводов, например линейных или разветвленных жирных кислот.

Таблица 5.1. Судьба углеродных скелетов L-α-аминокислот

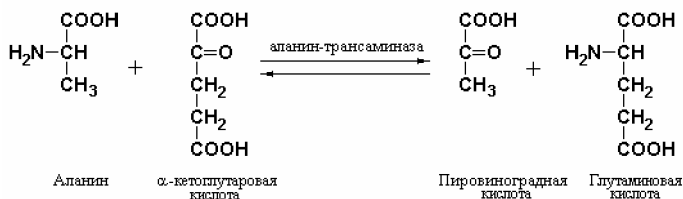
Аминокислоты превращаются в амфиболические интермедиаты, из которых образуются:			
Гликоген (гликогенные аминокислоты)		Жир (кетогенные аминокислоты)	Гликоген или жир (гликогенные или кетогенные аминокислоты)
Ala	Gly	Leu	Ile Lys Phe Trp Tyr
Arg	His		
Asn	Met		
Asp	Pro		
Cys	Ser		
Gln	Thr		
Glu	Val		

Превращения трехуглеродных (C₃) аминокислот аланина, серина, цистеина

Аминокислоты аланин, серин и цистеин, составляющие так называемое семейство C₃-аминокислот, в ходе деградации превращаются в пировиноградную кислоту. Поэтому промежуточное образование пирувата можно рассматривать как «место входа» углеродных скелетов аланина, серина и цистеина в цикл трикарбоновых кислот, что сопровождается в конечном итоге их распадом до CO₂ и H₂O.

Под действием *аланин-трансаминазы* аланин непосредственно включается в образование пировиноградной кислоты при его переаминировании с α-кетоглутаратом.

Концентрация α-кетоглутарата, расходуемого в реакции трансаминирования с аланином, поддерживается на постоянном уровне, как уже известно, в ходе окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты с образованием α-кетоглутаровой кислоты и NH₄⁺.



Аминокислоты серин и треонин дезаминируются прямо под действием *сериндегидратазы* и *треониндегидратазы* соответственно. Эти ферменты, способные осуществлять *реакции прямого дезаминирования*, названы дегидратазами потому, что в катализируемых ими реакциях про-

цессу дезаминирования предшествует дегидратация субстрата. В частности, серин с участием *сериндегидратазы* утрачивает α -атом Н и β -ОН-группу с образованием нестойкого *аминоакрилата*. Последний, реагируя с водой, спонтанно превращается в пировиноградную кислоту с отщеплением NH_4^+ . Схема каталитического действия сериндегидратазы приведена на рис. 5.1.

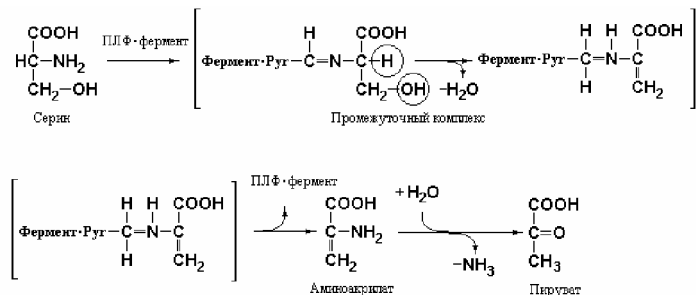
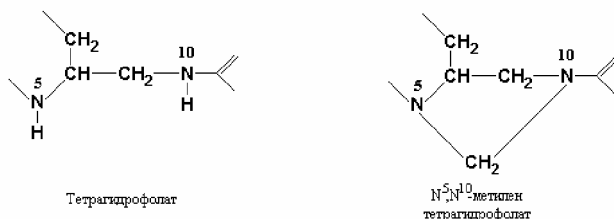
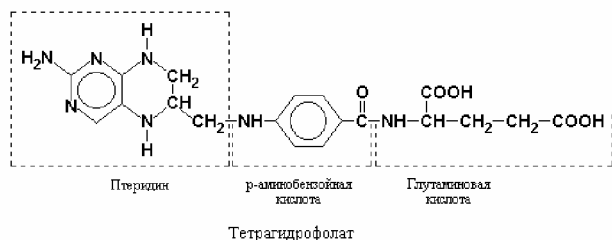


Рис. 5.1. Механизм действия сериндегидратазы: ПЛФ – пиридоксальфосфат, принадлежащий сериндегидратазе [20]

Следует, однако, заметить, что превращение серина в пировуат при участии сериндегидратазы имеет существенное физиологическое значение у крысы и морской свинки (клетки печени этих видов организмов чрезвычайно богаты сериндегидратазой). Деградация серина у человека и многих других млекопитающих осуществляется преимущественно с образованием глицина и $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилентетрагидроfolата. Указанная реакция катализируется *серингидрокси метилтрансферазой* – пиридоксальфосфат-содержащим ферментом, который использует в качестве одного из субстратов другой известный кофактор – тетрагидроfolат.



В ходе этой легкообратимой реакции происходит дегидратация серина с одновременным переносом одноуглеродного фрагмента на тетрагидрофолат. Продуктами реакции в этом случае являются глицин и N⁵, N¹⁰-метилентетрагидрофолат (на приведенном ниже рис. 5.2 – это реакция, идущая справа налево):

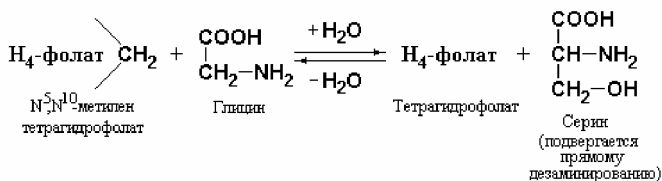


Рис. 5.2. Схема реакции, катализируемой серин-гидроксиметил трансферазой

Из приведенных рассуждений следует, что возможно превращение в пируват и углеродных атомов глицина. Такая возможность действительно реализуется благодаря обратимости реакции превращения серина в глицин под действием *серингидроксиметилтрансферазы* (см. рис. 5.2). При этом метиленовая группа N⁵, N¹⁰-метилентетрагидрофолата переносится на глицин с образованием серина, который в результате прямого дезаминирования под действием сериндегидратазы превращается в пируват.

Не учитывая деталей, можно сказать, что треонин расщепляется тремя основными путями (рис. 5.3). Избыточное количество треонина превращается в пировиноградную кислоту через промежуточное образование *аминоацетона*. Данная реакция катализируется *треониндегидрогеназой* с образованием α-амино-β-кетомасляной кислоты (рис. 5.3, реакция 1), которая спонтанно декарбоксилируется до аминоацетона, а последний превращается в пируват.

Другой путь деградации треонина зависит от активности *треониндегидратазы*. В этом случае, в ходе типичной реакции β-элиминирования, в результате прямого дезаминирования происходит образование интермедиата – α-кетомасляной кислоты (рис. 5.3, реакция 2), которая впоследствии может быть использована для синтеза изолейцина или *пропионил-S-CoA*. У человека треонин деградирует преимущественно с образованием глицина и ацетальдегида. Реакция катализируется *треонинальдолазой* (рис. 5.3, реакция 3). Имеются сведения о том, что глицин и ацетальдегид могут образовываться при расщеплении α-амино-β-кетомасляной кислоты [20, с. 241]. Из ацетальдегида затем образуется ацетил-S-CoA.

Как видно из приведенных реакций, в организме человека глицин образуется в ходе деградации серина, треонина, а также из промежуточного соединения, образующегося в результате дегидрирования треонина, а именно из α-амино-β-кетомасляной кислоты. Последующее окисление

глицина происходит посредством функционирования двух различных ферментативных путей.

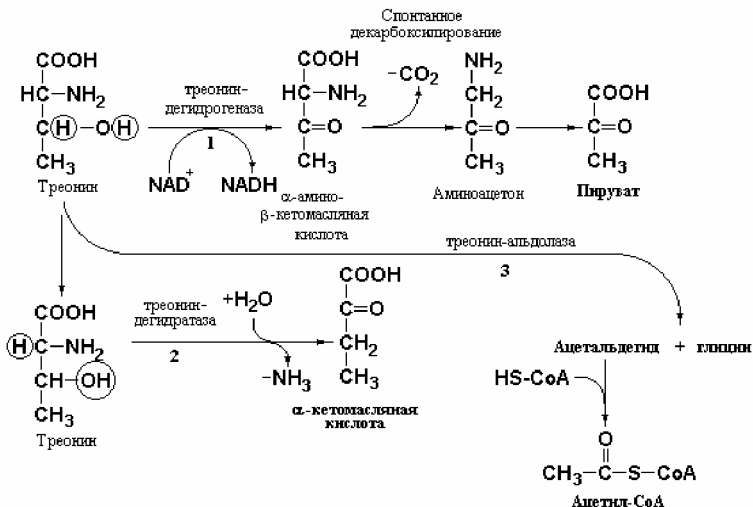


Рис. 5.3. Схема путей катаболизма третонина: 1 – образование пировата в качестве конечного продукта последовательности реакций, начинающейся с дегидрирования третонина; 2 – реакция β-элиминирования под действием третониндегидратазы; 3 – расщепление третонина до глицина и ацетальдегида с участием третонинальдозазы

Один из этих путей зависит от оксидазы D-аминокислот, которая превращает глицин в глиоксилат. Далее глиоксилат может окисляться до муравьиной кислоты или щавелевой кислоты (рис. 5.4).

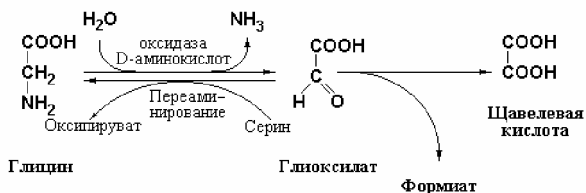


Рис. 5.4. Схема путей превращений глицина через промежуточное образование глиоксилата

Из рис. 5.4 следует, что если образование глицина из глиоксилата происходит путем переаминирования с серином, то обратное превращение глицина в глиоксилат осуществляется с помощью оксидазы D-аминокислот. О том, что этот путь имеет для человека важное значение, свидетельствует обнаруженное метаболическое нарушение под названием *первичная гипероксалурия*. Это заболевание характеризуется постоян-

но высокой экскрецией оксалата с мочой, независимо от его поступления с пищей. При развитии болезни наблюдается прогрессирующее двустороннее образование оксалатных камней в мочевыводящих путях. Летальный исход наступает в детском или молодом возрасте от почечной недостаточности или гипертонии. Полагают, что избыток оксалата имеет эндогенное происхождение. Наиболее вероятным его источником является глицин, который дезаминируется в глиоксилат – предшественник оксалата. Метаболический дефект состоит в нарушении обмена глиоксилата, точнее, его превращения в формиат или в глицин. В результате избыток глиоксилата окисляется до оксалата. Таким образом, наследственное нарушение метаболизма – первичную гипероксалурию – можно объяснить сочетанием дефекта глицинтрансминазы и нарушения процесса окисления глиоксилата в формиат.

Другой и главный путь превращений глицина состоит в том, что α -углеродный атом этой аминокислоты поступает в одноуглеродный пул при действии *глицинсинтазного комплекса*, который содержит в качестве кофактора пиридоксальфосфат. Продуктами окисления глицина в данном случае являются NH_3 , CO_2 , NADH и $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилентетрагидрофолат. Эта обратимая реакция (рис. 5.5) напоминает превращение пирувата в ацетил- CoA ферментами пируватдегидрогеназного комплекса. Оба комплекса локализованы в митохондриях печени и представляют собой макромолекулярные агрегаты. Поскольку данная реакция обратима, она также может обеспечить ресинтез глицина из NH_3 и CO_2 .

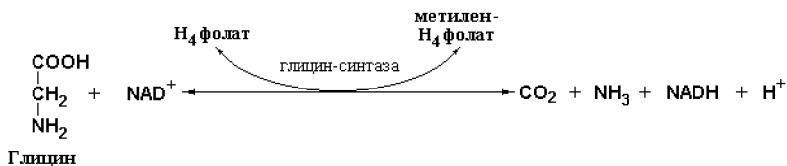


Рис. 5.5. Схема реакции распада глицина до CO_2 и NH_3 с участием глицинсинтазы

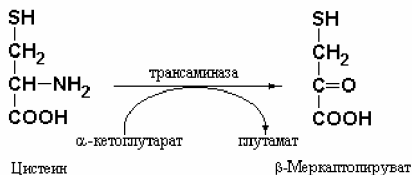
Оказалось, что метаболическое значение этой реакции чрезвычайно велико. Нарушение катаболизма глицина сопровождается *некетонной гиперглицинемией* – заболеванием, которое характеризуется тяжелыми формами психических расстройств и умственного развития. При этом большинство пациентов не переживает младенческого возраста. Гиперглицинемия определяется дефектами структуры субъединиц *глицинсинтазного комплекса*. Комплекс состоит из четырех различных субъединиц, и нарушения его функции связаны с наследственными изменениями структуры трех из них. Название этого тяжелейшего заболевания дано с тем, чтобы отличать его от *кетацидозов*, возникающих при нарушениях обмена аминокислот с разветвленными боковыми цепями, когда, по неизвестным пока причинам, также отмечается увеличение уровня глицина в крови [34]. Тяжесть протекания болезни предполагает, что глицинсин-

таза имеет принципиальное значение для катаболизма данной аминокислоты. Глицин является важным нейромедиатором торможения, что, вероятно, и объясняет наблюдаемые неврологические осложнения заболевания. Даже интенсивная терапия (инфузия N⁵-формилтетрагидроfolата, введение бензоата натрия) оказывается не в состоянии изменить ход болезни.

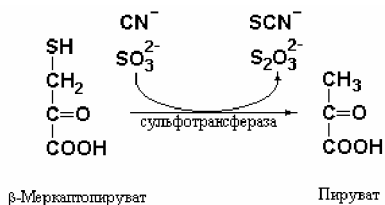
Обмен S-содержащих аминокислот

Цистеин, который относится к семейству C₃-аминокислот и одновременно к S-содержащим аминокислотам, может превращаться в пировиноградную кислоту различными путями, при этом атом серы цистеина может появляться в различных соединениях типа H₂S, SO₃²⁻ или SCN⁻.

Одним из путей превращения цистеина в пируват является переамирирование цистеина с α-кетоглутаратом:

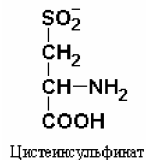


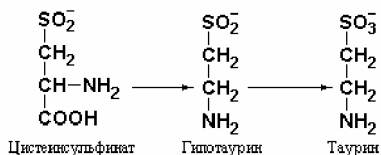
Образующийся β-меркаптопируват под действием *сульфотрансферазы* превращается в пируват. В отсутствие какого-либо акцептора образуется элементарная сера. Однако в присутствии акцепторов, таких как SO₃²⁻ (сульфит) или CN⁻ (цианид) образуются соответствующие продукты – тиосульфат или роданид.



Основной же путь катаболизма цистеина связан с его окислением до *цистеинсульфината*.

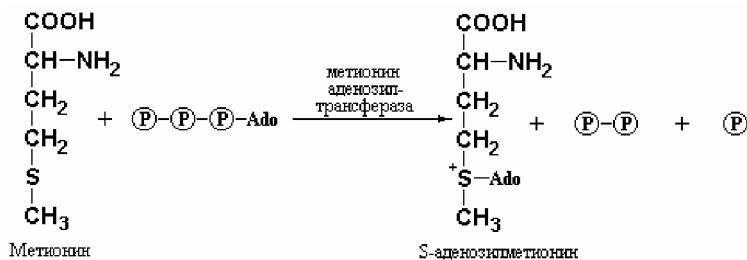
Фермент, осуществляющий данную реакцию, характеризуется свойствами оксигеназы со смешанной функцией и зависит от Fe⁺² и восстановленного никотинамидного нуклеотида, но, тем не менее, фермент внедряет в продукт два атома кислорода от O₂, а не один, как это свойственно монооксигеназам. Декарбоксилирование *цистеинсульфината* приводит к образованию *гипотаурина*, а последний превращается в *таурин*.





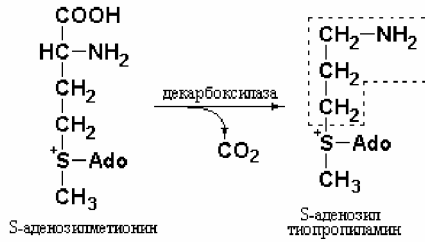
Физиологическая роль таурина остается объектом предположений, однако обнаруженные высокие концентрации этого соединения в мозге позволяют считать, что функции таурина более важны, чем его участие только в процессах конъюгации с желчными кислотами в печени. Имеются наблюдения, что у детей, долгое время поддерживаемых на парентеральном питании, регистрируется ненормальная *электроретинограмма*. Ситуация легко исправляется после введения необходимого количества таурина внутривенно.

Метионин является принципиальным источником метильных групп, которые переносятся на многие акцепторы в ходе реакций, имеющих большое физиологическое значение. Активация метионина представляет собой уникальную реакцию, в ходе которой *сера тиоэфира* становится атомом *сульфония* при взаимодействии с третьим атомом углерода – C-5'-рибозы в составе АТФ. При взаимодействии метионина с АТФ из последнего удаляются все три остатка фосфорной кислоты, причем один остаток – в виде пиррофосфата.



