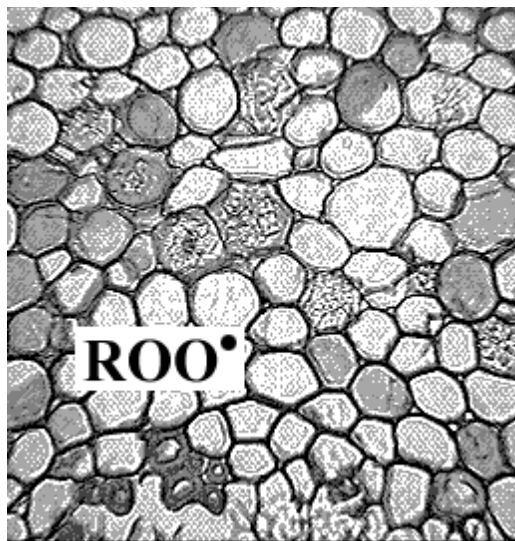


Г.А. Суханова
В.Ю. Серебров

БИОХИМИЯ КЛЕТКИ



Суханова Г.А., Серебров В.Ю.

Биохимия клетки): учебно-методическое пособие.–Томск: 1999.–151 с.:17 ил.

Рассматриваются особенности биохимических процессов мембранных структур клетки. Обсуждаются механизмы активации перекисного окисления липидов, лимитированного протеолиза, индукции микросомальных оксигеназ, образования АТФ в митохондриях. Представлены основные маркерные ферменты внутриклеточных органелл. Рассмотрены перекисный, гипоксический, токсический, апластический типы повреждения клеток, некроз и апоптоз. Даны представления о причинах митохондриальных и лизосомальных болезней.

Для студентов, аспирантов, научных сотрудников биологических и медицинских специальностей.

Рекомендовано к изданию:

Методической комиссией медико-биологического факультета Сибирского медицинского университета

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЩИЙ АДАПТАЦИОННЫЙ СИНДРОМ.....	7
ПОНЯТИЕ СТРЕССА	8
ЗАВИСИМОСТЬ АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ ОТ СИЛЫ РАЗДРАЖИТЕЛЯ.....	11
СРОЧНАЯ И ДОЛГОВРЕМЕННАЯ АДАПТАЦИЯ.....	12
ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ НАПРЯЖЕНИЕ	14
ГЛАВА 2. КЛЕТКА.....	15
ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТКИ.....	15
ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ	16
ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК	19
ТИПЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК	19
ПРОЦЕСС ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ ПРИ НЕКРОЗЕ	20
ФАЗА НАЧАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ	21
ФАЗА ОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ	22
ФАЗА НЕОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ.....	23
ФАЗА ПОЯВЛЕНИЯ ЗОН НЕКРОЗА	23
АПОПТОЗ	26
МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ПРИ АПОПТОЗЕ	28
ГЛАВА 3. ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА	33
ФУНКЦИИ МЕМБРАН В КЛЕТКЕ	34
СТРОЕНИЕ МЕМБРАН.....	34
ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЕМБРАН	38
ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ	55
НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДИФФУЗИЯ	55
ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФФУЗИЯ	56
БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН ПРИ МИОТОНИЧЕСКОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ	61
АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ	62
МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ИХ РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ	70
ГЛАВА 4. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ	78
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ...	82
ПРОДУКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ	84
ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКЕ.....	86
ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ОРГАНЕЛЛАХ КЛЕТКИ... 89	
РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКЕ	92
БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ	98
РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ	100
ПЕРЕКИСНЫЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ.....	104

ГЛАВА 5. ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ И МИКРОСОМАЛЬНОЕ	
ОКИСЛЕНИЕ	106
МЕХАНИЗМ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ	109
МЕТАБОЛИЗМ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	111
ОКИСЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ.....	112
РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ.....	113
НАДН-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ	113
РЕАКЦИИ КОНЬЮГАЦИИ.....	114
ИНДУКТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ МИКРОСОМАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ	114
ТОКСИФИКАЦИЯ И ДЕТОКСИКАЦИЯ	116
ТОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ	117
МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ИММУННАЯ СИСТЕМА	119
ГЛАВА 6. МИТОХОНДРИИ	121
ФУНКЦИИ И СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ	121
ЛОКАЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ	122
ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ	124
ТРАНСЛОКАЗЫ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ.....	125
МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ	126
ГИПОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ.....	127
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ.....	128
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА	130
ГЛАВА 7. ЛИЗОСОМЫ	138
ТИПЫ ЛИЗОСОМ.....	139
ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ	141
РЕАКЦИИ ЛИЗОСОМ ПРИ АДАПТАЦИИ	144
ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ.....	145
РОЛЬ ЛИЗОСОМ В ПАТОЛОГИИ.....	147
АПЛАСТИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК	148
ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ.....	148
ЛИТЕРАТУРА.....	152
СОКРАЩЕНИЯ.....	153

ВВЕДЕНИЕ

Клетка является основной единицей живого. В процессе жизнедеятельности клетки нашего организма растут, размножаются и гибнут. Клетку называют "биохимической машиной". Биохимия позволяет узнать из каких молекул состоят клетки, почему клетки способны поглощать кислород, сбраживать сахара, синтезировать белки и нуклеиновые кислоты. Однако нас будет интересовать не только вопросы как клетка живет, но и как она болеет. Ведь мы хотим научиться лечить клетку.

Одна из важных задач биохимии заключается в изучении внутриклеточных процессов. Однако живые клетки чрезвычайно разнообразны, что намного осложняет эту задачу. Поэтому в биохимии пользуются моделью клетки. Понятие «минимальная клетка» включает набор структур, обязательных для обмена веществ, энергии и самовоспроизведения. К таким структурам относятся:

- мембрана (плазматическая и цитоплазматические),
- митохондрии – источник энергии,
- ядро – носитель генетической информации,
- лизосомы – катаболические станции,
- эндоплазматический ретикулум – процессы детоксикации.

В настоящее время мы только приближаемся к пониманию того, каким образом обычные метаболические процессы приводят сначала к извращению физиологических реакций, появлению морфологических изменений и, наконец, клиническим проявлениям того или иного заболевания. Нарушение биохимических процессов в клетке происходит под действием повреждений: травм, попадания вирусов и бактерий, действия ионизирующих и ультрафиолетового излучений. Общие и специальные биохимические знания нужны нам для того, чтобы представлять себе развитие патологических процессов, заболеваний. Тайна клетки в том и заключается, что мы не можем войти в неё, и на месте увидеть все, что там происходит.

Биохимическое обследование человека весьма ограничено, в основном оно возможно при изучении крови, мочи, слюны и спинномозговой жидкости. Взятие же биопсийных проб (кусочков органов и тканей) возможно лишь в экстренных случаях, когда это необходимо сделать в интересах больного, по жизненным показаниям.

Для чего необходимо изучать молекулярные процессы, лежащие в основе патогенеза болезней? Познание механизмов развития патологии помогает определить стратегию лечения. Это особенно важно когда причиной заболевания является молекулярная и клеточная патология, т.е. нарушение структуры отдельных молекул, клеточных органелл, клеток.

Цель настоящей книги заключается в обобщении данных по биохимии отдельных клеточных органелл, выяснению их роли в нормальных и патологически измененных условиях при повреждениях клеток, заболеваниях. Рассмотрим биохимические механизмы адаптации при стрессовых воздействиях на организм. Познакомимся с неспецифическими проявлениями многих заболеваний, а также наследственно обусловленными митохондриальными и лизосомальными болезнями.

Одним из процессов, активно развивающихся при патологии мембранных структур является перекисное окисление липидов. Активация гидролитических ферментов характерна для повреждения лизосом. Воздействие химических соединений, вызывает индукцию микросомальных оксигеназ, способствует удалению ксенобиотиков из организма или приводит к токсическому повреждению печени. Типы повреждения, связанные с характерными нарушениями биохимических процессов клетки, составляют основу специфических, клинических проявлений заболеваний человека. Изучение биохимических процессов при многих заболеваниях является необходимым этапом для создания общих представлений о развитии патологии.

Глава 1. ОБЩИЙ АДАПТАЦИОННЫЙ СИНДРОМ

Процессы адаптации изучаются в современной биологии достаточно интенсивно. Основой адаптивных реакций на эмоциональные и физические нагрузки, которым все больше подвергается человек в XX веке, является стресс. Представление о стрессе касается всех людей, больных и здоровых, преуспевающих и неудачливых, и всех сторон нашей жизни. Недаром этот термин вошел в наш повседневный язык, а само учение о стрессе послужило мощным стимулом развития биологии и медицины.

Концепция стресса была развита в работах канадского ученого Г. Селье, Идея Г. Селье, что любая деятельность организма связана со стрессом, что без стресса нет жизни и нормального развития, и поэтому его нельзя и не следует избегать, нашла конкретное воплощение в работах наших отечественных ученых.

Профессор Ганс Селье уроженец Вены, высшее образование получил в университетах Праги, Парижа и Рима. В 1929 году, в возрасте 22 лет, стал доктором медицины, в 1931 году – доктором философии. С 1931 г. по стипендии Рокфеллеровского фонда работал в Университете Джона Гопкинса, а затем в Университете Мак Гилла, где получил звание профессора. В 1945 г. возглавил Институт экспериментальной медицины и хирургии в Монреале, где работал вплоть до своей смерти в 1982 году.