Продукт описанной выше реакции – S-аденозилметионин (MetAdo, SAM) – является чрезвычайно реакционноспособным вследствие появления положительного заряда на атоме S, который исчезает, когда любой из трех заместителей у атома S утрачивается. Известны ферментативные реакции, которые обеспечивают перенос на соответствующий акцептор метильной группы, C₃- или C₄-фрагмента, представляющего собой остаток структуры метионина или аденозильного остатка. В любом случае остающаяся часть молекулы сохраняет два заместителя у атома серы, что приводит к образованию исходного тиоэфира.

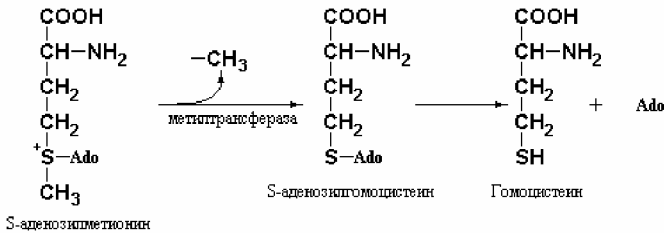
S-аденозилметионин под действием специфической декарбоксилазы может превращаться в *S-аденозилметилтиопропиламин*, который, в свою очередь, является донором C₃-фрагментов, используемых для синтеза *полиаминов*.



Акцептором пропиламина является диамин *путресцин*, образуемый при декарбоксилировании орнитина, и первым продуктом реакции конденсации путресцина с пропиламином является *спермидин*. Вторая реакция переноса остатка пропиламина приводит к превращению *спермидина* в *спермин*.

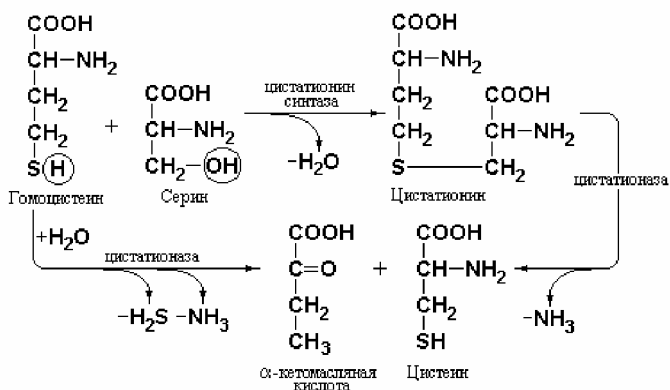
Спермин представляет собой сильный катионит, который прочно взаимодействует с нуклеиновыми кислотами и другими полианионами. Полагают, что спермин играет важную роль в регуляции активности ДНК-топоизомераз. Это предположение вполне согласуется с обнаруженным увеличением *орнитиндекарбоксилазной активности* при делении клеток. Тем не менее точная биологическая функция полиаминов до сих пор не определена (см. Приложение 2 к лекции 5).

Большинство реакций с участием S-аденозилметионина катализируются ферментами *метилтрансферазами*, или, как их еще называют, *метилазами*. При метилировании того или иного акцептора S-аденозилметионин, отдавая метильную группу, превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH), который при последующем гидролизе расщепляется с образованием аденозина и *гомоцистеина*.



Существуют три принципиальных пути метаболизма гомоцистеина. Преимущественное участие гомоцистеина в одном из этих метаболических путей определяется физиологическими потребностями организма.

В тех случаях, когда необходим синтез дополнительного количества цистеина, гомоцистеин конденсируется с серином с отщеплением H_2O и образованием цистатионина под действием *цистатионинсинтазы* (фермент содержит в качестве кофактора пиридоксальфосфат). Другой пиридоксальфосфатзависимый фермент – *цистатионаза* – расщепляет тиоэфир на цистеин, α -кетобутират (α -кетомасляную кислоту) и аммиак:



Суммарная реакция переноса SH-группы с гомоцистеина на серин с образованием цистеина может рассматриваться как транссульфидирование. Активатором *цистатионинсинтазы* является S-аденозилметионин, который, таким образом, регулирует метаболизм гомоцистеина.

При нехватке метионина гомоцистеин заново метилируется за счет N⁵-метилтетрагидрофолата или бетаина.

Наконец, в тех случаях, когда обе серусодержащие аминокислоты присутствуют в достаточных количествах, по всей видимости, один и тот же фермент – *цистатионаза* – проявляет также активность, называемую *гомоцистеиндесульфгидразной активностью*. Этот фермент гидролизует гомоцистеин до α-кетомасляной кислоты, NH₃ и H₂S.

Дефицит любого из трех ферментов, которые включаются в процессы обмена S-содержащих аминокислот, приводит к их накоплению и выведению в больших количествах с мочой. *Гиперметионинемия* развивается при дефиците *метионаденазолтрансферазы*. Полная утрата активности этим ферментом привела бы к невозможному нарушению любых процессов метилирования. Частичные нарушения, вероятнее всего, проявляются в изменениях значений K_m этого фермента. Поэтому у пациентов с частично измененной структурой метионаденазолтрансферазы этот фермент нуждается в более высоких количествах метионина для достижения стационарного насыщающего состояния. Только при высоких концентрациях метионина возможно осуществление различных функций, описанных выше. Накопление метионина у таких пациентов не имеет никаких других последствий, что важно для дифференцированной диагностики, поскольку гиперметионинемия может иметь место при нехватке *цистатионинсинтазы*, при тяжелых заболеваниях печени и при *тирозинемии*.

Дефицит *цистатионинсинтазы* вызывает накопление гомоцистеина, сопровождающееся еще большим увеличением содержания метионина в результате реакции реметилирования, что приводит к *гомоцистинурии*.

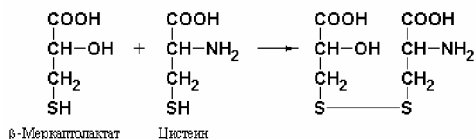
Данное заболевание характеризуется также экскрецией минорных продуктов обмена S-содержащих аминокислот. В настоящее время еще не установлены биохимические механизмы, которые объясняли бы, почему накопление гомоцистеина должно приводить к патологическим изменениям в организме. Однако факт остается фактом: дефицит цистатионинсинтазы сопряжен с многими патологиями. В частности, гомоцистеин может взаимодействовать с альдегидными группами, образованными лизином в коллагене, блокировать их и в результате препятствовать сшивке цепей коллагена. Накопление гомоцистеина часто может приводить к смещению хрусталика глаза в возрасте чуть более трех лет, а также инициировать другие структурные нарушения глаз. Дефицит цистатионинсинтазы в детстве вызывает *остеопороз* и другие нарушения формирования скелета. Тромбоэмболия и закупорка сосудов могут происходить в любом возрасте.

Рациональный подход к лечению разработать достаточно сложно в связи с множеством симптомов. Понижение уровня гомоцистеина достигается ограничением употребления метионина и бетаина. В некоторых случаях улучшение состояния наблюдается при увеличении в диете количества витамина B₆. Исследования последних лет позволили выдвинуть предположение, что нарушения функции цистатионинсинтазы связаны с мутациями различных типов, происходящих в гене фермента. Одни мутации изменяют значение K_m по кофактору (пиридоксальфосфату), другие влияют на величину K_m для субстрата и V_{max}, третьи – на регуляторные области гена, вызывая снижение экспрессии фермента. Ряд причин, приводящих к гомоцистинурии может быть связан с нарушениями процесса реметилирования гомоцистеина в метионин. Нарушения реметилирования в свою очередь могут определяться дефицитом *N⁵-метилтетрагидрофолат гомоцистеинметилтрансферазы* или кофактора данного фермента – метилкобаламина. Дефицит последнего чаще всего связывают с нарушениями процессов всасывания кобаламина или его неспособностью превращаться в активный метилкобаламин [11].

В противоположность тяжелым последствиям, возникающим при нарушениях *цистатионинсинтазы*, нехватка *цистатионазы* не вызывает клинических нарушений и приводит лишь к накоплению цистатионина и выведению его с мочой.

В настоящее время описаны два достаточно серьезных заболевания, связанных с нарушениями обмена цистеина. Поскольку сульфгидрильные группы очень быстро окисляются до дисульфидов, цистеин в крови и моче существует главным образом в виде цистина. Низкая растворимость цистина приводит к образованию камней в почках. Поэтому схемы лечения основаны на попытках удаления камней или предотвращения их образования при употреблении большого количества воды или соответствующих препаратов.

Другим и гораздо более тяжелым заболеванием является *цистиноз* – накопление цистина в лизосомах клеток почек. Накапливающийся цистин образует кристаллы, приводя к нарушению функции почек, а примерно через 10 лет развивается почечная недостаточность. В ряде случаев происходит также образование дисульфидов, состоящих из цистеина и β -меркаптомолочной кислоты.

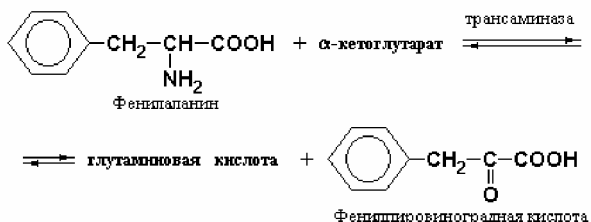


Расщепление ароматических аминокислот

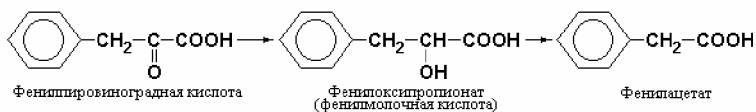
При нормальных условиях почти все количество фенилаланина, образованного в результате протеолиза белка, подвергается последующему расщеплению, которое начинается с единственного метаболического превращения – гидроксилирования по 4-му положению фенильного остатка данной аминокислоты с образованием тирозина. Реакция катализируется *фенилаланингидроксилазой* (фенилаланин-4-монооксигеназой). Данный фермент представляет собой *оксидазу со смешанной функцией* (его еще называют монооксигеназой), что говорит о ее способности внедрять один атом молекулярного кислорода в гидроксилируемый субстрат, в то время как другой атом кислорода в ходе реакции образует воду.

Роль восстановителя в реакции гидроксилирования фенилаланина играет переносчик электронов, называемый *тетрагидробиоптерин*ом. Это соединение выступает в качестве кофактора фенилаланингидроксилазы. В целом тетрагидробиоптерин представляет собой соединение, родственное фолиевой кислоте, и служит кофактором нескольких других гидроксилаз.

Недостаток фенилаланингидроксилазы приводит к накоплению избыточных количеств фенилаланина в крови. В этом случае фенилаланин активно включается в реакции трансаминирования с образованием фенилпирувиноградной кислоты.



В свою очередь фенилпируват может частично экскретироваться, а частично превращаться в ходе реакции восстановления в фенилмолочную кислоту. Последняя окисляется далее до фенилацетата.



Описанный путь деградации фенилаланина действует весьма активно в случаях отсутствия или нехватки фенилаланингидроксилазы, а также (правда, существенно реже) при нехватке кофактора – тетрагидробиоптерина. Наиболее значительным этапом в цепи этих реакций является переаминирование фенилаланина с образованием фенилпирувата. Блокирование гидроксирования фенилаланина ведет к накоплению фенилпирувата, который выделяется с мочой, и содержание этого соединения в моче крайне высоко. По этой причине заболевание получило название *фенилкетонурии*. *Фенилкетонурия* представляет собой наследственное заболевание, связанное с нарушением обмена фенилаланина, которое оказывает сильнейшее разрушительное действие на организм. Больные фенилкетонурией практически всегда отличаются резко выраженной умственной отсталостью. По данным ВОЗ примерно 1 % пациентов психиатрических больниц страдают фенилкетонурией. Вес мозга у таких больных ниже нормы, нарушена миелинизация нервов, отмечается интерактивность рефлексов. Продолжительность жизни составляет 20–30 лет.

Существует также множество других проявлений фенилкетонурии. Одним из них является *альбинизм*. Кожа и волосы у больных фенилкетонурией светлее, чем у других людей. Гидроксирование тирозина представляет собой первый этап в синтезе пигмента меланина. При фенилкетонурии эта реакция гидроксирования конкурентно ингибируется накапливающимся в больших количествах фенилаланином, что вызывает блокирование процесса образования меланина. Биохимические механизмы, определяющие задержку умственного развития при фенилкетонурии до сих пор не выяснены. Полагают, что ключевую роль в данной патологии играет токсический эффект фенилаланина, который в больших количествах нарушает транспорт и метаболизм в мозге других ароматических аминокислот.

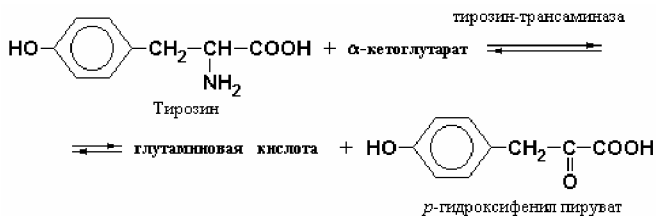
Терапия фенилкетонурии основана на снижении содержания фенилаланина в диете до такого уровня, чтобы оно не превышало потребности в нем для осуществления процессов, связанных с синтезом белка и, соответственно, ростом организма.

Исходя из приведенных фактов следует, что ранняя диагностика фенилкетонурии имеет огромное значение. Долгое время данное заболевание диагностировали, добавляя в мочу новорожденных FeCl₃, который в присутствии фенилпирувата дает оливково-зеленое окрашивание. Недос-

татком этого метода является то, что другие соединения также дают похожее окрашивание с хлоридом железа. Поэтому более предпочтительным диагностическим критерием, в силу его большей надежности, служит в настоящее время прямое определение фенилаланина в крови. Наиболее точным современным методом диагностики фенилкетонурии является гибридационное зондирование с использованием коротких олигонуклеотидов РНК или ДНК, которые позволяют определить наличие мутаций в гене фенилаланин-4-монооксигеназы.

Следует иметь в виду, что диагностика фенилкетонурии традиционными методами в ряде случаев осложняется присутствием в крови высоких концентраций фенилаланина, обусловленных другими механизмами. Например, около 3 % детей с высоким содержанием фенилаланина в крови имеют нормальную фенилаланингидроксилазу. У таких пациентов нарушены пути синтеза или восстановления тетрагидробиоптерина. Поскольку этот кофактор необходим также для синтеза нейромедиаторов, у больных отмечается серьезное нарушение функций центральной нервной системы. В данном случае лечение включает введение 5-гидрокситриптофана и ДОРА для преодоления нехватки предшественников в синтезе серотонина и катехоламинов [12].

Пути распада фенилаланина и тирозина в норме характеризуются рядом особенностей (рис. 5.6). Они представляют собой последовательность реакций, в которых молекулярный кислород используется для расщепления ароматических колец данных аминокислот. Как уже упоминалось, первым этапом в ходе распада фенилаланина является реакция гидроксирования данной аминокислоты в тирозин под действием фенилаланин-4-монооксигеназы. Следующий этап, общий для фенилаланина и тирозина, представляет собой трансаминирование тирозина в *p*-гидроксифенилпироват.



Затем *p*-гидроксифенилпироват реагирует с O₂ с образованием *гомогентизата*. Фермент, катализирующий данную реакцию (*p*-гидроксифенилпироватгидроксилаза), относится к группе *диоксигеназ*, которые обеспечивают внедрение двух атомов кислорода в молекулу субстрата.

На следующей стадии ароматическое ядро *гомогентизата* разрушается в результате взаимодействия с молекулой кислорода под действием другой диоксигеназы – *гомогентизатоксигеназы*. Продуктом этой реакции является 4-малеилацетоацетат, который с участием малеилацетоацетати-

зомеразы изомеризуется в фумарилацетоацетат. Последний гидролизуется до фумаровой кислоты и ацетоацетата. Схема пути распада фенилаланина и тирозина приведена на рис. 5.6.

Отсутствие или нехватка *цитоплазматического* фермента *тирозин-трансаминазы* вызывает накопление и экскрецию тирозина, а также некоторых его метаболитов, таких как *p*-гидроксифенилпирувата, *p*-гидроксифениллактата, *p*-гидроксифенилацетата и тирамина. Поскольку *p*-гидроксифенилпируват, предположительно являющийся предшественником других упомянутых метаболитов, является продуктом действия тирозинтрансаминаз, наиболее вероятным источником данного соединения является митохондриальная трансаминаза. Описываемое заболевание, связанное с дефицитом цитоплазматического фермента, характеризуется повреждениями глазного яблока и кожи и в большинстве случаев, но не всегда, отставанием умственного развития. Данные проявления относятся к *тирозинемии II типа*.

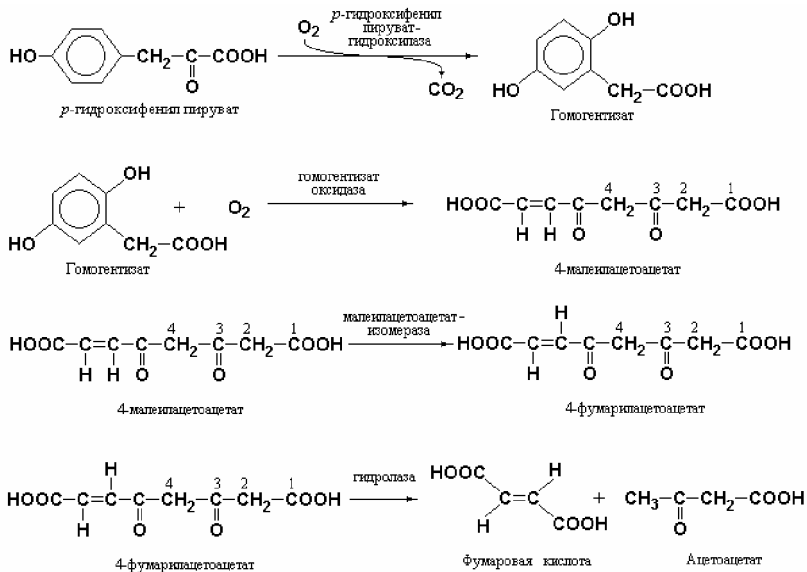


Рис. 5.6. Схема пути распада фенилаланина и тирозина (деградация данных ароматических аминокислот зависит от молекулярного кислорода, который используется для расщепления ароматических колец)

Тирозинемия I типа, или гепаторенальная тирозинемия, является гораздо более серьезным заболеванием, связанным с разрушением печени, дисфункцией трубочек почек, рахитом и полиневропатией. Указанные проявления связывают также с нехваткой *фумарилацетоацетатгидролазы*. По неизвестным пока причинам дети с тирозинемией I типа относятся к группе с повышенным риском развития гепатомы [13].

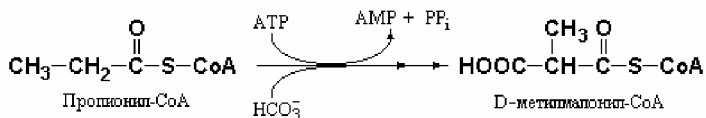
Другим проявлением нарушений обмена тирозина, уже упоминавшимся, является альбинизм. Хорошо известно, что цвет кожи и волос контролируется у людей неизвестным, но большим количеством генетических локусов. Для сравнения: у мышей идентифицировано в настоящее время 147 генов, определяющих окраску. Поэтому не удивительно, что у людей цвет кожи определяется бесконечным сочетанием экспрессируемых генов и, следовательно, неизвестными нарушениями метаболических этапов синтеза пигментов. Достаточно хорошо известно лишь классическое проявление альбинизма у людей, что связано с нарушением синтеза полимерного пигмента меланина, образующегося в меланосомах, содержащих в норме большие количества *тирозинызы*, гидроксиллирующей тирозин. Отсутствие пигментации кожи делает альбиносов весьма чувствительными к действию солнечного света, который может вызывать вдобавок к ожогам рак кожи, а отсутствие пигментации глаз вызывает фотофобию. Вместе с тем отсутствие пигментации глаз вовсе не означает снижение зрения. Описаны случаи, когда североамериканские индейцы-альбиносы обладали чрезвычайно острым зрением, особенно ночью.

Первым патологическим состоянием, идентифицированным еще в 1649 году как «врожденная ошибка метаболизма», была *алкаптонурия*. Это наследственное нарушение метаболизма вызвано отсутствием *гомогентизатоксидазы*. Гомогентизат накапливается и выделяется с мочой, которая при стоянии чернеет вследствие того, что гомогентизат окисляется и полимеризуется в меланиноподобное соединение. При алкаптонурии образующиеся пигменты накапливаются в костях, соединительной ткани и других органах. Такая генерализованная пигментация получила название *охроноза* вследствие того, что микроскопические препараты соединительной ткани окрашены в желтоватый цвет, хорошо различимый с помощью светового микроскопа.

Превращения семейства C₅-аминокислот

Сукцинил-СоА является тем соединением, в виде которого происходит включение в цикл трикарбоновых кислот некоторых атомов углерода *метионина, изолейцина, треонина и валина*. Промежуточным соединением, образующимся при распаде этих четырех аминокислот, является метилмалонил-СоА (рис. 5.7).

Как следует из рисунка, исходным соединением для образования сукцинил-СоА является пропионил-СоА. Пропионил-СоА в присутствии избытка АТФ карбоксилируется с образованием D-изомера метилмалонил-СоА. Реакция катализируется *пропионил-СоА-карбоксилазой* – ферментом, содержащим в качестве кофактора *биотин*. Механизм действия пропионил-СоА-карбоксилазы сходен с механизмами функционирования ацетил-СоА-карбоксилазы и пируваткарбоксилазы:



D-изомер метилмалонил-CoA рацемизируется в L-изомер, который служит субстратом для *метилмалонил-CoA-мутазы*, превращающей его в сукцинил-CoA (рис. 5.8).

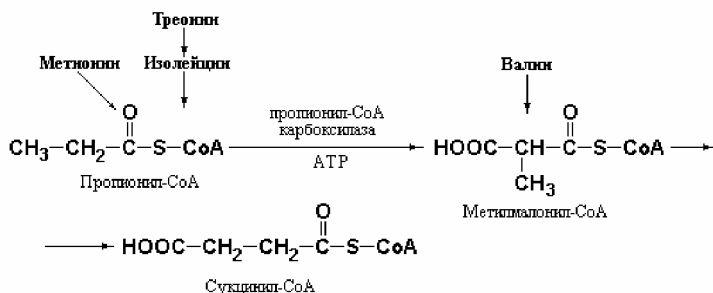


Рис. 5.7. Схема катаболизма аминокислот семейства C₅

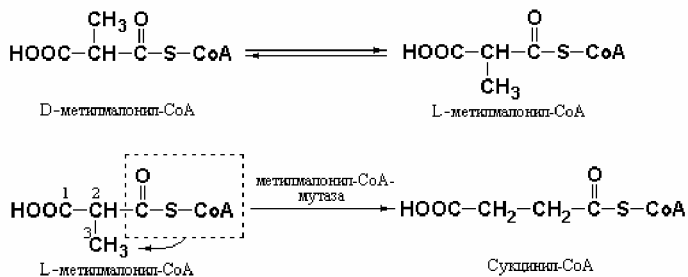


Рис. 5.8. Реакция изомеризации D-метилмалонил-CoA в L-метилмалонил-CoA, катализируемая метилмалонил-CoA-мутазой

Сукцинил-CoA образуется из L-метилмалонил-CoA в результате внутримолекулярной перегруппировки. Группа -CO-S-CoA переносится от атома C₂ на атом C₃ (реакция, катализируемая мутазой). Эта необычная реакция катализируется метилмалонил-CoA-мутазой – одним из двух известных у млекопитающих ферментов, содержащих в качестве кофактора производное витамина B₁₂.

Кобаламиновые ферменты катализируют реакции двух типов: 1) реакции метилирования, как, например при синтезе метионина, и 2) реакции перегруппировки, как в случае превращения L-метилмалонил-CoA в сукцинил-CoA. Перегруппировка представляет собой обмен двух групп, присоединенных к соседним атомам углерода. Атом водорода

мигрирует от одного атома углерода к другому, а группа R (в данном случае $-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$) одновременно перемещается в противоположном направлении.

Недавно было охарактеризовано несколько наследственных *нарушений обмена метилмалонил-СоА*. Эти нарушения обычно проявляются в течение первого года жизни, притом наиболее характерным симптомом является *ацидоз*. Значение рН артериальной крови у таких людей составляет величину, равную примерно 7, в то время как в норме должно быть 7,4. В моче появляются слишком большие количества *метилмалоновой кислоты* – до 1 г в сутки при норме менее 5 мг метилмалоната. Примерно у половины пациентов с *метилмалоновой ацидурией* наступает заметное *улучшение при введении больших доз кобаламина*. Однако не у всех больных с нарушенным обменом метилмалонил-СоА наблюдается улучшение после терапии кобаламином. У многих из них возможен дефект апофермента мутазы. Данная форма метилмалоновой ацидурии часто приводит к летальному исходу.

Ранее отмечалось, что аминокислота лейцин – единственная исключительно кетогенная аминокислота. Он распадается в результате реакций, с которыми мы уже отчасти познакомимся. Сначала лейцин трансаминируется с образованием соответствующей кетокислоты, которая затем декарбоксилируется в изовалерил-СоА. Данная реакция аналогична окислительному декарбоксилированию пирувата в ацетил-СоА и α -кетоглутарата в сукцинил-СоА.

Конечными продуктами распада лейцина являются ацетил-СоА и ацетоацетат.

Пути расщепления валина и изолейцина сходны с метаболическими путями деградации лейцина. Все три аминокислоты сначала трансаминируются в соответствующие кетокислоты, которые затем подвергаются окислительному декарбоксилированию с образованием СоА-производных.

Изолейцин дает ацетил-СоА и пропионил-СоА, тогда как валин образует метилмалонил-СоА. Существует врожденный дефект метаболизма, при котором нарушается окисление валина, изолейцина и лейцина. При болезни «кленового сиропа» блокируется окислительное декарбоксилирование α -кетопроизводных этих трех аминокислот. В результате количество валина, лейцина и изолейцина в крови и моче значительно возрастает, что приводит к накоплению соответствующих α -кетокислот. Моча таких больных издает запах кленового сиропа. Как правило, болезнь «кленового сиропа» приводит к летальному исходу, если только пациенты в самом раннем детстве не переводятся на диету с низким содержанием валина, лейцина и изолейцина [35–37].

ЛЕКЦИЯ 6. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Углеводы занимают одно из ведущих мест в питании человека и животных. Пищевые углеводы покрывают основные ежедневные потребности человека в энергии. Хорошо известно, что продукты животного происхождения относительно небогаты углеводами. В частности, мясо и рыба содержат животный полисахарид гликоген, однако при длительном хранении этих продуктов количество гликогена в них заметно убывает. Значительно больше гликогена обнаруживается в печени, но даже 200–300 г этого ценного пищевого продукта содержат не более 4–15 г гликогена. Если принять во внимание, что количество углеводов, необходимое взрослому человеку, составляет 400–600 г в сутки, то становится понятным, что пищевые продукты животного происхождения не могут в полной мере обеспечить организм человека углеводами.

Количество углеводов в рационе может быть сильно снижено за счет увеличения доли пищевых жиров и белков. Следует, однако, помнить, что эту замену можно осуществлять лишь до определенного предела и в течение достаточно короткого промежутка времени, так как она приводит к выраженным нарушениям обмена веществ, в частности к развитию *кетоза*.

Обычно считается, что необходимо сохранять в рационе человека не менее 100 г углеводов различного происхождения, основным источником которых являются растительные продукты. При этом, однако, нельзя забывать, что одним из существенных в количественном отношении компонентов, которыми богаты растительные продукты, является клетчатка, недоступная для пищеварительных ферментов млекопитающих. Поэтому при обосновании необходимого количества расщепляемых углеводов, входящих в состав пищи человека, клетчатка в расчет не принимается.

В рационе человека основным углеводом, имеющим питательную ценность, является крахмал. Большим содержанием крахмала отличаются различные зерновые культуры, а также клубни картофеля.

Содержание крахмала в пшеничной, ржаной, рисовой муке, в разных крупах достигает 70–80 %, в то время как в картофеле его 14–25 %. Отсюда следует, что основными источниками главного углевода – крахмала – являются такие общепотребляемые пищевые продукты, как хлеб, различные крупы, макаронные изделия и картофель. Необходимое количество сахарозы, а значит глюкозы и фруктозы, человек получает с пищевым столовым сахаром и фруктами. Однако содержание моносахаридов в последних, за исключением отдельных сортов винограда, чрезвычайно богатых глюкозой, сравнительно невелико.

Основная метаболическая роль углеводов, входящих в состав продуктов питания, состоит в продукции необходимой организму энергии.

При употреблении любого избыточного количества углеводов происходит их превращение в триацилглицеролы, накапливающиеся в адипозных тканях, и в гликоген, запасающийся главным образом в печени. Вместе с тем организм человека в состоянии адаптироваться к весьма широкому диапазону количества углеводов в пище. Диеты, содержащие высокий процент углеводов, способствуют увеличению стационарного уровня *глюкокиназы* и некоторых ферментов, участвующих в функционировании *гексозомонофосфатного шунта*, а также ферментов, принимающих участие в синтезе триацилглицеролов.

С другой стороны, длительное употребление продуктов с низким содержанием углеводов приводит к росту стационарного уровня некоторых *ферментов глюконеогенеза*, а также ферментов, участвующих в реакциях *окисления жирных кислот* и *катаболизма аминокислот*.

Очень низкое содержание углеводов в длительной диете приводит к устойчивому состоянию *кетоза*, подобного тому, который развивается во время голодания. Состояние *кетоза* в ряде случаев может нанести непоправимый ущерб здоровью человека.

Наиболее распространенными пищевыми проблемами, связанными с употреблением углеводов, являются различные виды *углеводной интолерантности*. Наиболее частая ее форма – *диабет*, который вызывается либо утратой способности организма продуцировать инсулин, либо повреждением *инсулиновых рецепторов*. Данное патологическое состояние вызывает непереносимость глюкозы и других простейших углеводов, которые легко превращаются в глюкозу. Состояние диабета, как правило, предполагает исключение из употребления большинства простых сахаров и замену их более переносимыми, обычно сложными углеводами, которые, тем не менее, содержат некоторые простые сахара, такие как фруктоза и сорбитол.

Низкий уровень синтеза или нарушение структуры *лактазы* – дисахаридазы энтероцитов тонкого кишечника – также одно из наиболее часто встречающихся нарушений углеводного обмена. Известно, что только в Соединенных Штатах Америки этим заболеванием страдает около 30 млн. человек. Дефицит или отсутствие лактазы, расщепляющей молочный сахар, приводит к тому, что *лактоза* накапливается в кишечнике и действует осмотически, вызывая поступление воды в кишечник. Кроме того, накапливающаяся лактоза может служить субстратом для ферментов кишечной флоры и превращаться под их действием в молочную кислоту, CO_2 и воду. Конечными проявлениями недостатка *лактазы* у человека являются *тимпанит* (вздутие кишечника), *метеоризм* (скопление газов) и *диарея*. Терапия данной формы углеводной интолерантности чрезвычайно проста и состоит в исключении из питания цельного молока и многих других молочных продуктов.

Значение клетчатки в питании человека

Ранее уже отмечалось, что при обосновании необходимого количества *расщепляемых углеводов*, входящих в состав пищи человека, клетчатка в расчет не принимается. Тем не менее значение волокнистых соединений в обмене веществ и его регуляции чрезвычайно велико. Пищевая клетчатка определяется как некая углеводная составляющая продуктов питания растительного происхождения, которая не подвергается гидролитическому расщеплению под действием пищеварительных ферментов организма человека. Однако такое определение не совсем корректно, поскольку клетчатка (по крайней мере, отдельные ее типы) все же подвергается некоторому расщеплению, хотя и довольно ограниченно. Вдобавок некоторые волокна могут частично гидролизироваться ферментами кишечных бактерий. Наши знания о роли клетчатки в обмене веществ у человека значительно расширились в последнее десятилетие.

Современные представления о метаболическом значении клетчатки базируются на трех экспериментально полученных группах фактов:

- ♦ во-первых, доказано, что клетчатка химически не однородна: существует нескольких различных типов пищевых волокнистых соединений и частично установлено их строение;
- ♦ во-вторых, установлено, что каждый тип волокнистых веществ обладает своей собственной уникальной химической структурой, которая определяет их физические свойства и физиологические эффекты;
- ♦ в-третьих, как оказалось, каждая из этих групп соединений характеризуется настолько разными эффектами на метаболизм человека в целом, что природу этих эффектов можно понять, лишь детально изучив уникальную структуру каждой группы волокнистых веществ в отдельности.

Основные типы клетчатки, встречающейся в продуктах питания, их химические свойства и физиологические эффекты приведены в табл. 6.1.

Как следует из табл. 6.1, *целлюлоза* и большинство *гемицеллюлоз*, относящиеся к неперевариваемым и водонерастворимым видам клетчатки, способствуют увеличению объема стула и сокращению времени нахождения непереваренных компонентов пищи в кишечнике, тем самым предотвращая возможность развития гнилостных процессов в желудочно-кишечном тракте. Они также снижают давление внутри толстого кишечника и, по-видимому, играют существенную роль в предотвращении заболеваний слепого отростка. В последнее время, основываясь на экспериментальных данных, высказывается предположение о том, что компоненты клетчатки снижают риск заболевания раком толстого кишечника и прямой кишки. Исходя из сказанного, можно сделать вывод, что эти типы волокнистых соединений играют важнейшую регуляторную роль в функционировании системы пищеварения.

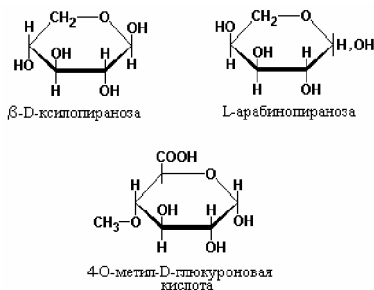
С химической точки зрения *гемицеллюлозы* представляют собой смеси гетерополисахаридов клеточных стенок растительных клеток, состав

которых зависит от вида растения. В зависимости от моносахаридного состава основной цепи полимера гемицеллюлозы подразделяют на *ксиляны*, *глюкоманнаны* и *галактаны*.