Он получил всемирное признание как биолог и теоретик медицины. Занимался изучением воздействия стресса на организм, обращал особое внимание, на то, что некоторая доля стресса необходима для поддержания хорошего самочувствия и что некоторые виды стресса, которые он называет "эустресс" идут нам на пользу. Поглощенность работой – вот самое лучшее средство борьбы со стрессом. "Что касается меня, то я с трудом могу представить себе большую пытку, чем быть вынужденным валяться на пляже и изо дня в день ничего не делать" – говорил Г. Селье.

С проблемой стереотипной реакции Г. Селье столкнулся в 1926 г., будучи студентом-медиком второго курса. Он пишет: "Меня заинтересовало, почему больные, страдающие от самых разных недугов, обнаруживают так много одинаковых признаков и симптомов. Независимо от того, перенес ли человек тяжелую кровопотерю, болен ли инфекционной болезнью или раком, он одинаково теряет аппетит, мышцы его слабеют, больной обычно худеет, и само выражение лица свидетельствует о том, что он болен". В дальнейшем эти первоначальные

наблюдения "синдрома болезни вообще" получили название общего адаптационного синдрома и послужили основой для развития всей концепции стресса.

Селье удалось показать, что стресс сопровождает любую жизнедеятельность и соответствует в определенном смысле интенсивности жизни. Он увеличивается при нервном напряжении, телесных повреждениях, инфекциях, мышечной работе или другой напряженной деятельности и связан с неспецифическим защитным механизмом, увеличивающим сопротивляемость к стрессовым факторам, или "стрессорам".

Важной частью этого защитного механизма является повышенное выделение гипофизом кортикотропина, который в свою очередь стимулирует выработку кортикоидов в коре надпочечников. Среди них наиболее важными являются глюкокортикоиды, которые влияют на метаболизм глюкозы и на обмен веществ в целом, а также минералокортикоиды, такие как альдостерон или дезоксикортикостерон, регулирующие минеральный обмен.

Различные расстройства секреции этих гормонов, по мнению Селье, могут приводить к заболеваниям, названных им "болезнями адаптации", поскольку они вызываются не непосредственно каким-либо патогенным фактором (возбудителем болезни), а ошибочной адаптационной реакцией на стресс.

ПОНЯТИЕ СТРЕССА

Весь синдром стресса, или иначе "общий адаптационный синдром", протекает стадийно, характеризуется определенным комплексом изменений в нейроэндокринной системе и оказывает влияние на уровень неспецифической резистентности организма, его воспалительный потенциал и обмен веществ.

Стресс-реакция развивается в ответ на действие разных по качеству, но сильных раздражителей и состоит из следующих стадий:

1. "**РЕАКЦИЯ ТРЕВОГИ**", во время которой мобилизуются защитные силы организма. Эта стадия длится 24 – 48 часов, для неё характерно уменьшение тимуса, лейкоцитоз, определенное соотношение форменных элементов крови: лимфопения, анэозинофилия, нейтрофилез, развитие кровоизлияний и язв в слизистой желудочно-кишечного тракта. В эндокринной системе происходит стимуляция секреции кортикотропина в гипофизе, приводящая к повышению секреции глюкокортикоидов коры надпочечников. Секреция минералокортикоидов угнетена. Угнетены также деятельность щитовидной и половых желез.

2. *"СТАДИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЛИ УСТОЙЧИВОСТИ"*. Селье показал, что в этой стадии устойчивость организма к вредным воздействиям повышена. Происходит нормализация деятельности желез внутренней секреции и тимико-лимфатической системы, а иногда даже повышение функциональной активности желез, угнетенных в первую стадию реакции.

3. *"СТАДИЯ ИСТОЩЕНИЯ"*, которая наступает, если стрессор оказывается достаточно силен и действует достаточно долгое время. Сильное или длительное напряжение приводит к повторному угнетению защитных сил организма. Характер деятельности эндокринных желез очень близок к тому, что наблюдается при реакции тревоги: глюкокортикоиды преобладают над минералокортикоидами, снижена активность щитовидной и половых желез, угнетена тимико-лимфатическая, иммунная, система соединительной ткани.

Переход между тремя типичными стадиями синдрома не резкий: наблюдается некая размытость границ.

Проявления стадии устойчивости непохожи на проявления реакции тревоги, а в некоторых случаях и полностью противоположны им. Так, например, на стадии тревоги клетки коры надпочечников выбрасывают содержимое секреторных гранул в кровяное русло и полностью лишаются запасных материалов; на стадии же резистентности, кора, напротив, становится чрезвычайно богатой секреторными гранулами. Если в период реакции тревоги наблюдается сгущение крови, снижение содержания ионов хлора в крови (гипохлоремия) и общее истощение тканей, то на стадии резистентности кровь разжижается, концентрация хлора в ней увеличивается, а вес тела возвращается к норме.

При ещё более длительном воздействии стрессора такая приобретенная адаптация снова утрачивается. Наступает третья фаза – "стадия истощения", которая, если стрессор достаточно силен и действие его достаточно длительно, неизбежно приводит к смерти.

Все многочисленные исследования действия различных экстремальных факторов на метаболизм говорят о том, что эти воздействия вызывают большие энергетические траты и преобладание процессов катаболизма над процессами анаболизма. Поскольку стадия резистентности может наступать только после реакции тревоги, которая протекает с большими энергетическими тратами, элементами повреждения и угнетения защитных систем организма, то повышение резистентности при стрессе достигается по словам самого Г. Селье "дорогой ценой".

При изучении механизма адаптационной реакции на стресс Г. Селье главным образом изучал изменения в эндокринной системе. Эти изменения, как уже говорилось, выражались прежде всего в избыточной секреции кортикотропина гипофизом, что в свою очередь приводило к избыточной секреции глюкокортикоидных гормонов, являющихся антагонистами другой группы гормонов коры надпочечников – минералокортикоидов.

Идеи Селье на первый взгляд противоречат идеям нервизма И.П. Павлова. Павлов, как известно, стоял на позициях нервизма, то есть теоретического подхода, согласно которому решающую роль в работе организма играет нервная система, и в особенности высший нервный центр – большие полушария головного мозга. Исследования же Селье принесли ему успех благодаря открытиям, связанным с гуморальной системой, влиянием гормонов на жизнедеятельность, различным биохимическим процессам в крови и тканях.

То, что Павлов трактовал с точки зрения нервной системы, Селье перевел на язык и термины гуморальной системы. Величие И.П. Павлова заключается в восприятии организма как целого, в объяснении того, как это целое непрерывно адаптируется к окружающей сфере. Эта идея целостности и адаптации стала рычагом экспериментальной работы Селье и самой теории стресса. Ведь стресс неразрывно связан с тем, что Г. Селье назвал общим адаптационным синдромом, т.е. совокупностью реакций организма, и прежде всего эндокринной системы, с целью мобилизации его защитных сил и приспособления к трудным ситуациям.

Г. Селье в предисловии ко второму изданию на русском языке книги "Стресс без дистресса" ставил изучение стресса в один ряд с учениями о метаболизме, наследственности и биологическом развитии. А. Эйнштейн оказался в числе тех, кто сразу же осознал важность этих исследований. Он обратился к Селье с письмом, в котором поддерживал идею создания «единой теории медицины», которая предполагает открытие общих закономерностей живого. К таким закономерностям относится открытие адаптирующих систем, которые при изменении условий окружающей среды поддерживает внутреннюю среду организма на уровне нормы или переводит на новый уровень. Адаптационные механизмы, приобретенные с рождения, позволяют человеческому организму в среднем успешно сохранять стабильность на протяжении жизни. Однако с развитием общества появляются новые стрессорные факторы, и, как считает Селье, постоянно происходит истощение

резервов адаптации, следствием чего является увеличение сердечно-сосудистых и раковых заболеваний.

Идеи, связанные с концепцией Г. Селье об общем адаптационном синдроме, получили серьезное и многостороннее развитие в работах советских ученых.

ЗАВИСИМОСТЬ АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ ОТ СИЛЫ РАЗДРАЖИТЕЛЯ

Г. Селье в большинстве своих работ говорит о том, что стресс – это реакция на сильный раздражитель. Ростовские ученые Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, М.А. Уколова (1977) показали, что в зависимости от силы (дозы) воздействия, в организме могут развиваться минимум три адаптационные реакции:

1. Реакция тренировки – на слабые воздействия;
2. Реакция активации – на раздражители средней силы;
3. Реакция на сильные чрезвычайные воздействия – стресс.

РЕАКЦИЯ ТРЕНИРОВКИ. Систематическое повторение слабых, но постепенно нарастающих раздражителей с течением времени приводит к повышению активности защитных систем, в связи с чем и организм становится устойчивым к повреждающим воздействиям.