Таблица 6.1. Типы клетчатки и их свойства

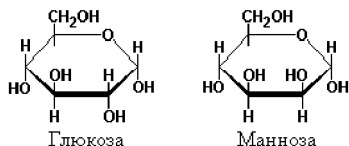
Тип соединения	Основной источник	Химические свойства	Физиологические эффекты
Целлюлоза	Неочищенные злаки, отруби, непросеянная пшеничная мука	Не переваривается, водонерастворима, абсорбирует воду	Поддерживает тонус толстого кишечника, регулирует перистальтику кишечника, участвует в формировании стула
Гемицеллюлоза	Неочищенные злаки, некоторые овощи и фрукты, непросеянная пшеничная мука	Частично переваривается, водонерастворима, абсорбирует воду	Поддерживает тонус толстого кишечника, регулирует перистальтику кишечника, участвует в формировании стула
Лигнин	Древесные части овощей	Не переваривается, водонерастворим, абсорбирует органические соединения	Связывает холестерин, связывает канцерогены, участвует в формировании стула
Пектин	Фрукты	Переваривается, водорастворим, имеет консистенцию слизи	Регулирует скорость опорожнения желудка, замедляет всасывание сахаров, снижает уровень холестерина в сыворотке
Камеди	Высушенные бобовые, овес	Перевариваются, водорастворимы, имеют консистенцию слизи	Регулирует скорость опорожнения желудка, замедляет всасывание сахаров, снижает уровень холестерина в сыворотке

Ксиланы, главным источником которых с точки зрения питания человека являются злаки (и древесина лиственных пород), построены преимущественно из (1→4)-связанных остатков β-ксилопиранозы. Кроме того, они содержат остатки L-арабинозы и 4-О-метил-D-глюкуроновой кислоты.



Глюкоманнаны, встречающиеся чаще всего в хвойных растениях, состоят главным образом из остатков глюкозы и маннозы, соединенных β(1→4)-связями, и представляют собой преимущественно линейные по-

лимеры. В некоторых случаях к основной цепи (1→6)-связями могут присоединяться остатки D-галактозы.

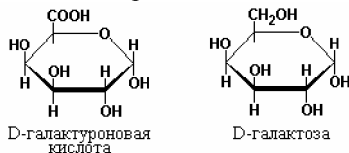


Лигнины, также относящиеся к водонерастворимым и неперевариваемым волокнистым соединениям, способны связывать различные органические соединения, в том числе такие, как холестерин и многочисленные канцерогены, обеспечивая тем самым снижение уровня холестерина в сыворотке крови и препятствуя свободному поступлению канцерогенных веществ в организм.

Наилучшими источниками водонерастворимой клетчатки – *целлюлозы*, *гемцеллюлоз* и *лигнина* – являются овощи, ржаная и пшеничная мука грубого помола и другие зерновые. В свою очередь фрукты и овес чрезвычайно богаты водорастворимыми фракциями волокнистых соединений. К водорастворимым типам клетчатки относятся клейкие волокна, такие как *пектины* и *камеди*, склонные к образованию вязких гелей в желудке и тонком кишечнике и способные снижать скорость опорожнения желудка.

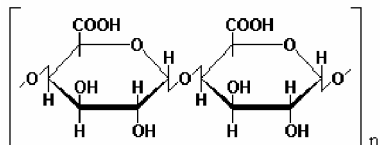
Благодаря указанным свойствам пектины могут замедлять всасывание многих питательных веществ. С клинической точки зрения наиболее важная роль пектинов и камедей состоит в снижении скорости переваривания и всасывания углеводов. Таким образом, при употреблении этих соединений вместе с пищей, богатой углеводами, наблюдается существенное подавление роста уровня сахара в крови и последующего увеличения уровня инсулина.

Пектиновые вещества, представляющие собой полиурониды, в больших количествах встречаются в соках ягод, плодов, в корнеплодах и водорослях. Основными мономерными компонентами пектинов являются уроновые кислоты, среди которых по количеству выделяется D-галактуроновая кислота. В составе пектиновых веществ в малых количествах обнаруживаются также L-арабиноза и D-галактоза.



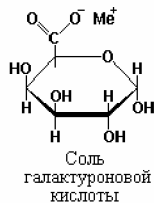
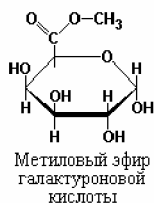
Водорастворимые пектиновые вещества присутствуют, как отмечалось выше, в соках растений, в то время как нерастворимая фракция пектинов образует межклеточное вещество растительных тканей и составляет большую часть клеточных стенок молодых растений. Ранее также указывалось, что пектиновые вещества являются полимерами, состоящими

главным образом из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных $\beta(1 \rightarrow 4)$ -связями.



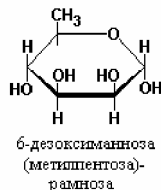
Пектины способны образовывать в растворах прочные гели и студни. Это их свойство находит практическое применение в кондитерской и фармацевтической промышленности.

Полиурониды часто называют *пектовыми кислотами*. Встречаются также частично этерифицированные полимеры, в которых часть карбоксильных групп остатков галактуроновой кислоты представляет собой либо метиловые эфиры, либо соли, где атом водорода карбоксильной группы может быть замещен ионами металлов.



Камедями называют полисахариды, которые при повреждении коры растений выделяются в виде вязких растворов, превращающихся в стеклообразную массу. К камедям относятся *гуммиарабик*, *камедь траганта*, *вишневый клей*, *сливовый клей* и др. Обычно камеди представлены солями (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+) высокомолекулярных кислот, состоящих из остатков гексоз, пентоз и уроновых кислот. Все камеди содержат остатки D-галактозы и L-арабинозы, в большинстве случаев присутствуют остатки галактуроновой и иногда глюкуроновой кислоты.

Строение камедей чрезвычайно сложно и изучено недостаточно полно. Наиболее детальная информация о составе таких полисахаридов получена для *аравийской камеди*, получаемой из сенегальской акации. В результате полного гидролиза гуммиарабика получают L-арабинозу, D-галактозу, глюкуроновую кислоту и метилпентозу – рамнозу.



Если принять во внимание разнообразие физиологических эффектов волокнистых соединений, оказываемых на процесс пищеварения у человека, то станет вполне очевидно, что сбалансированная по белкам, углеводам и жирам диета должна обязательно включать пищевые продукты, богатые как растворимой, так и нерастворимой клетчаткой.

Таким образом, следует сказать, что в целом пектины, камеди, некоторые гемицеллюлозы, а также запасные полисахариды принимают уча-

ствие в регуляции уровня холестерина в крови, снижая концентрацию последнего в сыворотке крови большинства людей. Является ли этот эффект следствием воздействия волокнистых веществ на уровень инсулина (известно, что инсулин стимулирует процессы синтеза и экспорта холестерина) или на другие метаболические пути (возможно, связанные с действием конечных продуктов, образованных при частичной ферментации под действием бактерий), до сих пор неясно.

Непрямые эффекты рафинированных углеводов

В настоящее время ведутся постоянные дискуссии относительно допустимых количеств рафинированных углеводов в составе различных диет. В последние годы установлено, что простые сахара, главным образом сахароза, повинны в возникновении многих заболеваний – от разрушения зубов до сердечно-сосудистой патологии и диабета. В случае заболеваний зубов данное утверждение не оспаривается. В случае же сердечно-сосудистых заболеваний и диабета эта зависимость является более полемичной.

Очевиден факт, что большой избыток углеводов в диете превращается в печени в триацилглицеролы, которые транспортируются липопротеидами очень высокой плотности (VLDL) и запасаются в адипозной ткани. Логично предполагать, что простые очищенные сахара, которые всасываются и метаболизируются очень быстро, могут вызывать увеличение количества триацилглицеролов в большей степени, чем сложные углеводы. Обследование добровольцев, в диете которых крахмал заменяли на изокалорийное количество простых сахаров, действительно показало транзитное увеличение уровня триацилглицеролов. Однако в результате употребления такой пищи в течение 2–3 месяцев происходит адаптация к данной диете и уровень триацилглицеролов возвращается к норме. Таким образом, в большинстве случаев не имеется прямых доказательств того, что длительное употребление в пищу очищенных простых сахаров действительно вызывает стойкое увеличение уровня триацилглицеролов в сыворотке крови [38].

Ситуация в отношении «индуцирующего» действия высокого содержания в пище рафинированных углеводов на возникновение диабета, вероятно, еще менее ясна. В то время как ограничение употребления простых углеводов часто является необходимой мерой для пациентов, которые уже страдают от диабета, нет прямых свидетельств того, что избыток рафинированных простых углеводов в диете может спровоцировать диабет.

Проведенные недавно исследования показали, что не существует какой-либо определенной корреляции между типом употребляемых углеводов и уровнем глюкозы в сыворотке крови. Например, употребление мороженого вызывает намного меньшее увеличение содержания глюкозы в крови, чем картофеля или хлеба из муки грубого помола. С другой сто-

роны, некоторые составляющие пищи – белки, жиры и водорастворимая клетчатка оказывают большее влияние на уровень глюкозы в кровотоке, чем любой вид употребляемых углеводов. Пища, богатая простыми сахарами, часто содержит также большое количество жиров и поэтому имеет очень высокую *калорийческую плотность*, что оказывает существенное влияние на процесс *телопродукции* и может стать причиной *ожирения*. В свою очередь ожирение действительно имеет прямое отношение к сердечно-сосудистой патологии и диабету. Описанные выше взаимоотношения могут объяснять данные эпидемиологических исследований, связывающих увеличение частоты сердечно-сосудистых заболеваний и диабета с ростом потребления простых сахаров.

Основываясь на современных представлениях об эффектах клетчатки на обмен веществ у человека, большинство рекомендаций диетологов сводится к рекламированию увеличения употребления волокнистой пищи. Однако вследствие достаточно сильного влияния клетчатки на скорость всасывания питательных веществ нецелесообразно употреблять продукты с высоким содержанием волокнистых соединений в чрезмерных количествах. По данным специалистов количество клетчатки в продуктах, употребляемых ежедневно, составляет в среднем 14–15 г.

Вместе с тем большинство диетологов склоняется к тому, что количество пищевой клетчатки должно составлять не менее 30 г в сутки. Поскольку к настоящему времени стало известно, что различные виды клетчатки отличаются разнообразием эффектов на функцию пищеварительной системы человека, суммарное количество волокнистых веществ, рекомендуемое к употреблению, должно состоять из клетчатки, которая входит в состав разнообразных продуктов питания. Это означает, что в рацион следует включать необходимое количество свежих фруктов, овощей, а также наиболее популярные хлебные продукты, содержащие целлюлозу и гемицеллюлозы.

Переваривание и всасывание углеводов

Углеводы, входящие в состав пищи, обеспечивают покрытие основных потребностей организма в метаболической энергии. С точки зрения пищевой ценности (а равно и структурных особенностей) следует различать моно-, ди- и полисахариды. Моносахариды не подвергаются гидролитическому расщеплению и всасываются в тонком кишечнике в неизменном виде. Дисахариды расщепляются под действием специфических ферментов, локализованных в апикальной части плазматической мембраны энтероцитов в тонком кишечнике. В свою очередь расщепление полисахаридов зависит от действия амилитических ферментов, главным образом панкреатических амилаз.

Основным углеводным компонентом пищи является полисахарид растительного происхождения – *крахмал*, молекулы которого имеют среднюю молекулярную массу 100 000 Да. Крахмал представляет собой

смесь молекул двух типов. Часть молекул данного полисахарида, называемых *амилозой*, являются линейными полимерами, состоящими из остатков глюкозы соединенных α -1,4-гликозидными связями. Другая фракция крахмала – *амилопектин* – представляет собой разветвленный полимер, состоящий из остатков глюкозы, соединенных α -1,4-гликозидными связями; в точках ветвления остатки глюкозы соединены α -1,6-гликозидной связью. Для амилопектина характерно достаточно постоянное соотношение числа α -1,4- и α -1,6-связей в молекуле, равное 20 : 1.

Другим важнейшим пищевым углеводом является животный полисахарид *гликоген*, напоминающий по строению молекулы амилопектина, но отличающийся гораздо более высокой степенью ветвления. Наиболее существенные характеристики основных пищевых углеводов приведены в табл. 6.2.

Таблица 6.2. Основные характеристики пищевых углеводов

Название углевода	Основной источник	Тип связи	Структура
Амилопектин	Картофель, рис, кукуруза, хлеб	α -Glc (1 \rightarrow 4) _n Glc с разветвлением α -Glc (1 \rightarrow 6) Glc	
Амилоза	Картофель, рис, кукуруза, хлеб	α -Glc (1 \rightarrow 4) _n Glc	
Сахароза	Столовый сахар, различные виды десерта	α -Glc (1 \rightarrow 2) β - Fru	
Трегалоза	Молодые грибы	α -Glc (1 \rightarrow 1) α -Glc	
Лактоза	Молоко, молочные продукты	β -Gal (1 \rightarrow 4) α -Glc	
Фруктоза	Фрукты, мед	Fru (моносахарид)	
Глюкоза	Фрукты, мед, виноград	Glc (моносахарид)	
Раффиноза	Бобовые	α -Gal (1 \rightarrow 6) α -Glc (1 \rightarrow 2) β -Fru	

Расщепление крахмала и экзогенного гликогена начинается в ротовой полости под действием *эндосахаридазы* секрета слюнных желез, на-

зывается α -амилазой. Данный фермент не только присутствует в слюне, но также продуцируется секреторными клетками поджелудочной железы. Эффективность действия α -амилазы существенно возрастает после гидратирования крахмала в результате термической обработки. α -Амилаза, представляя собой эндосахаридазу, проявляет специфичность по отношению к внутренним α -1,4-связям. Гидролитическое действие этого фермента не распространяется на α -1,6-связи и на α -1,4-связи, образованные остатками глюкозы, которые служат точками ветвления (рис. 6.1).

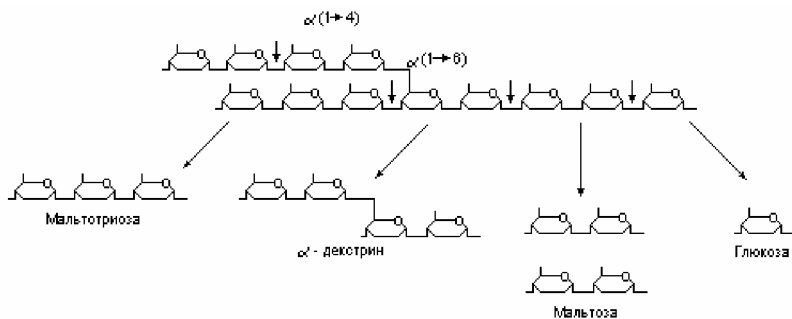


Рис. 6.1. Расщепление амилопектина под действием α -амилазы слюнных и поджелудочной желез

Панкреатическая изоформа α -амилазы секретируется в количестве, значительно превосходящем необходимое для расщепления крахмала, и с пищеварительной точки зрения более важна, чем α -амилаза слюны. Продуктами действия панкреатической α -амилазы являются главным образом мальтоза [α -Glc (1 \rightarrow 4) α -Glc], трисахарид мальтотриоза [α -Glc (1 \rightarrow 4) α -Glc (1 \rightarrow 4) α -Glc] и так называемые α -ограниченные декстрины, состоящие в среднем из восьми остатков глюкозы с одной или несколькими α -1,6-связями. Окончательный гидролиз ди- и олигосахаридов до моносахаридов осуществляется поверхностными ферментами эпителиальных клеток тонкого кишечника (рис. 6.1).

Большинство поверхностных олигосахаридаз представляют собой *экзоферменты*, которые отщепляют по одному моносахаридному остатку с нередуцирующего конца гидролизуемого олигосахарида. Характеристика основных олигосахаридаз энтероцитов приведена в табл. 6.3.

Как уже указывалось, количество пищеварительных ферментов в норме существенно превышает количество субстрата, подлежащего гидролитическому расщеплению. Данное положение справедливо также по отношению к α -глюкозидазам, которые ответственны за расщепление крахмала до свободной глюкозы. В большом избытке к потребляемой сахарозе присутствует в тонком кишечнике и сахараза. Однако в ряде случаев у отдельных людей может иметь место дефицит фермента лактазы

(β -галактозидазы), ответственной за гидролитическое расщепление основного углевода молока – лактозы. По последним данным отсутствие или дефекты интестинальных дисахаридаз относительно часто встречаются у людей. По разным причинам иногда может наблюдаться дефицит не одной, а сразу нескольких дисахаридаз. К таким причинам относятся в первую очередь генетические дефекты, возрастные физиологические отклонения, а также последствия повреждений слизистой оболочки тонкого кишечника. Среди всех известных дисахаридаз именно лактаза отличается наиболее частым либо полным, либо частичным отсутствием в плазматических мембранах эпителиальных клеток тонкого кишечника. Отсутствие данного фермента приводит к нарушению усвоения лактозы, известному как *интолерантность к молоку и многим молочным продуктам*.

Таблица 6.3. Ди- и олигосахаридазы люминальной поверхности плазматических мембран энтероцитов

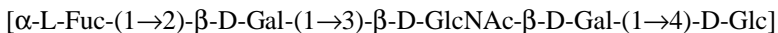
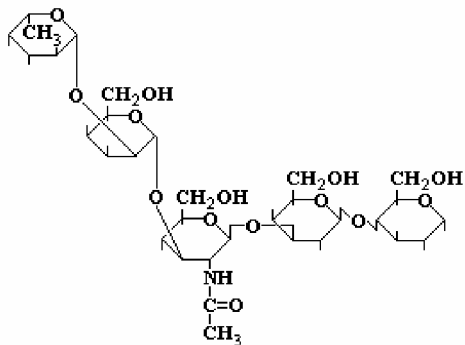
Название фермента	Расщепляемая связь	Природный субстрат	Продукт реакции
Экзо – 1,4- α -глюкозидаза (глюкоамилаза)	α -(1→4) глюкоза	Амилоза	Глюкоза
Олиго – 1,6- α -глюкозидаза (изомальтаза)	α -(1→6) глюкоза	Изомальтоза, α -декстрин	Глюкоза
Глюкозидаза (мальтаза)	α -(1→4) глюкоза	Мальтоза, мальтотриоза	Глюкоза
Сахарозо- α -глюкозидаза (сахараза)	α -глюкоза	Сахароза	Глюкоза, фруктоза
α , α -Трегаласа	α -(1→1) глюкоза	Трегалоза	Глюкоза
β -Глюкозидаза	β -глюкоза	Глюкозилцерамид	Глюкоза, церамид
β -Галактозидаза	β -галактоза	Лактоза	Глюкоза, галактоза

Обычными следствиями неспособности организма гидролизовать лактозу являются, во-первых, неспособность усваивать лактозу и, во-вторых, активное участие кишечной флоры в утилизации этого молочного сахара. Участие бактериальных ферментов в сбраживании лактозы приводит к активизации процессов образования газов, что сопровождается возникновением неприятных ощущений вздутия кишечника. Кроме того, в результате расщепления лактозы с участием бактериальных ферментов образуются осмотически активные соединения, обеспечивающие обильное поступление воды в полость кишечника, сопровождающееся диареей.

Интересной особенностью такого замечательного молочного продукта, как «болгарская простокваша» – йогурт, является практически полное отсутствие лактозы, которая гидролизуетса соответствующими штаммами молочнокислых бактерий (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus jogurty* и *Lactococcus lactis*) в процессе ферментации. По этой причине йогурт рекомендуют тем пациентам, которые страдают лактозной инто-

лерантностью. Наиболее ценными с этой точки зрения являются различные виды йогурта, содержащего живые культуры. Кроме того, в последнее время были разработаны эффективные методы очистки β -галактозидазы до гомогенного состояния, и коммерческие препараты этого фермента используются для предварительной обработки молока и других молочных продуктов, рекомендованных людям с интолерантностью к молоку [39].

Большую группу природных олигосахаридов составляют олигосахариды женского молока, которые играют важную роль в формировании кишечной флоры новорожденных, необходимой для нормального пищеварения в постнатальный период. Они способствуют развитию в пищеварительном тракте микроорганизма *Lactobacillus bifidus*, расщепляющего основной олигосахарид женского молока – лактозу (для примера: в одном литре женского молока содержится около 70 г лактозы) с образованием молочной и уксусной кислот, которые препятствуют размножению патогенных бактерий, в частности тифозной палочки. В состав этих олигосахаридов входят D-глюкоза, D-галактоза, L-фукоза и N-ацетилглюкозамин, а характерным базовым структурным элементом таких олигосахаридов является остаток лактозы. Одним из наиболее крупных олигосахаридов женского молока является лакто-N-фукопентаоза:



Моносахариды, образующиеся в результате гидролитического расщепления поли-, олиго- или дисахаридов, всасываются энтероцитами тонкого кишечника. На рис. 6.2 приведена схема, иллюстрирующая процесс расщепления и последующего всасывания моносахаридов.

Ди-, олиго- или полисахариды, которые не гидролизуются α -амилазой и/или поверхностными интестинальными ферментами, лишены способности всасываться. Поэтому эти нерасщепляемые фракции углеводов в неизменном виде достигают нижних отделов кишечника, содержащих кишечную флору. Бактерии, населяющие данный отдел желудочно-

кишечного тракта, утилизируют большую часть нерасщепляемых углеводов благодаря наличию гораздо более разнообразного, чем у человека, набора ферментов, способных гидролизовать структурно различные углеводы. Моносахариды, образованные под действием бактериальных ферментов, как правило, используются самими бактериями и в результате анаэробного расщепления превращаются в *короткоцепочечные жирные кислоты, молекулярный водород, метан и двуокись углерода*. Указанные соединения могут инициировать секрецию жидкости в полость кишечника, спазмы кишечника, вздутие кишечника вследствие повышения внутриполостного осмотического давления, а в ряде случаев – непосредственные повреждения слизистой оболочки.

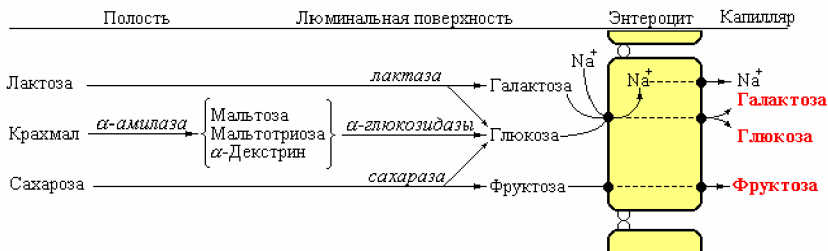
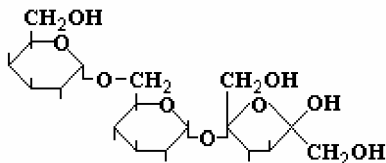


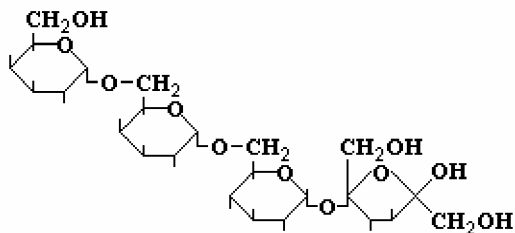
Рис. 6.2. Переваривание и всасывание углеводов [20]

Хорошо известны наиболее характерные последствия употребления в пищу больших количеств бобовых, таких как собственно бобы, горох, фасоль и соя. Эти продукты питания содержат необычные олигосахариды, которые не гидролизуются ферментами пищеварительного тракта человека. К таким необычным олигосахаридам относят модифицированную сахарозу, к которой присоединены один или несколько остатков галактозы. Характерной особенностью олигосахаридов данного семейства является то, что остатки галактозы образуют гликозидные связи в α -конфигурации, и эти связи могут быть расщеплены только с участием бактериальных ферментов. Простейшим олигосахаридом этого семейства является уже упоминавшаяся *раффиноза*:



[α -Gal (1 \rightarrow 6) α -Glc (1 \rightarrow 2) β -Fru]

Почти так же широко, как сахароза и раффиноза, в продуктах растительного происхождения распространен еще один олигосахарид – *стакхиоза*, расщепление которого зависит от деятельности кишечной флоры:



[α -Gal (1 \rightarrow 6) α -Gal (1 \rightarrow 6) α -Glc (1 \rightarrow 2) β -Fru]

Молодые грибы часто содержат довольно большие количества обычного дисахарида (см. табл. 6.2) – трегалозы [α -Glc (1 \rightarrow 1) α -Glc], расщепление которого также обеспечивается только специфическим ферментом кишечных бактерий – *трегалазой*.

Всасывание моносахаридов

В процессе переваривания пищи мономерные звенья биополимеров (моносахариды, свободные аминокислоты) всасываются через эпителиальные клетки кишечника *против градиента концентрации*. Источником энергии, необходимой для такого «активного» транспорта, служит не химическая энергия гидролиза АТФ, а концентрационный градиент (или электрохимический потенциал) ионов Na^+ , создающийся на апикальной стороне плазматической мембраны. Примером такого транспорта служит перенос глюкозы, который непосредственно зависит от электрохимического градиента ионов Na^+ и только косвенно – от АТФ.

В условиях *in vivo* глюкоза (и структурно родственные моносахариды) всасывается из полости кишечника в кровь через эпителий против градиента концентрации. Этот направленный перенос является результатом сочетания нескольких отдельных мембранных процессов:

- ♦ АТФ-зависимого переноса Na^+ за пределы клетки, что служит причиной возникновения электрохимического натриевого потенциала;
- ♦ присутствия двух разных транспортных систем для глюкозы в апикальной и базальной частях плазматической мембраны энтероцитов;
- ♦ сопряженного транспорта Na^+ и глюкозы через апикальную сторону мембраны (рис. 6.3).

Основная часть моносахаридов, образующихся в результате переваривания поли- и олигосахаридов, представлена в первую очередь D-глюкозой, затем D-галактозой и D-фруктозой. Всасывание этих и других (минорных) моносахаридов представляет собой процесс, зависящий

от функционирования специфических переносчиков, которые характеризуются такими особенностями, как субстратная специфичность, стереоспецифичность, кинетика насыщения и отношение к специфическим ингибиторам.

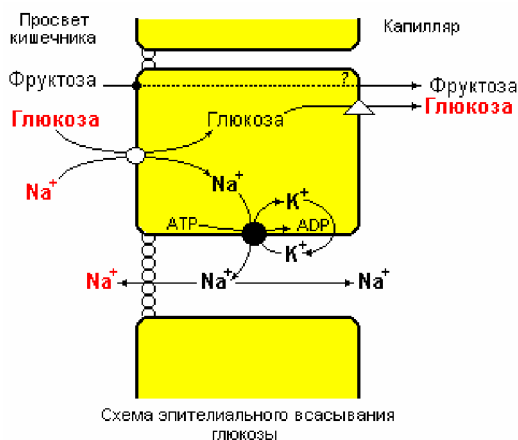
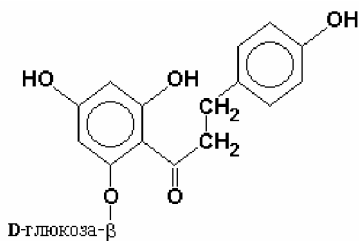


Рис. 6.3. Модель Na^+ -зависимого всасывания глюкозы и Na^+ -независимого всасывания фруктозы эпителиальными клетками тонкого кишечника [20]

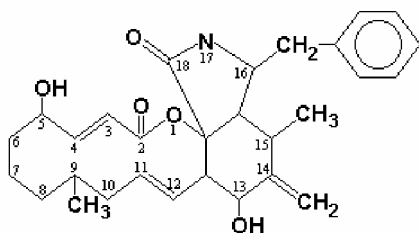
В настоящее время известны, по крайней мере, два типа переносчиков моносахаридов, которые катализируют поступление этих углеводов из полости кишечника в энтероциты. Это, во-первых, переносчик, состоящий из тетрамеров с молекулярной массой около 75 000 Да на субъединицу, который обеспечивает совместный активный транспорт моносахаридов и ионов Na^+ . Данный переносчик, ответственный за транспорт D-глюкозы и D-галактозы, специфически идентифицируется ингибитором флоризином. Во-вторых, это Na^+ -независимый переносчик, обеспечивающий транспорт D-фруктозы по принципу облегченной диффузии.



Флоризин
(флоретин-2-β-глюкозид)

Итак, апикальная сторона плазматической мембраны энтероцитов содержит транспортную систему, которая способствует тесно связанному

переносу Na^+ и D-глюкозы и структурно похожих углеводов в клетку. Данная транспортная система обеспечивает перенос глюкозы и Na^+ в обоих направлениях в равной степени эффективно. Однако вследствие более высокой концентрации ионов Na^+ в полости кишечника и отрицательного потенциала в клетке (-60 mV) совместный перенос Na^+ и глюкозы происходит в направлении полость \rightarrow клетка даже несмотря на то, что концентрация глюкозы в клетке выше, чем в полости кишечника. Модельные эксперименты в условиях *in vitro* показывают, что разница в концентрации глюкозы в полости и в клетке может быть двадцатикратной, если заблокировать отток глюкозы из клетки, например, специфическим ингибитором – цитохалазином В.



Цитохалазин В

Отсюда следует, что в ряде случаев именно поглощение Na^+ , описываемое данным механизмом, может быть более важным для поступления глюкозы в энтероциты, чем различия в концентрации этого моносахарида в полости и в клетке.

Поскольку совместный перенос Na^+ и глюкозы в клетку и простая облегченная диффузия глюкозы из клеток в кровь, по существу, не являются направленными, активный трансэпителиальный транспорт глюкозы может поддерживаться на постоянном уровне только в случае непрерывной работы Na^+, K^+ -АТФазы, выталкивающей ионы Na^+ за пределы эпителиальных клеток. Таким образом, активный транспорт глюкозы косвенно зависит от гидролиза АТФ под действием Na^+, K^+ -АТФазы.

Базальная часть плазматической мембраны энтероцитов содержит Na^+ -независимую транспортную систему, представленную переносчиком, имеющим молекулярную массу $\sim 45\,000$ Да. Эта транспортная система специфически ингибируется цитохалазином В и ответственна за перенос D-глюкозы и D-галактозы по градиенту концентрации. Такие же типы переносчиков обнаружены в печени, почках, мозге, эритроцитах, адипоцитах и клетках миокарда. Этот Na^+ -независимый транспорт D-глюкозы по градиенту концентрации через мембраны клеток кишечника, печени и почек обеспечивает выход сахара из клеток данных органов в кровяное русло при физиологических условиях, в то время как в мозге и эритроцитах Na^+ -независимая транспортная система отвечает за поглощение D-глюкозы этими чувствительными к уровню сахара клетками. Дополни-

тельные сведения о переносчиках глюкозы, обеспечивающих взаимный обмен тканей данным моносахаридом, приведены в Приложении 1 к лекции 6.

Сравнительная характеристика Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого транспорта D-глюкозы в клетках тонкого кишечника приведена в табл. 6.4.

Таблица 6.4. Сравнительная характеристика транспортных систем, ответственных за перенос глюкозы через апикальную и базальную части плазматической мембраны энтероцитов

Характеризуемый параметр	Апикальная поверхность	Базальная поверхность
Влияние ионов Na^+	Транспорт совместно с ионами Na^+	Нет
Хорошие субстраты	D-глюкоза, D-галактоза, α -метил- D-глюкоза	D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, 2-дезоксид-глюкоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Страйер, Л. Биохимия: в 3 т. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1985.
2. Врожденные и приобретенные ферментопатии / под ред. Т. Ташева. – М. : Медицина, 1980.
3. Внутренние болезни: лекции для студентов и врачей / под ред. Б. И. Шулутко. – СПб., 1992.
4. Горячковский, А. М. Справочное пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – Одесса : ОКФА, 1994.
5. Зайчик, А. Ш. Основы патохимии / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2000. – 687 с.
6. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. – М. : Мир, 1993. – Т. 1–2.
7. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем. – М. : Мир, 2000. – 469 с.
8. Методы клинических лабораторных исследований: уч. пособие / под ред. В. С. Камышникова. – Минск : Белорусская наука, 2001. – 692 с.
9. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии / А. А. Чиркин. – Минск : Новое знание, 2002.

Дополнительная литература

10. Мецлер, Д. Биохимия / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1980. – Т. 1–3.
11. Mudd, S. H. The natural history of homocystinuria due to cystathione β -synthase deficiency // Am. J. Hum. Genet. – 1985. – Vol. 37. – P. 1–13.
12. Woo, S. L. C. Molecular basis and population genetics of phenylketonuria // Biochemistry. – 1989. – Vol. 28. – P. 1–18.
13. Kvittingen, E. A. Hereditary tyrosinemia type I // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1986. – Vol. 46. – P. 27–58.
14. Nelson, D. L. Lehninger Principles of Biochemistry / D. L. Nelson [et al.]. – San Francisco, 2004.
15. Metzler, D. Biochemistry (The chemical reactions in living cells). – Elsevier Academic Press, 2003–2004. – Vol. 1–2.
16. Berg, J. M. Lubert Stryer / J. M. Berg, I. L. Tymoczko // Biochemistry / W. H. Freeman [et al.]. – San Francisco, 2006.
17. Ленинджер, А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1985.
18. Hirokawa, N. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells / N. Hirokawa, J. Heuser // J. Cell Biol. – 1981. – Vol. 91. – P. 399.
19. Дюв, К. Путешествие в мир живой клетки / К. Дюв. – М. : Мир, 1987.
20. Textbook of Biochemistry with clinical correlations / T. M. Devlin [et al.]. – WILEY-LISS, 1993.
21. Shultz, T. D. Vegetarianism and Health / T. D. Shultz [et al.] // Nutrition Update. – New York: Wiley, 1985. – Vol. 2.
22. Shultz, T. D. First International Congress on Vegetarian Nutrition / T. D. Shultz [et al.] // Proc. Am. J. Clin. Nutr. – 1988. – Vol. 48 (Suppl. 1).
23. Goodship, T. H. I. Nutritional approaches to preserving renal function / T. H. Goodship, W. E. Mitch // Adv. Intern. Med. – 1988. – Vol. 33. – P. 377.