Повышение резистентности организма в результате реакции тренировки связано с тем, что происходит увеличение секреции глюкокортикоидов, хотя и меньшее, чем при стресс-реакции. Реакция тренировки, в связи с этим, обладает мягким противовоспалительным действием, не таким сильным как при стрессе, но без повреждения защитных сил организма. Повреждение защитных сил, иммунодепрессия, является нежелательным последствием применения глюкокортикоидов с противовоспалительной целью в дозах, вызывающих стресс.

РЕАКЦИЯ АКТИВАЦИИ. Известно, что от сильного и от слабого раздражителя организм ускользает, защищая себя торможением. Как же обстоит дело с реакцией организма на раздражители, промежуточные между сильными и слабыми, так называемыми – средней силы?

Исследования показали, что в ответ на действие различных по качеству раздражителей "средней силы" также развивается общая неспецифическая адаптационная реакция – реакция активации, которая характеризуется подъемом активности защитных систем.

Показано, что в реакции активации происходит увеличение массы тимуса в 2–2,5 раза, увеличивается секреция минералокортикоидов, продукция глюкокортикоидных гормонов находится на верхней границе нормы. Реакция активации, по мнению Гаркави, Квакиной, Уколовой, должна найти широкое применение в лечении самых различных заболеваний. Кроме того, реакция активации может быть использована для быстрого повышения устойчивости организма к повреждающим факторам и нагрузкам самой различной природы, например, в спортивной и космической медицине. При чрезмерном усилении, увеличении его длительности во времени, стресс превращается в общее звено патогенеза неинфекционных заболеваний, к которым относятся язва желудка, гипертоническая болезнь, развитие опухолей, нервно-психические заболевания. Повышение резистентности здорового организма и профилактика основных неинфекционных заболеваний в связи с этим является одной из ключевых проблем современной медицины. Большинство людей и животных, поставленных в безвыходные стрессорные ситуации, не погибают, а приобретают ту или иную степень резистентности. Это означает, что организм способен адаптироваться к ним. Адаптация представляет собой процесс, в результате которого организм становится устойчивым к воздействиям окружающей среды и, таким образом, получает возможность жить в условиях, ранее не совместимых с жизнью и решать задачи, прежде не разрешимые. Ф.З. Меерсон в рамках концепции о механизме индивидуальной адаптации организма к внешней среде (1981) определяет стресс-реакцию как звено этого механизма.

В развитии большинства адаптационных реакций можно выделить два этапа: начальный этап – "срочная", но несовершенная адаптация и последующий этап – совершенная долговременная адаптация.

СРОЧНАЯ И ДОЛГОВРЕМЕННАЯ АДАПТАЦИЯ

Начальный этап адаптационной реакции возникает непосредственно после начала действия раздражителя и, следовательно, может реализоваться лишь на основе готовых, ранее сформировавшихся физиологических механизмов. Очевидными проявлениями срочной адаптации являются бегство животного в ответ на причиняемую боль, увеличение теплопродукции в ответ на холод, увеличение теплоотдачи в ответ на тепло, рост легочной вентиляции и увеличение минутного объема сердца в ответ на недостаток кислорода и т.д.

Важнейшая черта этого этапа адаптации состоит в том, что деятельность организма протекает на пределе его физиологических возможностей, при почти полной мобилизации функционального резерва и далеко не в полной мере обеспечивает необходимый адаптационный эффект.

"Долговременный" этап адаптации возникает постепенно, в результате длительного или многократного действия на организм факторов окружающей среды. Он развивается на основе многократной реализации "срочной" адаптации и характеризуется тем, что в итоге постепенного количественного накопления каких-то изменений организм приобретает новое качество – из неадаптированного превращается в адаптированный. Такова адаптация, обеспечивающая осуществление организмом ранее недостижимой по своей интенсивности физической работы, развитие устойчивости организма к значительной высотной гипоксии, которая ранее была несовместима с жизнью, приобретение устойчивости к холоду, теплу, к большим дозам ядов.

Итак, реакция организма на любое новое и достаточно сильное воздействие среды – на любое нарушение гомеостаза – обеспечивается: 1) системой, специфически реагирующей на данный раздражитель, 2) стресс-реализующими адренэргической и гипофизарно-адреналовой системами, неспецифически реагирующими на самые различные изменения в среде обитания.

У неадаптированного человека после подъема на высоту 5 тыс. м. резко выражены гипервентиляция легких и гиперфункция сердца, что представляет собой "срочную" адаптацию. Эти реакции все же оказываются недостаточными для устранения гипоксемии и сочетаются с адинамией, явлениями апатии, эйфории, а в итоге со снижением физической и интеллектуальной работоспособности. Для того, чтобы эта "срочная", но несовершенная адаптация сменилась совершенной "долговременной", необходимо длительное или многократное пребывание на высоте, т.е. длительная или многократная мобилизация системы, ответственной за адаптацию.

Включение систем, ответственных за адаптацию, связано с активацией синтеза нуклеиновых кислот и белка, формированием структурных изменений, увеличивающих мощность системы.

Наряду со стресс-реализующими системами: адренэргической и гипофиз-адреналовой, в организме имеются стресс-лимитирующие системы. К таким, ограничивающим стресс относятся системы:

опиоидэргическая	простагландины
серотонинэргическая	адениннуклеотиды
ГАМК-эргическая	антиоксиданты

Они ограничивают стресс-реакцию и обеспечивают защитные эффекты адаптации к стрессорным воздействиям.

ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ НАПРЯЖЕНИЕ

Наиболее адекватную для человека форму стресса представляет психоэмоциональное напряжение. Каждый из нас понимает, что разнообразные производственные и бытовые ситуации, профессиональные перегрузки, такие как дефицит времени, значительная стимуляция определенного вида деятельности, отсутствие рационального отдыха, увлечений, у всех людей независимо от типа нервной системы приводят к хроническому эмоциональному напряжению, стрессу. Феномен психоэмоционального напряжения включает пять основных групповых признаков:

- 1) клинические – личностная и реактивная тревожность, снижение эмоциональной стабильности;
- 2) психологические – снижение степени самооценки, уровня социальной адаптированности;
- 3) физиологические – преобладание тонуса симпатической нервной системы над парасимпатической, изменение гемодинамики;
- 4) эндокринные – повышение активности симпатико-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы;
- 5) метаболические – повышение в крови транспортных форм липидов, сдвиг липопротеидного спектра в сторону атерогенных фракций: ЛПНП и ЛПОНП.

Этот синдром развивается на грани нормы и патологии и представляет пограничное состояние. Понятие о психоэмоциональном стрессе, приведенное Л.Е. Паниным (1983), сближается с состоянием тревоги при "общем адаптационном синдроме" Селье, однако ведущая роль в развитии психоэмоционального напряжения отводится центральной нервной системе.

Глава 2. КЛЕТКА

Основная единица живого – клетка – представляет собой некую физическую сущность. Такие свойства живого, как способность размножаться, видоизменяться и реагировать на раздражение, в более мелких единицах материи не проявляются. Мы можем путем центрифугирования выделить клеточные органеллы. При этом оказывается, что фрагменты клетки способны в течение некоторого времени выполнять многие из её функций: поглощать кислород, сбраживать сахара и даже синтезировать белки и нуклеиновые кислоты. Однако сами по себе эти функции не составляют жизни. Разрушенная клетка уже не способна существовать неопределенно долго. Поэтому мы делаем вывод, что клетка – это самая элементарная единица, способная поддерживать жизнь.

Чтобы узнать каким образом построена клетка и как она работает, необходимо прибегнуть к языку биохимии. Клетку называют биохимической "машиной", В этом плане биохимия позволяет изучать механизмы функционирования клетки на уровне молекул, входящих в её состав: белков, жиров, углеводов.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТКИ

Мы не можем наблюдать клетки визуально. Для того, чтобы войти в мир клетки мы должны уподобить себя до размеров бактерий и вирусов, т.е. уменьшиться примерно в миллион раз во всех трех измерениях. Если мы останемся такими как есть, тогда мы должны увеличить клетку в миллион раз и клетка вырастет до размеров аудитории. Теперь мы можем остановиться на любой части клетки, привлечшей наше внимание, и различить отдельную её деталь, вплоть до молекулы.

В течение длительного времени клетки изучали в основном путем наблюдения за ними. Но по мере развития экспериментального метода в естественных науках к нему начали прибегать и при исследовании живых организмов. Это в значительной степени облегчалось мощным взрывом биомедицинских исследований, проводимых во второй половине прошлого столетия. Физиология, фармакология, генетика, бактериология, иммунология – все эти науки помогли и помогают проникнуть в мир живой клетки и лучше узнать его.

Наиболее значительные события произошли в 1945 году. Именно тогда, в конце второй мировой войны, благодаря удивительному стечению обстоятельств почти в одно и то же время наука обогатилась целым рядом новых мощных инструментов и методов исследования.