24. Blow, D. M. X-ray diffraction studies of enzymes / D. M. Blow, T. A. Steitz // *Ann. Rev. Biochem.* – 1976. – Vol. 39. – P. 86–95.
25. Kraut, I. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis // *Ann. Rev. Biochem.* – 1977. – Vol. 46. – P. 331–358.
26. Lipscomb, W. N. Structure and mechanisms of enzymes // *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* – 1971. – Vol. 15. – P. 131–156.
27. Quijcho, F. A. Carboxypeptidase A: protein and an enzyme / F. A. Quijcho, W. N. Lipscomb // *Advan. Protein Chem.* – 1971. – Vol. 25. – P. 1–78.
28. Breslow, R. Unified picture of mechanisms of catalysis by carboxy peptidase A / R. Breslow, D. L. Wernick // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74. – P. 1303–1307.
29. Silk, D. B. A. Disorders of nitrogen absorption. Clinics in gastroenterology // *Familial inherited abnormalities*. Vol. 11. / ed. I. T. Harries. – London : Saunders, 1982. – P. 47–73.
30. Fisher, H. F. Glutamate dehydrogenase / H. F. Fisher // *Methods Enzymol.* – 1985. – Vol. 113. – P. 16–29.
31. Ellem, K. A. O. The dependence of DNA and RNA synthesis on protein synthesis in asparaginasetreated lymphoma cells / K. A. O. Ellem, A. M. Fabrizio, L. Jackson // *Cancer Res.* – 1970. – Vol. 30. – P. 515–526.
32. Grisolia, S. The urea cycle / S. Grisolia, R. Bagueña, F. Mayor. – New York : Wiley, 1976.
33. Brusilow, S. W. Treatment of episodic hyperammonemia in children with in-born errors of urea synthesis // *New Engl. J. Med.* – 1984. – Vol. 310. – P. 1630–1642.
34. Nyhan, W. L. Metabolism of glycine in the normal individual and in patients with non-ketonic hyperglycinemia // *J. Inherited Metab. Dis.* – 1982. – № 5. – P. 105–110.
35. Yeaman, S. J. The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: a complex family // *Trends Biochem., Sci.* – 1986. – Vol. 11. – P. 293–298.
36. Zhang, B. Evidence for both a regulatory and structural mutation in a family with maple surup urine disease / B. Zhang [et al.] // *Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 83. – P. 1425–1434.
37. Mahoney, M. Recent advances in the inherited methylmalonic acidemias / M. Mahoney, D. Bick // *Acta Ped. Scand.* – 1987. – Vol. 76. – P. 689–695.
38. Vrana, A. Metabolic effects of high sucrose fructose intake / A. Vrana, P. Fabry // *World Rev. Nutr.* – 1983. – Vol. 42. – P. 56–68.
39. Buller, H. A. Lactose intolerance / H. A. Buller, R. G. Grant // *Annu. Rev. Med.* – 1990. – Vol. 41. – P. 141–149.
40. Van Schaftingen, E. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate / E. van Schaftingen, H. G. Hers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – P. 2862.
41. Hindmarsh, J. T. Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity / J. T. Hindmarsh, R. F. McCurdy // *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 1986. – Vol. 23. – P. 315–321.
42. Misra, P. S. Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital after chronic ethanol administration in man and in rats / P. S. Misra [et al.] // *Am. J. Med.* – 1971. – Vol. 51. – P. 346–354.
43. Hallfrish, J. Metabolic effects of dietary fructose // *FASEB J.* – 1990. – Vol. 4. – P. 2652–2678.

44. Perheentupa, J. Hereditary fructose intolerance / J. Perheentupa, K. O. Raivio, E. A. Nikkila // *Acta Med. Scand.* – 1972. – Vol. 65. – 542 (Suppl.)
45. Kruse, J. A. Lactate metabolism / J. A. Kruse, R. W. Carlson // *Crit. Care Clin.* – 1985. – Vol. 3. – P. 725–734.
46. Silverman, K. J. Angina pectoris: natural history and strategies for evaluation and management / K. J. Silverman, M. Grossman // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 310. – P. 1712–1721.
47. Hugenholtz, P. G. Calcium antagonists for angina pectoris // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 522. – P. 565–579.
48. Kehrer, J. P. Concepts related to the study of reactive oxygen and cardiac reperfusion injury // *Free Rad. Res. Commun.* – 1986. – Vol. 5. – P. 305–317.
49. Granger, D. N. Role xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury // *Am. J. Physiol.* – 1988. – Vol. 255. – P. 1269.
50. Mitchell, G. A halothane-induced biochemical defect in muscle of normal and malignant hyperthermia-susceptible land-race pigs / G. Mitchell, J. J. A. Heffron, A. J. J. van Rensberg // *Anesth. Analg.* – 1980. – Vol. 59. – P. 250–263.
51. Nelson, T. E. Sarcoplasmic reticulum function in malignant hyperthermia // *Cell. Calcium.* – 1988. – Vol. 9. – P. 257–269.
52. Michelson, J. R. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptors in malignant hyperthermia / J. R. Michelson, E. M. Gallant, L. A. Litterer // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 263. – P. 9310–9321.
53. Claus, T. H. The role of fructose-2,6-bisphosphate in regulation of carbohydrate metabolism / T. H. Claus [et al.] // *Curr. Topics Cell Regul.* – 1984. – Vol. 23. – P. 57–73.
54. Valentine, W. N. The Stratton lecture: Hemolytic anemia and inborn errors of metabolism / W. N. Valentine // *Blood.* – 1979. – Vol. 54. – P. 549–559.
55. Ballard, F. J. The development of gluconeogenesis in rat liver: controlling factors in the newborn / F. J. Ballard // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 124. – P. 265–278.
56. Segal, S. The metabolism of galactose by patient with congenial galactosemia / S. Segal, A. Blair, H. Roth // *Am. J. Med.* – 1965. – Vol. 83. – P. 62–73.
57. Segal, S. Disorders of galactose metabolism // *The metabolic basis of inherited diseases* / J. B. Stanbury [et al.]. – New York, 1978. – P. 160–181.
58. Sheu, K. F. Pyruvate dehydrogenase complex activity in normal and deficient fibroblasts / K. F. Sheu, C. C. Hu, M. F. Utter // *J. Clin. Invest.* – 1981. – Vol. 67. – P. 1463–1475.
59. Stagpoole, P. W. Treatment of lactic acidosis with dichloroacetate / P. W. Stagpoole [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1983. – Vol. 309. – P. 391–402.
60. McGrane, M. M. Metabolic control of gene expression: in vivo studies with transgenic mice / M. M. McGrane [et al.] // *Trends Biochem. Sci.* – 1992. – Vol. 17. – P. 40–48.
61. Carpenter, C. C. Secretory diarrhea // *American Physiol. Society* / M. Field [et al.]. – Bethesda, 1980. – P. 67–83.
62. Cori, C. F. Polysaccharide phosphorylase / C. F. Cori, G. T. Coci // *Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1942–1962)*. – : American Elsevier, 1964.
63. Buchell, A. The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system / A. Buchell, I. D. Waddel // *Biochim Biophys Acta.* – 1991. – Vol. 1092. – P. 129–137.
64. Cori, G. T. Glucose-6 phosphatase of the liver in glycogen storage disease / G. T. Cori, C. F. Cori // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 199. – P. 661–677.

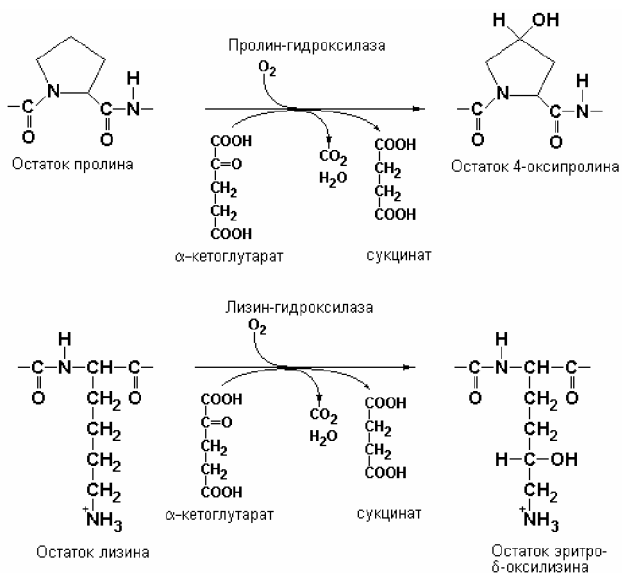
65. Van Hoff, F. The subgroups of type III glycogenosis / F. van Hoff, H. G. Hers // *Eur. J. Biochem.* – 1967. – Vol. 2. – P. 265–278.
66. McArdle, B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown // *Clin. Sci.* – 1951. – Vol. 10. – P. 13–18.
67. Дюв, К. Путешествие в мир живой клетки / К. Дюв. – М.: Мир, 1987.
68. Hers, H. G. α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe disease) // *Biochem. J.* – 1963. – Vol. 86. – P. 11–23.
69. Stalmans, W. Glucogen synthesis from UDPG / W. Stalmans, H. G. Hers // *Academic Press*, 1973. – Vol. 9. – P. 310–361.
70. Lomako, J. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis / J. Lomako, W. M. Lomako, W. J. Whelan // *FASEB J.* – 1988. – Vol. 2. – P. 3097–3105.
71. Krebs, H. A. Inhibition of heratio gluconeogenesis by ethanol / H. A. Krebs [et al.] // *Biochem. J.* – 1969. – Vol. 112. – P. 117–129.
72. Beutler, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency // *The metabolic basis of inherited disease* / J. B. Stanbury [et al.]. – New York: McGraw Hill, 1978. – P. 1430–1449.
73. Blass, J. P. Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome / J. P. Blass, G. E. Gibson // *New Engl. J. Med.* – 1977. – Vol. 297. – P. 1637–1370.
74. Arnone, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin // *Nature.* – 1972. – Vol. 237 (5351). – P. 146–149.
75. Dang, C. V. Oncogenic alterations of metabolism / C. V. Dang, G. L. Semenza // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 2. – P. 68–72.
76. McKusick, V. The mucopolysaccharide storage disease / V. McKusick, E. F. Neufeld // *The metabolic basis of inherited* / J. B. Stansbury [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 1983. – P. 751.
77. Tallman, F. catabolism of Tay-Sachs ganglioside in rat brain lysosomes / F. Tallman, R. O. Brady // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247. – P. 7570–7575.
78. Sewell, A. C. Urinary oligosaccharide excretion in disorders of glycolipid, glycoprotein and glycogen metabolism: A review of screening for differential diagnosis // *Eur. J. Pediatr.* – 1980. – Vol. 134. – P. 183–245.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 К ЛЕКЦИИ 5

Гидроксирование и другие модификации белков соединительных тканей

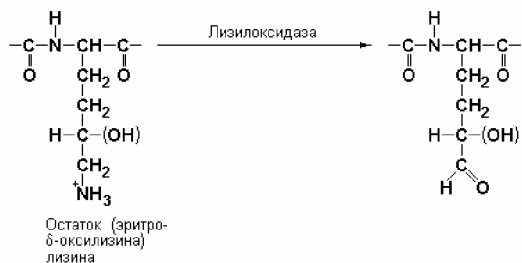
Коллаген – один из наиболее распространенных белков в организме. Он составляет большую часть органической массы кожи, сухожилий, кровеносных сосудов, костей, роговицы и стекловидного тела глаз, а также является компонентом мембран. Близкий по свойствам к коллагену белок – эластин – был обнаружен в эластичных фибриллах соединительных тканей, содержащихся в связках и стенках кровеносных сосудов. Коллаген синтезируется фибробластами и выделяется в межклеточное пространство, где он полимеризуется, образуя прочный долгоживущий материал. Внутриклеточный предшественник коллагена – проколлаген, как и зрелый белок, состоит из трех цепей. Основная форма коллагена в большей части тканей большинства видов организмов (коллаген I) содержит две $\alpha 1(I)$ -цепи и одну $\alpha 2$ -цепь, в связи с чем его обозначают как $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$. Коллаген хрящей (коллаген II) содержит три $\alpha 1$ -цепи и обозначается как $[\alpha 1(II)]_3$. Коллаген III, обнаруживаемый в различных тканях, особенно эмбрионов, имеет строение $[\alpha 1(III)]_3$.

Каждая цепь проколлагена (молекулярная масса 140 000 Да) содержит более 1000 аминокислотных остатков. Под действием специфических гидроксилаз происходит гидроксирование некоторых остатков пролина и лизина в проколлагеновых цепях с образованием *4-окси-пролина* и *оксилизина* соответственно.



Указанные гидроксилирующие ферменты относятся к группе монооксигеназ, способных принимать атомы водорода от α -кетоглутарата, декарбоксилируемого в этом случае в сукцинат. Под действием пролингидроксилазы может также происходить образование 3-оксипролина, но в меньших количествах. Гидроксилирование начинается уже тогда, когда растущие полипептидные цепи проколлагена еще связаны с рибосомами, расположенными на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума. Полагают, что как *пролингидроксилаза*, так и *лизингидроксилаза* проколлагена локализованы в пузырьках эндоплазматического ретикулума.

Некоторые гидроксильные группы боковых цепей оксипролина в составе проколлагена подвергаются гликозилированию путем переноса на них галактозильных единиц, а затем дополнительно на некоторые галактозильные группы переносятся гликозильные остатки. Три проколлагеновые цепи связываются друг с другом и образуют тройную спираль еще до их выделения из фибробластов. В межклеточном пространстве проколлаген подвергается действию двух специфических ферментов – проколлагенпептидаз, которые отщепляют с С-конца каждой из трех цепей полипептид с молекулярной массой приблизительно 35 000 Да, а с N-конца каждой из трех цепей – полипептид с молекулярной массой, равной приблизительно 20 000 Да. Аминокислотный состав отщепляемых полипептидов существенно отличается от аминокислотного состава остающегося коллагенового мономера (называемого также тропоколлагеном), который на треть состоит из глицина и содержит много пролина. Эти концевые полипептиды связаны друг с другом в молекулах проколлагена дисульфидными мостиками, образующимися до их выделения из клеток. Мономеры коллагена представляют собой трехнитевые «тяжи» диаметром приблизительно 1,5 нм и длиной 300 нм. Достигая места своей окончательной локализации, они связываются друг с другом поперечными связями, образуя коллаген. Этот процесс инициируется окислением аминокислотных групп боковых цепей некоторых остатков лизина и оксипролина до альдегидных групп, катализируемым медьсодержащими оксидазами.



Альдегидные группы вступают в различные реакции, приводящие к образованию поперечных связей между тропоколлагеновыми единицами и к образованию нерастворимых нитей. Одной из реакций является аль-

дольная конденсация, сопровождающаяся отщеплением молекулы воды (рис. 5.1.1, стадия *а*). Если один из двух альдегидов, участвующих в альдольной конденсации, происходит из оксализина, то образуются два изомерных продукта. Продукт альдольной конденсации может реагировать дальше: имидазольная группа боковой цепи гистидина способна присоединиться к двойной углерод-углеродной связи, а боковая цепь лизина может образовать со свободным альдегидом Шиффово основание. Результаты этих двух процессов иллюстрируются уравнением на рис. 5.1.1 (стадия *б*).

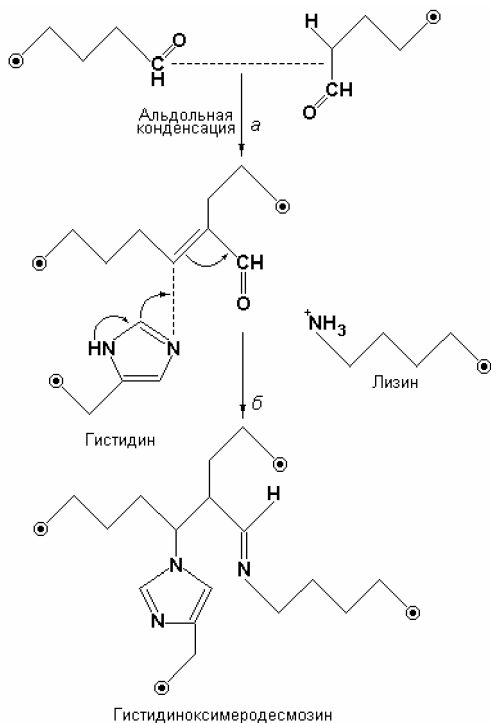


Рис. 5.1.1. Схема образования нерастворимых нитей коллагена

В конечном продукте, гистидиноксимеродесмозине, связаны друг с другом четыре боковые группы разных аминокислотных остатков. В других случаях между альдегидом и ϵ -аминогруппами образуются простые Шиффовы основания или происходят только две из трех реакций, приведенных на рис. 5.1.1.

Поперечные связи, по-видимому, распределены не беспорядочно, а находятся в определенных положениях и часто располагаются в направлении концов мономеров коллагена. Остатки гистидина были обнаружены в полипептидных цепях только в положениях 89, 929 и 1034. Разнооб-

разие и число поперечных связей варьируют при переходе от одного вида к другому.

Поперечные связи необычного характера были обнаружены в эластине. Три альдегидные группы взаимодействуют с одной аминок группой лизина при помощи реакций альдольной конденсации, дегидратации и окисления, образуя десмозин и изодесмозин. В нативной молекуле эластина все четыре аминок группы и карбоксильные группы участвуют, по-видимому, в образовании пептидной связи.

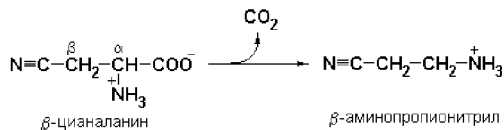
Генетические дефекты структуры коллагена

При изучении любого белка, играющего определенную роль в функционировании организма, исследователи постоянно сталкиваются с целым рядом генетических проблем. В случае коллагена возможность проявления вредных мутаций достаточно высока, поскольку этот белок кодируется больше чем одним набором генов. Действительно, было идентифицировано по меньшей мере четыре типа коллагена, характеризующихся вполне определенными различиями на молекулярном уровне, и было показано, что различные гены коллагена по-разному проявляют себя в разных тканях. Например, молекулы коллагена хрящей состоят преимущественно из трех идентичных α -цепей, отличающихся по аминокислотной последовательности от $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей коллагена сухожилий и костей. Коллаген кожи маленьких детей и коллаген клапанов сердца и крупных артерий содержат полипептидные цепи двух других типов.