Созданный ещё в 30-е годы, электронный микроскоп обладал достаточной разрешающей способностью, позволяющей проникнуть в дотоле неизвестное пространство клетки. В свою очередь биохимия также обогатилась целым рядом принципиально новых приборов и методов. К таким методам прежде всего относится хроматография, открытая в 1904 г. Михаилом Семеновичем Цветом, русским физиологом и биохимиком растений. М.С. Цвет умер относительно молодым, и потенциальные возможности его замечательного метода долгое время, вплоть до 40-х годов, оставались неиспользованными. Близким к хроматографии является электрофорез в геле. Благодаря этим методам на следовых количествах смеси веществ можно без особых усилий провести анализ материала.

Вторым методом, радикально изменившим химическое исследование живых клеток, был радиоизотопный метод. Преимущество исследований с помощью изотопов заключается в том, что они используются для специфического мечения определенных молекул, так что эти молекулы можно узнать и отличить от родственных им молекул почти без нарушения общей структуры. Хотя и морфология и биохимия, обогащенные новыми методиками, постоянно совершенствовались, все же для ликвидации существующего между ними разрыва по-прежнему испытывалась необходимость в создании мостика. Этот разрыв становился все меньше по мере развития методов разделения клетки на фракции таким образом, что каждую из них можно было полностью изучить. Методы дифференциального центрифугирования, используемые сейчас в любой биохимической лаборатории, также стали использоваться в середине 40-х годов.

Самым значительным среди всех событий было открытие структуры двойной спирали ДНК Ф. Криком и Д. Уотсоном с помощью методов рентгеноструктурного анализа.

ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Наряду с изучением строения клетки в науке постоянно рассматривались проблемы роста, размножения и гибели клеток.

В силу ряда необратимых; процессов, например, протеолиза, клетка подвергается физиологической гибели. Гибель системы может быть обусловлена и воздействием факторов, которые своими количественными или качественными воздействиями приводят вначале к обратимым, а затем необратимым сдвигам в клетке. Результатом воздействия будет или гибель системы, или восстановление её стационарного состояния, как правило на более низком уровне, чем ранее.

Факторы, вызывающие обратимые изменения можно охарактеризовать как "физиологические", а факторы дающие необратимые сдвиги, приводящие к возникновению заболеваний, являются "патологическими". Совокупность этих факторов приводит к более или менее известным изменениям в течении биологических процессов.

Впервые клеточную теорию в патологии развил Вирхов, о чем свидетельствует название его книги "Клеточная патология", опубликованной в 1858 г. Все многообразие функций клетки является настолько сложным, что ни с помощью химических уравнений, ни с помощью математических формул невозможно описать, их полностью. Ещё более сложно обстоит дело с клеткой, функционирующей в условиях патологического процесса.

Изучение молекулярных основ патогенеза болезней требует знания механизмов взаимодействия отдельных, клеточных органелл и механизмов регуляции метаболизма клетки. Общие и специальные биохимические знания должны применяться для расшифровки явлений или процессов, характеризующих течение заболевания, т.е. патологических процессов.

Исследования патологических процессов в клетках, как правило, проводятся на животных, в экспериментальных условиях. Биохимическое обследование человека, как вы понимаете, весьма ограничено, в основном оно возможно при исследовании биологических жидкостей: крови, мочи, слюны и спинномозговой жидкости. Взятие же биопсийных проб возможно лишь в экстренных случаях, когда это необходимо сделать в интересах больного по жизненным показаниям. В связи с этим важным моментом изучения патохимии клетки является создание экспериментальных моделей, адекватно отражающих изменения, происходящие в организме человека.

Одной из таких моделей является экспериментальный гепатит, вызываемый при введении четыреххлористого углерода крысам. Этой моделью пользуются при

изучении биохимических изменений, характерных для гепатоцитов при токсическом гепатите.

Для чего необходимо изучать молекулярные механизмы патогенеза болезней? Познание механизмов развития патологии помогает определить стратегию лечения. Это особенно важно, когда причиной заболевания является молекулярная патология, которая развивается в результате нарушения структуры отдельных метаболитов. Примерами применения данных патохимии клетки является заместительная терапия: использование инсулина при недостаточной выработке его клетками поджелудочной железы при сахарном диабете и гормонов щитовидной железы при тиреоидном кретинизме.

Ещё одним примером является использование липосом в качестве переносчиков лекарств в клетку. Известно, что в клетках подвергнутых злокачественному перерождению, т.е. раковых клетках, значительно снижается уровень циклического АМФ (цАМФ), одного из посредников между химическими сигналами, поступающими в клетку (гормонами и другими биологически активными веществами) и непосредственными метаболическими реакциями клетки. Очевидно, что повысив уровень цАМФ, можно подавить рост раковых клеток. Но лечить с помощью цАМФ нельзя, так как цАМФ в клетку не проникает. Выход был найден на основании изучения структуры мембран клетки. Было выяснено, что липосомы, известные первоначально как модельные мембраны в биофизических исследованиях, способны служить эффективными носителями для введения в клетку биологически активных веществ. Мембраны липосом представляют собой липидный бислой, сходный с липидным бислоем природных мембран.

С помощью липосом можно вводить в клетку гидрофобные (холестерол) и гидрофильные (цАМФ) вещества, полностью сохраняя физико-химические свойства вводимых препаратов. Итак, было показано, что цАМФ, включенный в матрикс липосом, тормозит размножение опухолевых клеток.

Для того, чтобы выявить биохимические изменения клеток при патологии, рассмотрим функции плазматической мембраны клетки, митохондрий, пероксисом, лизосом и эндоплазматического ретикулула в норме и при патологии, типы повреждения клеток.

ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК

В зависимости от вида повреждающего агента соотношения специфических и неспецифических повреждений клетки может быть различным. Эти повреждения мы частично рассмотрели при изучении общего адаптационного синдрома. Имеется также классификация повреждений клетки в зависимости от участия в них клеточных органелл. Выделяют следующие типы повреждений: перекисный, гипоксический, токсический, апластический.

1. *ПЕРЕКИСНЫЙ* тип характеризуется стимуляцией образования гидроперекисей, изменением активности антиокислительных систем, повреждением мембран клетки.

2. *ГИПОКСИЧЕСКИЙ* тип характеризуется снижением энергопродукции, нарушением функции митохондрий, подавлением биосинтетических процессов.

3. *ТОКСИЧЕСКИЙ* тип связан с непосредственным влиянием продуктов на метаболизм. Для этого типа характерна активация микросомального окисления чужеродных веществ с помощью цитохромов P-450 и b₅.

4. *АПЛАСТИЧЕСКИЙ* тип связан с недостатком питания, активацией лизосомального аппарата и распадом эндогенных клеточных структур. Значительная роль в осуществлении апластического типа повреждения клетки принадлежит лизосомам. Иначе его ещё называют лизосомный тип.

ТИПЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Существует 2 типа гибели клеток — некроз и апоптоз. *НЕКРОЗ* обычно ассоциируется с действием экстремальных факторов, нарушением целостности мембраны, увеличением размеров клеток, набуханием органелл. Появление очагов некроза сопровождается воспалением. При некрозе происходит лизис внутриклеточных структур, разрыв их мембран. Некроз рассматривается как метаболическая катастрофа, вызванная тяжелыми структурными повреждениями. Примеры некроза: гибель клеток от гипоксии, токсинов, комплемент-зависимый цитолиз (табл. 1).

Характеристика некроза и апоптоза

Некроз	Апоптоз
Набухание, увеличение размеров клетки Лизис гранул, разрыв мембран Набухание ядра Неупорядоченная деградация ДНК Без затрат энергии	Сморщивание, уменьшение размеров клетки Конденсация цитоплазмы, уплотнение гранул Пикноз, фрагментация ядра Фрагментация ДНК, наличие “лестницы” при ЭФ Энергозависимость
Примеры	
Гибель клеток от гипоксии Действие токсинов Повреждение мембраны Комплементзависимый цитолиз	Селекция Т- и В-лимфоцитов Глюкокортикоид-индуцированная гибель тимоцитов Интерфазная гибель клеток Гибель клеток при отсутствии ростовых факторов

АПОПТОЗ — гораздо более распространенное явление, чем некроз. При апоптозе происходит сморщивание клеток, уменьшение их объема, уплотнение гранул. Основным признаком апоптоза является изменение состояния ДНК. В ДНК образуются одно- и двунитевые разрывы, формируются сначала крупные, затем мелкие фрагменты ДНК. В отличие от некроза, апоптоз зависит от нарушения энергетических процессов в клетке. Апоптоз является иммунологически инертным событием, гибнущие клетки подвергаются фагоцитозу макрофагами, но это не вызывает развития воспалительной реакции.

ПРОЦЕСС ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ ПРИ НЕКРОЗЕ

Среди многих причин, вызывающих гибель клеток по некротическому типу, на первом месте стоит *ИШЕМИЯ*. Первично она развивается на фоне сердечно-сосудистых заболеваний и травм, а в ряде других случаев, она является ведущим типом повреждения клеток.

Ишемию обычно определяют, как снижение притока крови к тканям, что сопровождается снижением концентрации кислорода и субстратов окисления. По степени выраженности ишемия может быть. полной или частичной. В эксперименте

полную ишемию моделировать не удастся в связи с системой коллатерального кровообращения, да и на практике она проявляется не так уж часто.

Процесс повреждения и гибели клеток в условиях ишемии был исследован на тканях трех типов: на миокарде, почках и в печени, для которых эта патология имеет существенное значение.

С биохимической точки зрения у клеток чаще всего исследуют:

фазу начальных изменений;

фазу обратимых изменений;

фазу необратимых изменений;

фазу появления некроза.

Рассмотрим эти стадии гибели клетки.

ФАЗА НАЧАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

В случае ишемии ситуация более или менее ясна: речь идет о прекращении поступления кислорода и субстратов и о замедлении выведения продуктов обмена веществ. Все это в начальной фазе не сопровождается структурными изменениями, и проявляется в виде нарушений обмена энергии, что и является основным типом функциональных нарушений клетки как в этой стадии, так и в последующей.

В физиологических условиях кислород, как известно, проникает внутрь митохондрий путем свободной диффузии, где и становится конечным акцептором электронов в системе транспорта электронов по дыхательной цепи. Транспорт электронов в системе обеспечивает векторный перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Возникший градиент протонов становится кладовой энергии, находящейся в двух формах: 1) в форме градиента концентрации, созданного разницей концентрации протонов (H^+) и, следовательно, разными значениями рН по обеим сторонам внутренней митохондриальной мембраны; 2) в форме электрического градиента, обусловленного разной концентрацией зарядов. Концентрационный градиент обеспечивает энергией образование АТФ, АДФ, неорганического фосфата и, кроме того, способствует транспорту Ca^{2+} из цитоплазмы в митохондрии, связанного с Na^+/H^+ обменом. В физиологических условиях протоны никаким другим способом не могут пройти через внутреннюю митохондриальную мембрану.

В случае снижения или даже прекращения притока кислорода происходит следующее: прекращается транспорт электронов по дыхательной цепи, т.к.

отсутствует конечный акцептор. В результате этого прекращается создание градиента протонов. В дальнейшем прекращается транспорт Ca^{2+} внутрь митохондрий и, более того, отмечается обратно направленное движение этих ионов, так как обычно концентрация Ca^{2+} в митохондриях значительно превышает их содержание в цитоплазме. Прекращается выход Na^+ из митохондрий и замедляется или останавливается синтез АТФ. В дальнейшем:

изменяется соотношение концентрации адениловых нуклеотидов

$$[\text{АТФ}] / [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]$$

активируется гликолиз, увеличивается концентрация лактата,

снижается концентрация субстратов цикла трикарбоновых кислот.

Однако активность ферментов дыхательной цепи не изменяется на протяжении всего периода обратимого поражения клетки. Их обратимость и обусловлена, тем, что после восстановления притока кислорода и субстратов транспорт электронов и образование АТФ восстанавливается в полном объеме.

ФАЗА ОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Среди субклеточных структур изменения чаще всего встречаются в митохондриях. По мере снижения образования АТФ наблюдается конденсация матрикса митохондрий. Эта ситуация напоминает физиологическую стадию перехода от состояния покоя митохондрий (состояние 4) к активному дыханию (состояние 3), которая регулируется содержанием АДФ. В физиологических условиях при избытке АДФ матрикс приобретает "конденсированную форму", но в присутствии кислорода моментально увеличивается транспорт электронов, усиливается окислительное фосфорилирование и матрикс вновь принимает "ортодоксальную форму".

Конденсация матрикса митохондрий осуществляется за счет изменения конформации структур матрикса. Кроме того, в матриксе начинают накапливаться ионы натрия и вода за счет усиления проницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Матрикс постепенно приобретает вид, очень похожий на "ортодоксальный", но затем он увеличивается в объеме, что проявляется увеличением объема всей митохондрии и деформацией крист. Постепенное снижение рН матрикса митохондрии приводит к частичной денатурации находящихся в нем белков, что проявляется наличием мелких хлопьевидных

структур, содержащих, как правило, Ca^{2+} . И все-таки до этого момента все структурные изменения митохондрий обратимы.

Мембранные структуры эндоплазматического ретикула (ЭПР) вначале не подвергаются никаким изменениям, но их проницаемость увеличивается.

Ядро клетки с самого начала возникновения гипоксии подвергается ряду изменений, прогрессивно усугубляющихся, но ещё обратимых. Прежде всего это относится к перераспределению хроматина в ядре, что зависит от постоянного снижения рН среды, и представляет собой основу для прекращения синтеза РНК.

В стадии обратимого повреждения клетки возможно восстановление гомеостаза при увеличении кровотока и притока кислорода, структурные изменения клетки и её органелл при этом исчезают.

ФАЗА НЕОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Характеризуется углублением метаболических и структурных изменений. Клетка, на этой стадии, теряет способность поддерживать механизмы гомеостаза. В результате этого стимулируются процессы катаболизма, связанные, прежде всего, с лизосомами. Отмечается перераспределение ионов между цитоплазмой клетки и окружающей средой, что в конечном итоге приводит к выравниванию их концентраций внутри и снаружи клетки. Происходит набухание митохондрий, они теряют способность к синтезу АТФ. Из митохондриальных мембран исчезают молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и возникают мультимембранные структуры, похожие на липосомы, что, очевидно, обусловлено взаимодействием фосфатидных кислот, возникающих в результате расщепления фосфолипидов. Рибосомы отделяются от мембран ЭПР, а плазматические мембраны становятся проницаемыми для макромолекул (белки, ферменты).

Можно наблюдать первые признаки фрагментации мембран, сопровождающихся проникновением витальных красителей внутрь клетки. Лизосомы начинают увеличиваться в объеме.

ФАЗА ПОЯВЛЕНИЯ ЗОН НЕКРОЗА

Характеризуется прогрессирующей дезинтеграцией клеточных структур. Происходит расщепление молекул ДНК, РНК и белков, наблюдается увеличение неорганического фосфата и аминокислот в клетке.

Особая роль в процессе деградации макромолекул отводится гидролазам, выходящим из лизосом и активируемых кислой реакцией среды. Разрушается

структура ядра, образуются фрагменты мембран митохондрий, ЭПР. Происходит снижение рН среды до 4,0–5,0. В опытах на почках крыс, проведенных при 0° С, нормальные значения всех ключевых метаболитов и ультраструктурных характеристик отмечались на протяжении 2 часов после начала ишемии. При 37°С этот период для клеток почек составлял 25–40 мин.

В зависимости от факторов, вызывающих указанные изменения, и интенсивности их воздействия они сказываются только на скорости указанных процессов, но ни в коей мере на их последовательности. В ряде случаев, например, при тяжелом ожоге, необратимые изменения происходят мгновенно и некроз является первым признаком поражения клеток.

ТЕПЛОВОЙ ОЖОГ – КАК ПРИМЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ НЕКРОЗЕ. Местом приложения действия теплового ожога являются молекулы белков, которые подвергаются структурным изменениям различного характера: от обратимой денатурации до минерализации с освобождением углерода при обугливание. Местом проявления действия теплового ожога в первую очередь становятся молекулы белков мембран эндотелиальных клеток капилляров кожи. В результате повреждения повышается проницаемость эндотелия и плазма крови (главным образом, альбумин) выходит в интерстиций. В интерстициальном пространстве накапливается содержащая альбумин жидкость, наблюдается отек. Увеличению объема ткани в месте повреждения способствует и нарушение транспортных процессов в мембранах клеток пораженной области. Скопление жидкости в интерстиции приводит к повышению притока крови к пораженному участку. В очаге некроза происходит снижение рН, активируются протеолитические ферменты. В результате этого образуются биологически активные вещества, прежде всего брадикинин. Брадикинин усиливает проницаемость, вызывает дилатацию сосудов, стимулирует образование простагландина E₂. Важным свойством брадикинина является его стимулирующее действие на деление лимфоцитов, связанное с модификацией иммунного ответа.

При обратимых изменениях мембран и транспортных механизмов постепенно восстанавливается исходное состояние, а отек исчезает. В противном случае, поврежденные клетки постепенно погибают. До сих пор неизвестно никакого химического метода, с помощью которого можно было бы в данной ситуации отличить обратимые и необратимые изменения мембран.

При очень сильном тепловом воздействии часть клеток погибает уже в момент его приложения и продукты их распада покрывают большую или меньшую часть поверхности (некрозы). Так как участки некроза лишены каких-либо защитных свойств, они становятся благоприятной почвой для микробов самых разных видов.

Так как с момента ожога пораженный организм постоянно и длительно находится под влиянием катехоламинов (адреналина), высвобождающихся в результате центрального влияния, что вызвано стрессом (боль, страх и т.п.), он в течение первых часов после травмы может обеспечить себе необходимый уровень глюкозы за счет расщепления гликогена в печени (переход фосфоорилазы β в фосфоорилазу α). Однако запасы гликогена в печени (около 200 г) будут исчерпаны в течение нескольких часов.

Для создания необходимого уровня глюкозы в крови будут включаться дополнительные механизмы, в том числе активация глюконеогенеза. Глюкоза в этом случае образуется из аминокислот с разветвленной цепью – валина, изолейцина, лейцина, высвобождающихся в результате внутриклеточного гидролиза. После переаминирования и декарбоксилирования они через сукцинил-КоА превращаются в оксалоацетат и пируват. Пируват, с помощью той же трансаминазы, превращается в аланин, который с кровью переносится в печень, где дезаминируется. Пируват в процессе глюконеогенеза в печени превращается в глюкозу.