Четко выраженной наследственной аномалией коллагена является заболевание крупного рогатого скота *дерматоспараксис*, при котором кожа животного становится очень ломкой. Цепи коллагена при этом заболевании не обладают упорядоченной структурой и потому не способны образовывать фибриллы. Данная аномалия обусловлена дефектом проколлагенпептидазы – фермента, отщепляющего пептиды с N-концов цепей коллагена.

Коллагеновым заболеванием человека является *синдром Элерса–Данлоса*, который в ряде случаев сопровождается деформацией суставов и искривлением позвоночника. Одна из форм этого заболевания обусловлена недостатком проколлагенпептидазы, а другая – недостатком коллагена III. Содержание оксилизина в образующемся в данных условиях коллагене невелико, что препятствует появлению поперечных связей. Если в организм животного с пищей попадают семена обычного сладкого горошка (*Lathyrus odoratus*), то у него может наступить состояние *латуризма*. Поскольку люди также употребляют сладкий горошек, это состояние наблюдается и у людей; обычно оно приводит к деформации позвоночника и к разрыву аорты. Установлено, что биохимический эффект семян сладкого горошка обусловлен наличием в них β -цианаланина и продукта его декарбоксилирования β -аминопропионитрила. Образование β -цианаланина у растений происходит в ходе пиридоксальфосфатзависи-

мой ферментативной реакции β -замещения из цистеина. Поэтому не удивительно, что в результате нарушений обмена серусодержащих аминокислот, описанных в лекции 5, наблюдаются также клинические проявления дефектов соединительной ткани.



Хотя точный механизм действия этих соединений неясен, есть основания полагать, что они являются ингибиторами лизил-оксидазы – фермента, необходимого для окисления аминогрупп боковых цепей лизина и оксилизина до альдегидных групп с последующим образованием поперечных связей в коллагене и в эластине. Аналогичного рода заболевание, передающееся по наследству, было обнаружено у мышей. Предполагается, что оно обусловлено или недостаточной активностью лизилоксидазы, или дефектом в метаболизме меди. Кроме того, было высказано предположение, согласно которому одна из форм *синдрома Элерса–Данлоса* у людей вызвана недостаточной активностью лизилоксидазы.

В настоящее время исследуется вопрос о влиянии аномалий в структуре коллагена на состояние суставов у человека. Было, например, показано, что при широко распространенном заболевании, *остеоартрите*, в хрящах вместо коллагена обычного типа $[\alpha 1(\text{II})]_3$ содержится коллаген, имеющий в своем составе $\alpha 2$ -цепи, характеризующиеся пониженной степенью гликозилирования. С другой стороны, в хрупких костях людей, страдающих одним из видов наследственного заболевания, проявляемого в нарушениях процесса остеогенеза, наряду с содержащимся обычно в костях коллагеном типа I имеется также коллаген типа III.

Согласно имеющимся данным, содержание коллагена I в фиброзных атеросклеротических бляшках артерий человека повышено по сравнению с его содержанием в стенках нормальных артерий (содержащих в основном коллаген типа III).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 К ЛЕКЦИИ 5

Полиамины и их физиологические функции

Роль орнитина в организме не ограничивается его участием в биосинтезе мочевины. Эта аминокислота вместе с метионином служит предшественником широко распространенных у млекопитающих (и бактерий) полиаминов – спермина и спермидина. В организме здорового человека синтезируется приблизительно 0,5 ммоль спермина в сутки. Фармакологические дозы полиаминов вызывают понижение температуры и снижение кровяного давления.

Спермидин и спермин (рис. 5.2.1) участвуют в различных физиологических процессах, общим признаком которых является связь с процессами пролиферации и роста клеток. Они являются факторами роста для культур клеток млекопитающих и бактерий и играют определенную роль в стабилизации интактных клеток, субклеточных органелл и мембран.

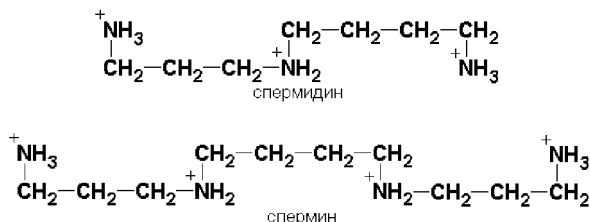


Рис. 5.2.1. Структура природных полиаминов. Спермидин и спермин являются полимерами диаминопропана и диаминобутана

Благодаря тому, что молекулы полиаминов несут большое число положительных зарядов, они легко ассоциируют с полианионами, такими как ДНК и РНК, и участвуют в фундаментальных процессах – стимуляции биосинтеза ДНК и РНК, стабилизации ДНК и упаковке ДНК в бактериофагах. Полиамины оказывают влияние на синтез белка и являются ингибиторами целого ряда ферментов, включая такие важнейшие регуляторные белки, как протеинкиназы.

Хотя в настоящее время не удается описать механизм действия полиаминов на специфические метаболические процессы, их важная роль в метаболизме млекопитающих не вызывает сомнения. Начальная реакция биосинтеза полиаминов катализируется орнитиндекарбоксилазой. В ходе этой реакции в результате декарбоксилирования орнитина (рис. 5.2.2) происходит образование путресцина (1,4-диаминобутана), являющегося основой для синтеза полиаминов.

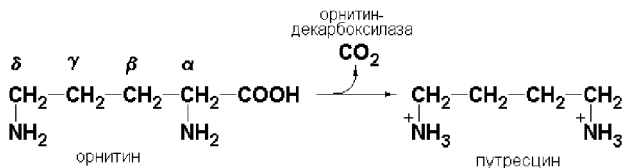


Рис. 5.2.2. Начальная стадия биосинтеза полиаминов катализируется орнитин-декарбоксилазой

О важной физиологической роли данного фермента, единственной известной функцией которого является биосинтез полиаминов, свидетельствуют данные о том, что добавление в культуру клеток млекопитающих ингибиторов орнитин-декарбоксилазы (например, α -метилорнитина или дифторметилорнитина) вызывает резкое усиление синтеза фермента.

Биосинтез полиаминов

На рис. 5.2.3 приведена схема метаболического пути биосинтеза полиаминов в тканях млекопитающих. Как следует из рисунка путресциновый фрагмент спермидина и спермина образуется из L-орнитина (интермедиата цикла мочевины), а диаминопропановый фрагмент – из L-метионина (с промежуточным образованием S-аденозилметионина). Орнитиндекарбоксилаза и S-аденозилметиониндекарбоксилаза являются индуцируемыми ферментами с коротким временем полужизни. Спермин- и спермидин-синтаза, напротив, не являются индуцируемыми и относительно «стабильны».

Из числа ферментов биосинтеза полиаминов у млекопитающих орнитиндекарбоксилаза и S-аденозилметиониндекарбоксилаза представляют интерес в плане их регуляции и возможности направленной химиотерапии. Время полужизни орнитиндекарбоксилазы (приблизительно 10 мин) меньше, чем у любого другого известного фермента млекопитающих; активность этого фермента очень быстро и повсеместно изменяется в ответ на различные стимулирующие воздействия. Например, добавление в культуру клеток млекопитающих гормона роста, кортикостероидов, тестостерона или фактора роста эпидермиса быстро повышает активность орнитиндекарбоксилазы в 10–200 раз. Было обнаружено, что при добавлении в культуру клеток полиаминов индуцируется синтез особого белкового антифермента (антизима), который, связываясь с орнитиндекарбоксилазой, ингибирует функцию фермента. Таким образом, активность орнитин-декарбоксилазы контролируется с помощью специфического белок-белкового взаимодействия подобно регуляции активности трипсина белковым ингибитором трипсина. По отношению к орнитиндекарбоксилазе дифторметилорнитин можно рассматривать как «суицидальный ингибитор», т. е. соединение, превращающееся в ингибитор под

действием самого фермента. Данное соединение используется для выделения штаммов мутантных клеток, характеризующихся гиперпродукцией орнитиндекарбоксилазы, а также в качестве ингибитора репликации клеток. Отсюда следует, что диформетилорнитин действует как химиотерапевтический фактор, мишенью которого является орнитиндекарбоксилаза.

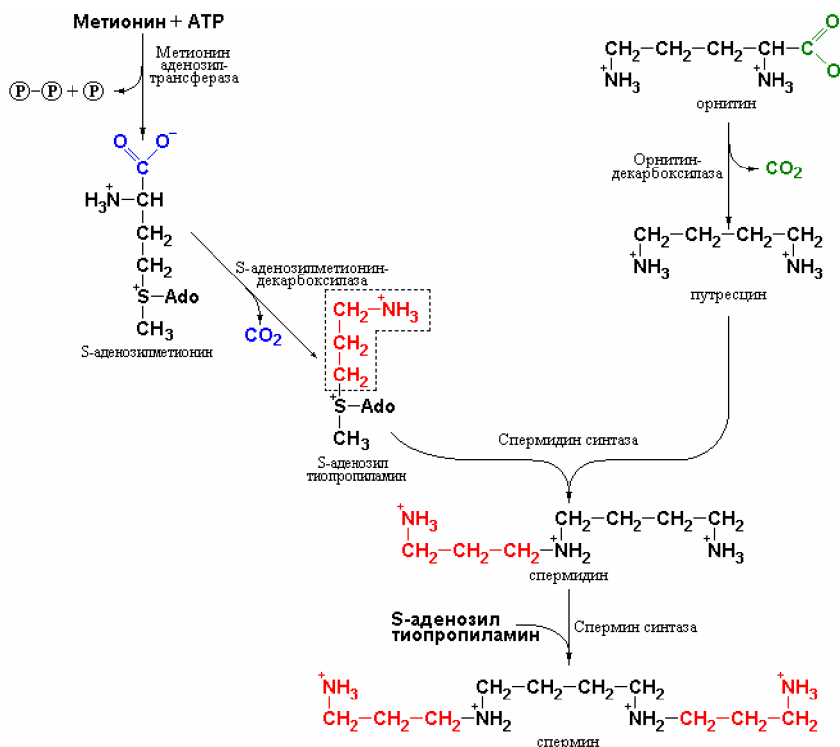


Рис. 5.2.3. Схема биосинтеза спермидина и спермина. Показаны исходные соединения, интермедиаты и ферменты, участвующие в синтезе полиаминов

S-аденозилметиониндекарбоксилаза является единственной известной эукариотической декарбоксилазой, содержащей в качестве кофактора ковалентно связанный пируват (обычно декарбоксилазы содержат кофактор пиридоксальсфосфат).

S-аденозилметиониндекарбоксилаза имеет сравнительно небольшое время полужизни (1–2 часа) и реагирует на действие стимуляторов клеточного роста подобно орнитиндекарбоксилазе, однако стимулирующий эффект проявляется несколько медленнее. Активность S-аденозилметиониндекарбоксилазы ингибируется S-аденозилметилтиопропиламином (см. рис. 5.2.3) и стимулируется путресцином.

Катаболизм полиаминов

Катаболизм полиаминов в тканях млекопитающих осуществляется с участием фермента – полиаминоксидазы, локализованного в пероксисомах гепатоцитов. Полиаминоксидаза окисляет сначала спермин в спермидин и далее спермидин в путресцин (рис. 5.2.4). При этом диаминопропановые фрагменты полиаминов превращаются в β -аминопропионовый альдегид.

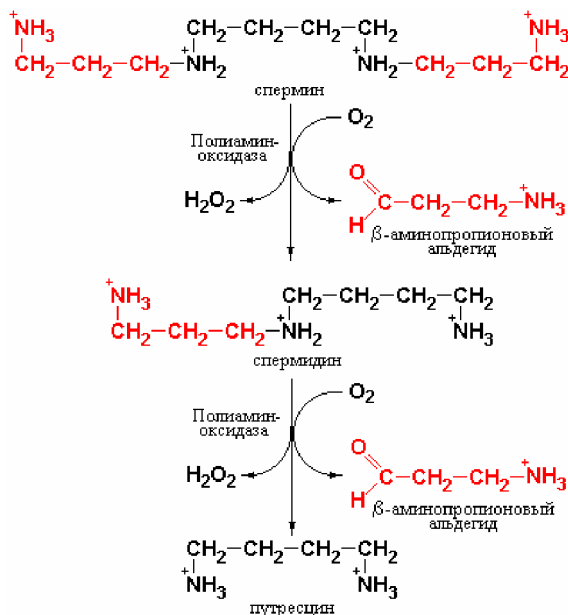


Рис. 5.2.4. Схема катаболизма полиаминов

Известно, что часть образующегося в ходе катаболизма полиаминов путресцина может окисляться до NH_4^+ и CO_2 , однако детали механизма этого процесса еще не выяснены. Основная же часть путресцина и спермидина выводится из организма в виде конъюгатов, главным образом в форме ацильных производных.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 К ЛЕКЦИИ 6

Существование семейства переносчиков глюкозы обеспечивает транспорт данного углевода в клетках животных и человека

Помимо Na^+ -зависимого переноса глюкозы из просвета тонкого кишечника в цитоплазму энтероцитов доказано присутствие целого семейства переносчиков глюкозы, которые обеспечивают термодинамически выгодный транспорт сахара по градиенту концентрации через плазматические мембраны животных клеток. Каждый из 12 белков этого семейства переносчиков, обозначаемых как GLUT1 – GLUT12, состоит из единственной полипептидной цепи, построенной приблизительно из 500 аминокислотных остатков. Общий структурный мотив этих переносчиков глюкозы заключается в наличии 12 трансмембранных сегментов, пронизывающих плазматическую мембрану животных клеток и клеток человека (рис. 6.1.1). Вместе с тем каждый из переносчиков в отдельности обладает своими характерными функциональными отличиями и, соответственно, выполняет особую роль.

Одним из наиболее полно описанных переносчиков глюкозы является универсальный переносчик GLUT1, обнаруживаемый в плазматических мембранах клеток всех тканей млекопитающих, в том числе в мембранах эритроцитов человека. Несмотря на то, что трехмерная структура GLUT1 еще не охарактеризована методом рентгеноструктурного анализа, многие исследователи считают, что гидрофильные трансмембранные каналы свойственны для многих переносчиков, в том числе переносчиков ионов. Хорошо известно, что эритроциты отличаются небольшим разнообразием метаболических путей. К этим путям относятся гликолитический распад глюкозы и пентозофосфатный путь. Таким образом, энергетический обмен в красных кровяных клетках, определяемый в первую очередь гликолизом, практически полностью зависит от непрерывного поступления в эти клетки глюкозы из плазмы крови, где концентрация данного моносахарида составляет в норме 5 мМ. Доставка глюкозы в эритроцит происходит путем облегченной диффузии с помощью указанного специфического переносчика со скоростью, в 50000 раз превышающей скорость некатализируемой диффузии. Эритроцитарный переносчик глюкозы GLUT1 является интегральным белком III типа с молекулярной массой 45 000 Да. Этот белок, как и все остальные представители семейства, содержит 12 гидрофобных сегментов, каждый из которых формирует пронизывающую мембрану α -спираль. Несмотря на то, что детальная структура GLUT1 еще не до конца установлена, весьма правдоподобной является модель, в соответствии с которой трансмембранные α -спирали переносчика располагаются рядом таким образом, что формируется канал, «высланный» изнутри остатками гидрофильных аминокислот. Бо-

ковые радикалы этих гидрофильных аминокислотных остатков склонны к образованию временных водородных связей с глюкозой по мере ее продвижения по каналу (см. рис. 6.1.1).

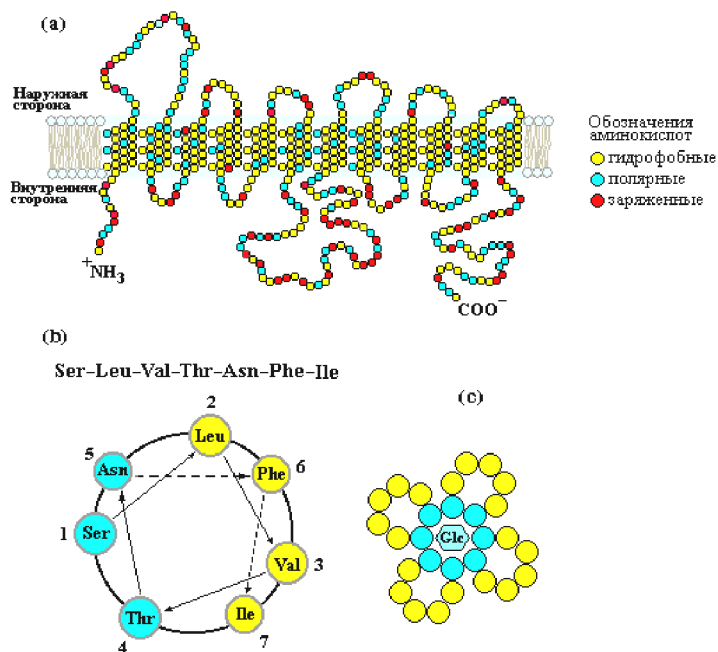


Рис. 6.1.1. Предполагаемая структура GLUT1: (a) – трансмембранные спирали представлены в виде наклонных рядов из 3–4 аминокислотных остатков, при этом каждый ряд соответствует одному обороту α -спирали. 9 из 12 трансмембранных спиралей включают три или более полярных или заряженных аминокислотных остатков, разделенных несколькими остатками гидрофобных аминокислот; (b) – кольцевая диаграмма показывает распределение полярных и неполярных аминокислот на поверхности спирализованного сегмента. Изображенная схематически спираль, как полагают, идет вдоль своей оси в направлении от N-конца. Выше показана линейная последовательность аминокислот, и каждый остаток пронумерован в круге в соответствии с тем положением, которое он занимает в спирали. Напомним, что для образования одного полного оборота спирали необходимо 3,6 аминокислотного остатка. В рассматриваемом примере полярные остатки (показаны голубым) расположены на одной стороне спирали, а гидрофобные остатки (выделены желтым – на другой. Таким образом, по определению, данная спираль является амфипатической. (c) – соединение 5 или 6 амфипатических спиралей, каждая из которых обладает полярной «поверхностью», обращенной к центральной полости, что позволяет сформировать трансмембранный канал, «выстланный» полярными и заряженными аминокислотами. Такой канал способствует образованию водородных связей с глюкозой по мере ее продвижения внутрь клетки

Процесс транспорта глюкозы может быть описан по аналогии с классической ферментативной реакцией. В этом случае субстратом являются молекулы глюкозы находящиеся за пределами клетки S_{out} , продуктом реакции служит внутриклеточная глюкоза S_{in} , а роль фермента играет переносчик T . Таким образом, транспорт глюкозы можно представить в виде зависимости скорости поглощения сахара от его внеклеточной концентрации. Тогда конечный график будет представлять собой гиперболическую зависимость; при высокой концентрации глюкозы в плазме скорость ее поступления в эритроциты будет приближаться к V_{max} (рис. 6.1.2,а).

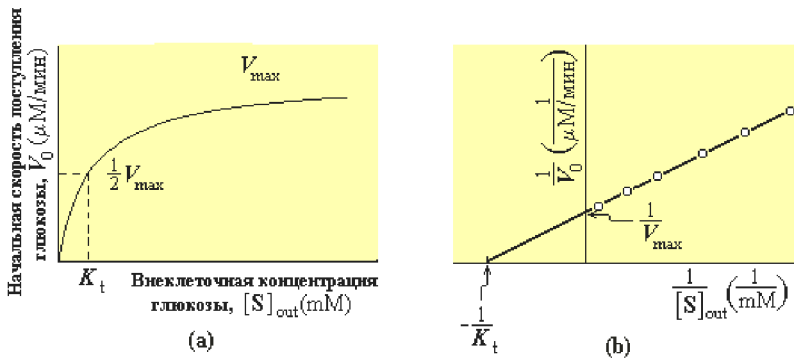
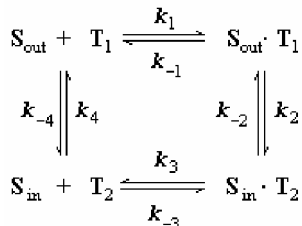


Рис. 6.1.2. Кинетика процесса транспорта глюкозы в эритроциты. (а) – начальная скорость поступления глюкозы в эритроциты, V_0 зависит от исходной концентрации сахара $[S]_{out}$ в плазме. (б) – данные графика (а) представлены в координатах Лайнуивера–Берка. Кинетика облегченной диффузии глюкозы аналогична кинетике классической ферментативной реакции, а смысл K_t аналогичен смыслу константы Михаэлиса K_M

Формально процесс переноса глюкозы в эритроциты может быть описан следующими уравнениями:



где k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} и т. д. являются константами скоростей прямой и обратной реакций для каждой стадии; T_1 – конформация переносчика, связавшего глюкозу извне; T_2 – конформация переносчика, высвобождающего

глюкозу внутрь эритроцита. Схематически эти стадии изображены на рис. 6.1.3.

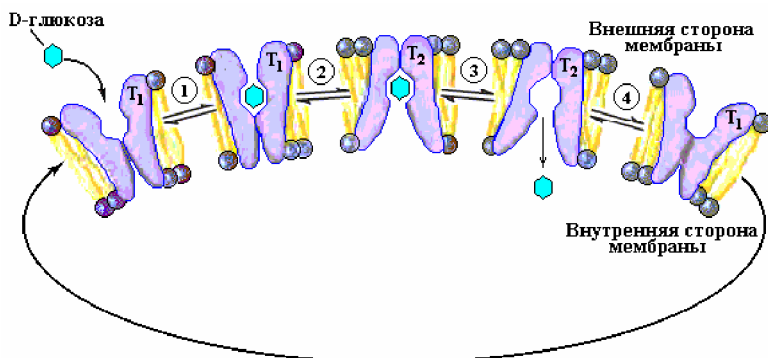


Рис. 6.1.3. Модель транспорта глюкозы в эритроциты с участием GLUT1. Переносчик существует в двух конформационных состояниях: T_1 – с сайтом связывания глюкозы, обращенным на внешнюю сторону плазматической мембраны; T_2 – со связующим сайтом, обращенным внутрь эритроцита. Транспорт глюкозы протекает в четыре стадии: 1 – Глюкоза из плазмы крови связывается со стереоспецифическим сайтом в T_1 ; 2 – это связывание снижает энергию активации конформационного перехода $[S]_{out} \cdot T_1 \leftrightarrow [S]_{in} \cdot T_2$, облегчающего трансмембранный перенос глюкозы; 3 – глюкоза высвобождается из комплекса $[S]_{in} \cdot T_2$ в цитоплазму эритроцита; 4 – переносчик возвращается в исходную конформацию T_1 , готовую для следующего раунда связывания глюкозы

Уравнение скорости поступления глюкозы можно вывести точно так же, как выводится уравнение скорости ферментативной реакции, при этом получим выражение аналогичное уравнению Михаэлиса–Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]_{out}}{K_t + [S]_{out}}$$

где V_0 – начальная скорость накопления глюкозы в эритроците при концентрации сахара в плазме, равной $[S]_{out}$, а K_t (K переноса) – является константа, аналогичная константе Михаэлиса. Другими словами, K_t – это константа, включающая несколько элементарных констант скорости, которая может служить характеристикой различных транспортных систем в целом. Это уравнение описывает начальную скорость поступления глюкозы, т. е. скорость переноса, когда $[S]_{in} = 0$. Как и в случае классических ферментативных реакций, зависимость скорости поступления глюкозы от ее внеклеточной концентрации можно представить в виде линейного графика в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 6.1.2 в), из которого легко рассчитать значения K_t и V_{\max} . Когда $[S] = K_t$, скорость переноса глюкозы равна $\frac{1}{2}V_{\max}$, т.е. процесс транспорта характеризуется полунасыщением. Концентрация глюкозы в плазме, равняющаяся в среднем 4,5–5

мМ, примерно в три раза превышает величину K_t , что обеспечивает практически полное насыщение GLUT1 субстратом, и скорость процесса переноса близка к V_{\max} .

Поскольку в процессе «превращения» S_{out} в S_{in} не происходит образования или расщепления химических связей, ни «субстрат», ни «продукт» по существу не отличаются друг от друга большей или меньшей стабильностью, а значит, транспорт глюкозы через эритроцитарную мембрану полностью обратим. По мере того, как концентрация $[S]_{\text{in}}$ уравнивается с концентрацией $[S]_{\text{out}}$, скорости «входа» и «выхода» глюкозы становятся равными. Следовательно, данная система транспорта не может обеспечить накопление глюкозы в эритроците, когда ее внутриклеточная концентрация выше концентрации в плазме. В этом случае происходит простое уравнивание содержания глюкозы по обе стороны мембраны, правда, с гораздо более высокой скоростью, чем это было бы возможным в отсутствие специфического переносчика. Значение K_t по D-глюкозе для GLUT1, который проявляет высокую специфичность именно к этому моносахариду, составляет 1,5 мМ. Для сравнения: структурно родственные моносахариды – D-манноза и D-галактозы имеют значения K_t , равные 20 и 30 мМ соответственно, а величина K_t для L-глюкозы равна 3000 мМ. Таким образом, GLUT1 удовлетворяет трем важнейшим критериям, характеризующим пассивный транспорт: высокая скорость диффузии по градиенту концентрации, насыщаемость и специфичность.

У человека, как отмечалось ранее, кроме GLUT1 обнаружено еще 11 переносчиков глюкозы, кодируемых разными генами. Каждый из них обладает уникальными кинетическими свойствами, тканевым распределением и функцией (табл. 6.1.1). Переносчик GLUT3, так же как GLUT1, присутствует в плазматических мембранах практически всех клеток млекопитающих и человека и ответствен за базовое поглощение глюкозы клетками. Значение K_t переносчиков GLUT3 и GLUT1 для глюкозы составляет величину, приблизительно равную 1–1,5 мМ, что значительно меньше, чем уровень сахара в сыворотке крови, который обычно варьирует в пределах 4,5–5 мМ, но может достигать концентрации 8 мМ. Следовательно, переносчики GLUT1 и GLUT3 ответственны за непрерывное поступление глюкозы в клетки, по существу, с постоянной скоростью.

Переносчик GLUT2, присутствующий в печени и β -клетках поджелудочной железы, отличается тем, что имеет высокое значение K_t для глюкозы, равное 15–20 мМ (по другим данным 66 мМ). Это означает, что с помощью переносчика GLUT2 глюкоза может поступать в клетки данных тканей с более или менее значительной скоростью (с физиологической точки зрения) только в тех случаях, когда уровень этого субстрата в крови достаточно высок. Благодаря таким специфическим свойствам переносчика GLUT2, поджелудочная железа получает возможность «реагировать» на уровень глюкозы в крови и соответствующим образом «настраивать» скорость секреции инсулина. В свою очередь продукция ин-

сулина сигнализирует о необходимости снижения концентрации глюкозы в крови путем интенсификации процесса гликогенеза или увеличения скорости синтеза жиров. Вдобавок высокое значение K_t GLUT2 обеспечивает быстрое поступление глюкозы в клетки печени только в момент ее высокой концентрации в крови. Кроме того, в печени переносчик GLUT2 ответствен за «выход» глюкозы из гепатоцитов. Такая ситуация реализуется при снижении уровня сахара в крови, и его восполнение осуществляется в результате гликогенолиза. Следовательно, благодаря высокому значению K_t для GLUT2 этот переносчик может реагировать на повышенный внутриклеточный уровень глюкозы (обусловленный распадом гликогена в печени) увеличением эффективности выброса моносахарида в кровяное русло.

Переносчик GLUT4, который отличается тем, что он стимулируется инсулином и имеет значение K_t , равное 5 мМ, транспортирует глюкозу в мышечные и жировые клетки. Выброс инсулина, который сигнализирует о состоянии насыщения глюкозой, вызывает быстрое увеличение числа молекул переносчика GLUT4 в плазматических мембранах миоцитов и адипоцитов, что свою очередь приводит к повышению скорости поступления глюкозы в мышцы и адипозную ткань. Количество этого переносчика в мембранах мышечных клеток также увеличивается в ответ на возрастающую физическую нагрузку.

Переносчик GLUT5, присутствующий в клетках тонкого кишечника, функционирует главным образом как транспортер фруктозы.

Описанное семейство белков – переносчиков глюкозы очень ярко демонстрирует, каким образом различные изоформы одного-единственного белка могут существенно видоизменять характер метаболизма клеток и способствовать их разнообразию и функциональной специализации.

Белки – переносчики глюкозы являются представителями целого суперсемейства или надсемейства транспортеров, называемых *основными носителями функций* (MF). Представители этого семейства транспортеров обеспечивают доставку глюкозы в клетки таких разных в эволюционном смысле организмов, как *Escherichia coli*, *Trypanosoma brucei* (паразитическое простейшее, являющееся возбудителем сонной болезни), млекопитающие, включая человека. Такое изысканное разрешение проблемы доставки метаболического топлива появилось в ходе эволюции рано и оказалось пригодным для нужд не только различных организмов, но и различных тканей многоклеточных живых существ.

Таблица 6.1.1. Характеристика переносчиков глюкозы, кодируемых идентифицированными генами генома человека

Переносчик	Ткани, в которых происходит экспрессия генов	Кодирующий ген	Функция
GLUT1	Универсальный	<i>SLC2A1</i>	Общее поглощение глюкозы
GLUT2	Печень, островки Лангерганса, кишечник	<i>SLC2A2</i>	В печени – поглощение избытка глюкозы в крови; в поджелудочной железе – регуляция выброса инсулина
GLUT3	Мозг (нервная ткань)	<i>SLC2A3</i>	Общее поглощение глюкозы
GLUT4	Мышцы, жировая ткань, сердце	<i>SLC2A4</i>	Активность регулируется инсулином
GLUT5	Кишечник, яички, почки, сперматозоиды	<i>SLC2A5</i>	Главным образом транспорт фруктозы
GLUT6	Селезенка, мозг лейкоциты	<i>SLC2A6</i>	Возможно, не имеет транспортной функции или она не установлена
GLUT7	Микросомы печени	<i>SLC2A7</i>	–
GLUT8	Яички, бластоциста, мозг	<i>SLC2A8</i>	–
GLUT9	Печень, почки	<i>SLC2A9</i>	–
GLUT10	Печень, поджелудочная железа	<i>SLC2A10</i>	–
GLUT11	Сердце, скелетная мускулатура	<i>SLC2A11</i>	–
GLUT12	Адипозная ткань, скелетная мускулатура, тонкий кишечник	<i>SLC2A12</i>	–

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лекция 1. Переваривание и всасывание основных типов питательных веществ	5
Органы желудочно-кишечного тракта имеют множественные функции в переваривании	6
Поджелудочная железа поставляет ферменты для переваривания в тонком кишечнике	7
Пищеварительные ферменты секретируются в виде зимогенов.....	10
Регуляция секреции осуществляется под действием секретогенных соединений	12
Транспорт растворенных веществ может происходить между эпителиальными клетками и через клетки эпителия тонкого кишечника	15
Всасывание и секреция электролитов	18
Секреция соляной кислоты обкладочными клетками желудка	22
Лекция 2. Обмен белков. Общие положения	23
Баланс азота и азотистое равновесие	24
Нормы белка в питании	26
Биологическая ценность белков	28
Обмен простых белков	32
Переваривание белков в желудке	34
Действие пепсина.....	35
Лекция 3. Переваривание белков в тонком кишечнике. Активация панкреатических зимогенов	38
Участие пептидаз тонкого кишечника в расщеплении коротких пептидов	40
Сериновые протеиназы. Механизм действия химотрипсина и карбоксипептидазы	41
Механизм каталитического действия химотрипсина	47
Механизм активации химотрипсиногена.....	50
Общие свойства семейства сериновых протеиназ	50
Нарушения процессов переваривания белков	51
Механизм действия карбоксипептидазы А.....	52
Всасывание свободных аминокислот.....	56
Всасывание интактных белков	57
Ацидурия нейтральных аминокислот (болезнь Хартнупа)	58
Лекция 4. Обмен аминокислот в норме и при патологии	59
Общие реакции аминокислот.....	60
Трансаминирование аминокислот связано с переносом аминогруппы на акцептор	60
Окислительное дезаминирование аминокислот.	
Глутаматдегидрогеназа	63

Оксидазы аминокислот	64
Реакции аммиака	66
Цикл мочевины.....	68
Образование карбамоилфосфата – необходимая предпосылка функционирования цикла мочевины	69
Регуляция цикла мочевины	72
Альтернативные реакции выведения избытка азота	74
Наследственные дефекты ферментов цикла мочевины	75
N-ацетилглутаматсинтетаза	76
Карбамоилфосфатсинтетаза.....	76
Орнитинтранскарбамоилаза.....	76
Аргининосукцинатсинтетаза	77
Аргининосукцинаталиаза	77
Аргиназа.....	77
Лекция № 5. Обмен индивидуальных аминокислот в норме и при патологии	78
Превращения трехуглеродных (C ₃) аминокислот аланина, серина, цистеина	80
Обмен S-содержащих аминокислот.....	85
Расщепление ароматических аминокислот.....	90
Превращения семейства C ₅ -аминокислот	94
Лекция 6. Переваривание и всасывание углеводов	97
Значение клетчатки в питании человека	99
Непрямые эффекты рафинированных углеводов	103
Переваривание и всасывание углеводов	104
Всасывание моносахаридов	110
Список литературы	114
Основная литература.....	114
Дополнительная литература	114
Приложение 1 к лекции 5.....	118
Гидроксилирование и другие модификации белков соединительных тканей	118
Генетические дефекты структуры коллагена	121
Приложение 2 к лекции 5.....	123
Полиамины и их физиологические функции	123
Биосинтез полиаминов.....	124
Катаболизм полиаминов	126
Приложение 1 к лекции 6.....	127
Существование семейства переносчиков глюкозы обеспечивает транспорт данного углевода в клетках животных и человека.....	127

Учебное издание

Бокуть Сергей Борисович

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ПАТОБИОХИМИИ
ОБМЕН БЕЛКОВ И УГЛЕВОДОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ
Часть 1

Редакторы *М. И. Авхимович, О. А. Кучинский*

Корректор *С. О. Сараева*

Компьютерная верстка *М. Л. Юркова*

Подписано в печать 8.04.08. Формат 60×90 1/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Times. Печать ризографическая.

Усл. печ. л. 8,5. Уч.-изд. л. 6,6. Тираж 30 экз. Заказ № 53.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования «Международный государственный
экологический университет имени А. Д. Сахарова»

ЛИ № 02330/0131580 от 28.07.2005 г.

ул. Долгобродская, 23, 220070, г. Минск, Республика Беларусь

E-mail: info@iseu.by

URL: <http://www.iseu.by>