В течение первых дней после повреждения этим путем разрушается до 75 г мышечных белков ежедневно. Затем это количество снижается. Расщепление белков сопровождается выходом K^+ из клеток и его повышенным выведением из организма. Потеря 1 г азота с мочой обычно сопровождается потерей 2,5 – 3,0 молей K^+ .

Ускоряется разрушение жиров и жирных кислот путем окисления в гепатоцитах, что приводит к увеличению содержания ацетил-КоА. Возникает относительная недостаточность пирувата, а следовательно, и оксалоацетата, который мог бы возникнуть из пирувата в результате реакций карбоксилирования. Поэтому избыток ацетил-КоА не может быть превращен в цитрат и затем окислен в цикле трикарбоновых кислот. Он становится источником кетоновых тел (ацето-ацетата и β -гидроксипутирата), которые вместе с лактатом способствуют возникновению метаболического ацидоза.

Было показано, что при обширных ожогах повышенное испарение воды с раневой поверхности, видимо, не является первичной причиной повышения обмена веществ, как предполагалось раньше. Очевидно, стимуляция метаболизма

осуществляется в результате усиленного продуцирования адреналина. Под влиянием адреналина происходит разобщение окислительного фосфорилирования и усиленное выделение тепла. Наряду с этим усиливается гидролиз АТФ, следствием чего является повышение температуры тела. Поэтому всегда нужно стараться снизить образование или ослабить действие адреналина. После коррекции параметров внутренней среды нужно обеспечить достаточный приток энергии, возместить потерю белков и обеспечить достаточный перенос кислорода к пораженным клеткам.

АПОПТОЗ

Феномен апоптоза известен как физиологическая, программированная гибель клеток, а в переводе с греческого он означает “опадание” (листьев с деревьев, лепестков с цветов). Термин был введен J. Керр в 1972 г. для обозначения процесса противоположного митозу [11]. *Апоптоз* — это гибель клеток путем самоликвидации, происходящая в нормальных и патологически измененных тканях. Синонимами термина апоптоз являются “активная гибель клетки”, “физиологическая гибель клетки”.

Гибель клеток обнаруживается на самых ранних стадиях эмбриогенеза: при формировании органов, замене одних тканей на другие, резорбции временных органов. Во взрослом организме клеточная гибель необходима для регуляции популяций клеток. Апоптоз составляет основу таких важных процессов как позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, гибель лимфоцитов, индуцированная глюкокортикоидами, интерфазная гибель тимоцитов при облучении, гибель при дефиците ростовых факторов.

Благодаря апоптозу организм защищен от вирусных инфекций. В свою очередь многие вирусы содержат гены, кодирующие белки с антиапоптотической активностью. Иммунодефицит при ВИЧ-инфекции определяется нарушениями в контроле апоптоза. Многие противоопухолевые препараты индуцируют этот процесс. Массовая апоптотическая гибель клеток является причиной спонтанного исчезновения опухоли, наблюдаемого иногда в клинике .

На биохимическом уровне для апоптоза характерна энзиматическая межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК. Сначала происходит образование крупных фрагментов ДНК, содержащих 700, 200-250, 50-70 тысяч пар оснований (т.п.о.), несколько позже 30 – 50 т.п.о. Уже на этой стадии регистрируются

конденсация хроматина и выпячивание ядерной мембраны, характерные для апоптоза [10].

При электрофорезе ДНК апоптотических клеток выявляется характерная “лесенка “. Этот показатель широко используется для идентификации апоптоза. Анализ электрофореграмм при некрозе, развивающемся как следствие нарушения целостности клетки свидетельствует о “размазанном” характере зоны миграции ДНК. Наличие “лестницы” при электрофорезе ДНК характеризует процессы:

1) межнуклеосомной деградации ДНК и 2) появление двунитевых разрывов между нуклеосомами с формированием фрагментов, содержащих 180-190 т.п.о., соответствующих протяженности нитей ДНК в нуклеосоме. Именно эти фрагменты выявляются в виде “лестницы”.

Деградация ДНК происходит при участии ферментов. Межнуклеосомная деградация ДНК при апоптозе обусловлена активацией ядерной Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы. Некоторые авторы предполагают участие в этом процессе ДНКаз I или II.

Существуют морфологические и биохимические методы изучения апоптотической гибели клетки. Наиболее важным маркером апоптоза является фрагментация ДНК при электрофоретическом разделении в агарозном геле (табл. 2).

Типы апоптоза

В зависимости от характера сигнала выделяют следующие типы апоптоза:

1. активационный;
2. вызванный глюкокортикоидами;
3. связанный с дефицитом факторов роста.

Примерами активационного апоптоза являются отрицательная селекция тимоцитов при активации антигенами, цитокинами, Fas-лигандом, элиминация аутореактивных Т-клеток в тимусе, селекция В-клеток в лимфоидных

Показатели апоптоза

Морфологические	Конденсация ядерного материала, образование апоптотических телец
Электрофоретические	Фрагментация ДНК, наличие “лестницы”
Проточная цитофлуориметрия	Уменьшение размеров клеток, уменьшение окрашиваемости ДНК-тропными красителями
Биохимические	ICE (interleukin converting enzyme) CPP-32 (сериновая протеиназа) Ca-зависимая трансглутаминаза (тип II)

фолликулах. Известно также удаление с помощью апоптоза стареющих нейтрофильных лейкоцитов и мегакариоцитов, потерявших большую часть своей цитоплазмы при образовании тромбоцитов. Под влиянием глюкокортикоидов гибнут популяции Т-клеток, локализованных в коре тимуса, и Т₁-лимфоцитов крови. Популяции Т₂-лимфоцитов и В-лимфоцитов не чувствительны к действию глюкокортикоидов.

МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ПРИ АПОПТОЗЕ

Хотя при развитии организма апоптотическая гибель представляется как запрограммированное событие, в этом процессе участвуют внеклеточные факторы – индукторы апоптоза. Сейчас является общепринятым мнение, что пусковые сигналы и начальные механизмы его развития могут быть довольно разнообразными и лишь на определенном этапе они вливаются в единый путь, реализуются в виде стандартного механизма. Наиболее известные индукторы и ингибиторы апоптоза представлены в табл. 3.

Fas-система (APO-1, CD 95). Наиболее хорошо изучены *Fas-лиганд (Fas L)* и *Fas-рецептор*, для которых пока неизвестны иные функции, чем индукция апоптоза.

Fas L может рассматриваться как цитокин, связанный с мембраной. Fas L экспрессируется на ограниченном числе клеточных типов (в случае Т-клеток – только на активированных формах). Гомологами Fas-системы являются TNF α (фактор некроза опухоли), CD 40, CD 27, TNF-RI. Следует подчеркнуть, что гомологи Fas и Fas L также имеют прямое отношение к апоптозу: TNF α является

наиболее апоптогенным из цитокинов. Fas-опосредуемый апоптоз участвует в элиминации дефектных и “отработавших” клеток и в предупреждении аутоиммунных и лимфопролиферативных процессов. Fas-система играет важную роль в развитии Т-клеток, цитотоксичности, удалении незрелых Т-клеток, реагирующих с аутоантигенами.

Таблица 3

Индукторы и ингибиторы апоптоза

Индукторы	Ингибиторы
Глюкокортикоиды	Bcl-2 (bcl-x, BAX)
антигены	теломераза
цитокины	мутация p53
УФ и γ -излучение	p35
Ca ²⁺	Zn ²⁺
Fas / APO-1 (CD95)	ингибиторы синтеза РНК и белка
ced-3, ced-4	ингибиторы протеиназ
ФНО	интерферон- γ
ICE	
Церамид	
Ca ²⁺ -зависимая трансглутаминаза (тип II)	
Фосфатидилсерин	
p53	
c-мус	

У мышей с мутациями CD95 развивается лимфоаденопатия и аутоиммунная патология, аналогичная системной красной волчанке. Недавно получены данные о том, что снижение CD4⁺ Т-клеток при СПИДе также связано с CD95-опосредованным апоптозом.

Выявлено целое семейство факторов CD95, куда входят рецептор и фактор роста нервов, В-клеточный антиген CD40, маркер активации Т-лимфоцитов CD27. CD95 и его гомолог TNF-RI имеют гомологичную последовательность во внеклеточной части молекул. Этот “домен смерти” абсолютно необходим для индукции цитотоксического сигнала. Цитоплазматический С-конец CD95 содержит “домен спасения”, удаление которого усиливает цитотоксическую активность

рецептора. “Домен смерти” TNF-RI взаимодействует с серин/треониновой протеинкиназой и запускает сигнальный механизм апоптоза. К вторичным (внутриклеточным) мессенджерам относят церамид, который включает последующие этапы апоптоза.

Ионы Ca^{2+} . Роль ионов Ca^{2+} в осуществлении межнуклеосомной деградации ДНК и развитии апоптоза связывают с активацией Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой *эндонуклеазы*. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} регистрируется при действии многих, но не всех индукторов апоптоза (например: глюкокортикоидов, антител к рецепторному комплексу TCD-CD3). Препараты, повышающие уровень Ca^{2+} (ионофоры) вызывают апоптоз тимоцитов, но не зрелых Т-клеток. Дело в том, что для активации апоптоза Т-клеток необходимо сочетанное действие ионофора Ca^{2+} и активатора протеинкиназы С (обычно для этой цели используют фоболмиристат), тогда как для включения апоптоза тимоцитов достаточно действия одного ионофора.

Ключевые механизмы на поздних этапах передачи сигнала связаны с экспрессией генов апоптоза и проявлением активности цистеиновых протеиназ семейства ICE (interleukin converting enzyme), а также сериновых протеиназ — гранзимов и цитолизиннов. ICE расщепляет предшественник ИЛ-1 β .

К семейству цистеиновых протеиназ типа ICE относятся также CPP32, Nedd2 (Ich-1), которые принимают участие в деградации внутриклеточных белков, таких как ламин В, топоизомераза I, гистон РI, фосфолипаза А₂, протеинкиназа С. Полагают, что эффект этих протеиназ является ключевым как для относительно ранних (формирование крупных фрагментов ДНК), так и заключительных этапов апоптоза, общих для всех его разновидностей.

Ca^{2+} -зависимая трансглутаминаза (тип II). Активация этого фермента является обязательным и характерным биохимическим признаком апоптоза (маркер апоптоза). Этот фермент участвует в перекрестном сшивании мембранных белков, что в дальнейшем приводит к сморщиванию цитоплазматических гранул, формированию устойчивого к действию детергентов покрова, уплотнению и деформации наружной и внутриклеточной мембран.

Асимметрия фосфолипидов. При апоптозе изменяется характер упаковки фосфолипидов. При этом устраняется асимметрия фосфолипидов мембраны. Так, фосфатидилсерин, находящийся во внутренней части мембраны, оказывается экспрессированным на наружной поверхности. Фосфатидилсерин является одним из

мембранных маркеров апоптотических клеток, который распознается макрофагами. Это обеспечивает высокую эффективность фагоцитоза апоптотических клеток .

Белок p53. В 1982 г С.Р. Уманским была предложена гипотеза о существовании в эукариотических клетках программы клеточной гибели. Предполагалось, что одной из функций программы является элиминация постоянно возникающих клеток с онкогенными свойствами . Подтверждением этой гипотезы является открытие белка p53, индуктора апоптоза и опухолевого супрессора .

Белок p53 является регулятором транскрипции, способным узнавать специфические последовательности ДНК. Ген p53 активирует несколько генов (WAF1 / Cip1, ингибитор циклин-зависимой киназы, ген остановки роста, p26-ген, вызывающий развитие рабдомиосаркомы), которые задерживают деление клеток в фазе G₁. После действия факторов, вызывающих повреждение ДНК (радиация, УФ-облучение) экспрессия гена p53 в клетках существенно усиливается. Под влиянием p53 клетки, имеющие множественные разрывы ДНК, задерживаются в фазе G₁, а если входят в S-фазу (например, в случае опухолевой трансформации), то подвергаются апоптозу.

Мутация гена p53 позволяет клеткам с поврежденной ДНК завершать митоз, сохраняет клетки, подвергшиеся опухолевой трансформации, при этом клетки оказываются резистентными к лучевой и химиотерапии. Мутантная форма белка p53 не обладает способностью останавливать клеточный цикл .

Среди ингибиторов апоптоза большое внимание уделяется ферменту *теломеразе*. Его считают ферментом “бессмертия”. Сенсацией наших дней является информация об открытии фермента, позволяющего продлить жизнь человека до 150–200 лет. Теломераза — это клеточный фермент, обеспечивающий восстановление длины теломерного (концевого) участка хромосомной ДНК . Известно, что каждая хромосома имеет на всех своих окончаниях особую структуру, называемую теломерой. Этот участок, который содержит свыше тысячи нуклеотидных повторов T-T-G-G-G-G. ДНК-полимераза неспособна обеспечивать репликацию концевых нуклеотидов в нити ДНК и с каждым последующим делением длина хромосомы становится короче на 10–20 теломерных фрагментов. После достижения определенной критической длины теломеры теряют способность поддерживать целостность хромосомы и в ней может происходить нарушение структуры ДНК, несовместимое с нормальным существованием клетки.

В большинстве клеток нормальных тканей человека теломераза неактивна и поэтому клетки подвергаются апоптозу через 50–100 делений, считая от их образования из клетки-предшественницы (тысяча теломер на одном конце хромосомы / 10–20 теломер в одном клеточном цикле = 50–100 клеточных циклов). В клетках злокачественных опухолей ген теломеразы активен. Поэтому, несмотря на свою “старость” по количеству пройденных клеточных циклов и накопление большого количества мутационных изменений в структуре ДНК, продолжительность жизни злокачественных клеток в принципе почти не ограничена.

У человека теломераза функционирует только в эмбриональных клетках и семенниках, вырабатывающих сперматозоиды в течение всей жизни. Таким образом, длину теломеры можно образно сравнить с часами, определяющими возраст клетки, считая за единицу времени один клеточный цикл.

Обнаружение активной теломеразы в опухолевых клетках предполагает развитие нового направления в разработке противоопухолевых препаратов. Если раньше большинство таких препаратов использовали против быстро делящихся злокачественных клеток (при этом повреждались и клетки иммунной системы, костного мозга, кишечника), то антителомеразные препараты должны атаковать только опухолевые клетки, поскольку их мишень (теломераза) отсутствует в нормальных клетках.

Таким образом, наиболее характерные события происходят в ядре и выражаются в конденсации и фрагментации хроматина, деградаци ДНК. В цитоплазме и мембранах клетки происходит активация сериновых и цистеиновых протеиназ, а также трансглутаминазы. Наиболее распространенными сигналами запуска являются индукторы апоптоза, к которым относятся глюкокортикоиды, цитокины, Fas-система, ионы кальция, белок p53. Антиапоптотической активностью обладают ингибиторы протеиназ, ионы цинка, теломераза – фермент «бессмертия клеток».

Глава 3. ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА

Рассмотрение цитоструктур клетки и их роли в патологии мы начинаем с изучения плазматической мембраны. Элементарные представления о клеточных мембранах связаны с тем, что мембраны отделяют клетку от окружающей среды, разделяют клетки друг от друга или делят на компартменты. Без мембраны клеточное содержимое растеклось бы, молекулы, несущие информацию, были бы потеряны в результате диффузии, процессы обмена веществ стремились бы к термодинамическому равновесию, а это, как известно, означает смерть живой системы. Представления о мембранах к настоящему времени значительно расширились, так что эта область знания известна сейчас как отдельная наука – мембранология.

Клетка всегда покрыта плотно прилегающей мембраной, которая приспособляется к любому изменению её формы. Эта мембрана называется плазматической мембраной или плазмалеммой. Она представляет собой плёнку толщиной около 10 нм.

Ограничение внутреннего содержимого клетки от окружающей среды и соседних клеток – лишь одна из многочисленных функций плазматической мембраны. Плазмалемма – очень сложная и динамичная структура, регулирующая практически каждое взаимодействие между клеткой и её окружением, включая взаимодействие с другими клетками.

Все биологические мембраны, включая плазматическую и внутренние мембраны эукариотических клеток, имеют общие структурные особенности: они представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Все клеточные мембраны представляют собой подвижные текучие структуры: большая часть составляющих их липидов и белков способна достаточно быстро перемещаться в плоскости мембраны.

ФУНКЦИИ МЕМБРАН В КЛЕТКЕ

1. *ПРОНИЦАЕМОСТЬ, ИЗБИРАТЕЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ.* Через плазматическую мембрану в клетку поступают ионы, сахара, аминокислоты, другие питательные вещества, а удаляются продукты обмена и токсические вещества.

2. *МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ.* Плазматическая мембрана клетки содержит мембранно-связанные ферменты, которые участвуют в процессах биосинтеза и катаболизма, а также внутриклеточной регуляции обмена веществ.

3. *РЕЦЕПТОРНЫЕ И КОНТАКТНЫЕ СВОЙСТВА.* На поверхности мембран расположены коммуникационные системы, которые координируют деятельность отдельных клеток в ткани или органе. Мембраны участвуют в рецепции гормонов, медиаторов, других метаболитов, определяют иммунные и антигенные свойства.

4. *СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАН:* секреция веществ, генерация нервного импульса, всасывание, переваривание пищи.

Эти основные функции обеспечивают жизнедеятельность клетки, связывают её метаболизм с другими клетками и в то же время защищают клетку от проникновения внутрь ряда веществ, токсинов, других организмов. Естественно предположить, что нарушение любого из факторов или любой функции мембраны может оказаться фатальным для организма, что фактически может послужить основой заболевания.

СТРОЕНИЕ МЕМБРАН

Основным строительным материалом биологических мембран являются белки и липиды. Фосфолипиды, составляющие главную часть липидной фракции, являются амфипатическими или амфифильными соединениями, т.е. их молекулы имеют две функционально различные части – полярную (гидрофильную) головку и гидрофобный хвост. Когда амфипатические вещества смешивают с водой, их молекулы спонтанно принимают конфигурацию, удовлетворяющую одновременно двум противоположным требованиям. Они связываются таким образом, что их гидрофильные головки погружаются в воду, в то время как гидрофобные хвосты в контакт с водой не вступают, а контактируют между собой и с другими неполярными веществами – маслом, воздухом. По существу таким путем могут образоваться три структуры: однослойные (монослойные), мицеллы и двуслойные (бислойные).

Молекулярные монослои образуются на границе между водой и воздухом или какой-либо гидрофобной жидкостью. Мицеллы возникают в воде в виде сферических кластеров с обращенными вовнутрь хвостами и смотрящими наружу головками. Смешайте раствор мицелл с воздухом и мицеллы соединятся и окружают пузырьки воздуха однослойной пленкой (эффект пены), с образованием мыльного пузыря. Двуслойные структуры образуются при определенных условиях как граница между двумя фазами аналогичной природы. Возможны два варианта образования границ. Если две используемые фазы гидрофобны – как, например, воздух, – то головки молекул будут направлены внутрь, соединенные тонким слоем воды, а хвосты молекул будут торчать по обе стороны от бислоя. Такова структура мыльных пузырей. Если же обе фазы представляют собой жидкости, то хвосты молекул окажутся внутри бислоя, а головки – снаружи как у клеточных мембран. Структура типа мыльного пузыря является простейшей моделью мембраны. Входящие в её состав мыла (соли жирных кислот) имеют более простое строение, чем липиды, но они тоже амфипатические.

Фосфолипиды обладают выраженной способностью формировать бислойные структуры при смешивании их с водой. Некоторые важные свойства биологических мембран, как и мыльных пузырей объясняются структурой липидного бислоя. Одним из них является подвижность мембран. Липидный бислой – по существу жидкое образование, в пределах которого молекулы могут свободно передвигаться и перестраиваться практически в любую форму, причем без потери контактов, что соответствует их взаимному притяжению.

Вторым важным свойством бислоев липидов является их способность самозамыкаться, на основе чего возможно слияние и расщепление липидных слоев. Мембрану можно разделить на 2 части, каждая из них вновь образует замкнутую структуру. Слияние мембран также играет важную роль во многих внутриклеточных процессах, например, образовании вторичных лизосом.

К третьей особенности липидных мембран относится их непроницаемость для молекул, растворимых в воде. Такие молекулы не в состоянии пройти через бислой, ибо для этого им необходимо преодолеть гидрофобный участок. Чтобы физически проникнуть через такую пленку, вещество само должно быть гидрофобным, или воспользоваться случайными щелями, открывшимися в бислое в результате молекулярных перемещений.

МОДЕЛИ СТРОЕНИЯ МЕМБРАН. Первая модель мембраны была предложена Гортером и Гренделем в 1925 году. Изучая толщину мембраны они предположили, что липидные компоненты мембран в силу структурных особенностей представляют собой бислойную структуру. В двойном липидном слое полярные группы направлены наружу, в то время как хвосты, жирных кислот погружены в толщу мембраны и составляют таким образом её гидрофобную часть.

Однако очень скоро стало ясно, что мембрана не может состоять из одних только липидов, для осуществления её функций необходимо участие белков. Белково-липидная модель была предложена в 1931 г. Дэвсоном и Даниэлли, Вначале они предполагали, что белки в виде слоя лежат на поверхности липидов. Образуется нечто вроде бутерброда: сверху и снизу как бы два ломтя белка, а в середине липиды, наподобие масла.

Эта модель тоже была примитивной. Как известно, для многих веществ мембрана образует диффузионный барьер. Скорость диффузии в $10^6 - 10^9$ раз ниже, чем в водном растворе и все же существуют молекулы и ионы, которые почти беспрепятственно и без затраты энергии могут проходить через мембрану. Для объяснения такой избирательной проницаемости Дэвсон и Даниэлли высказали в 1955 году предположение о наличии в мембранах пор (каналов). Имеются также другие попытки объяснить укладку липидов и белков в мембране (модель "белково-липидного ковра" Робертсона).

В 1972 году Сингер и Николсон, работавшие в Калифорнийском университете, предложили принципиально новую "жидкостно-мозаичную" модель, В данной модели согласно принципам термодинамики фосфолипиды располагаются в виде прерывистого двойного слоя, в котором их полярные (ионные) головки направлены к поверхностям мембраны, а неполярные хвосты – внутрь мембран, формируя гидрофобную область мембраны. Липиды, согласно данной модели, образуют вязкий двумерный растворитель ("липидное озеро"), в который погружены белки. Отдельные белковые молекулы в пределах фосфолипидного окружения могут занимать совершенно произвольное положение. Одни из них находятся на поверхности мембраны, другие проникают внутрь, третьи располагаются по всей её толще (рис. 1).

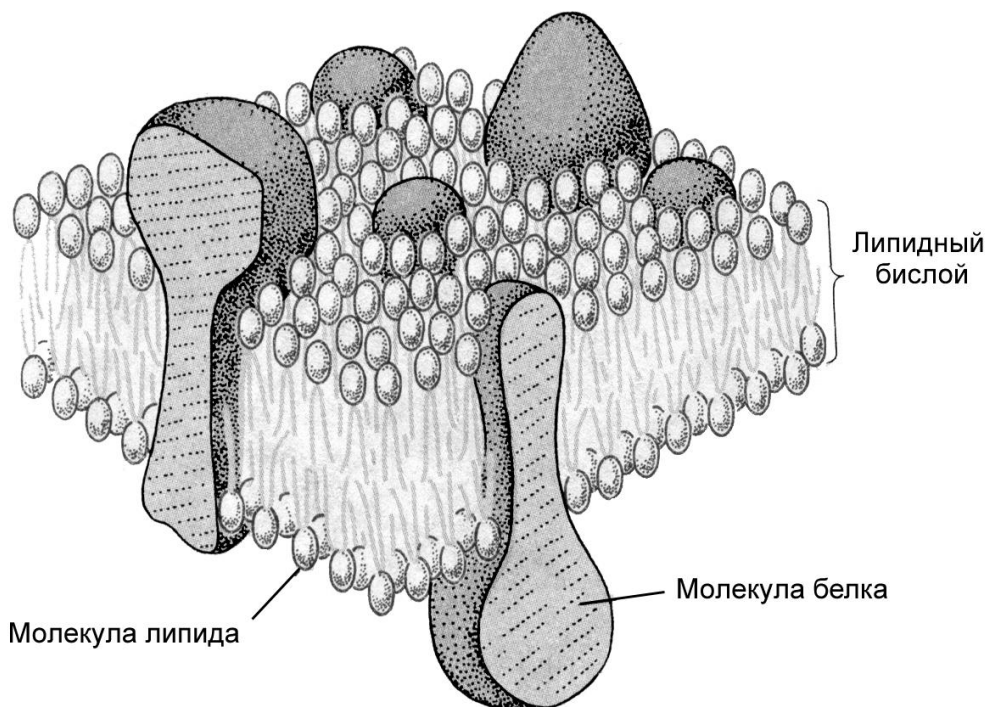


Рис. 1. Схематическое изображение участка клеточной мембраны

В усложненной модели Сингера-Николсона (1981) бислоем является жидкой структурой, в которой образующие его липиды способны осуществлять сегментарную подвижность, вращательные движения и латеральную диффузию. Белки в бислое также весьма подвижны.

Мембранные белки делятся на 3 типа: 1) белки, прикрепленные к липидным головкам с помощью электростатических сил взаимодействия (периферические белки); 2) белки, свободно плавающие в липидном озере подобно айсбергам (так, что большая часть глобулы погружена в мембрану, а меньшая часть – в окружающую среду); 3) гликопротеины, пронизывающие мембрану насквозь, с торчащими наружу углеводными хвостами.

Мембранные белки могут также быть либо иммобилизованы, либо ограничены в подвижности в связи с присутствием на внутренней поверхности мембраны микрофиламентов и микротрубочек, формирующих каркас. Обнаружение этой "якорной" роли цитоплазматических структур в латеральной подвижности молекул в мембране привело к модификации жидкостно-мозаичной модели мембранной структуры.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЕМБРАН

ЛИПИДЫ. К липидам относят низкомолекулярные вещества с различной растворимостью в органических растворителях и, как правило, нерастворимых, в воде. С этим свойством липидов связано высокое электрическое сопротивление мембран, непроницаемость для полярных соединений и проницаемость для аполярных веществ. В состав липидов всех мембран входят фосфолипиды. Молекулы фосфолипидов представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и жирных кислот с длинными углеводородными радикалами (рис. 2).

Ацильные остатки жирных кислот могут довольно сильно отличаться по длине цепи, её разветвленности и по степени ненасыщенности. При всем многообразии жирных кислот, встречающихся в природе, у определенных видов живых организмов преобладают лишь некоторые из них.

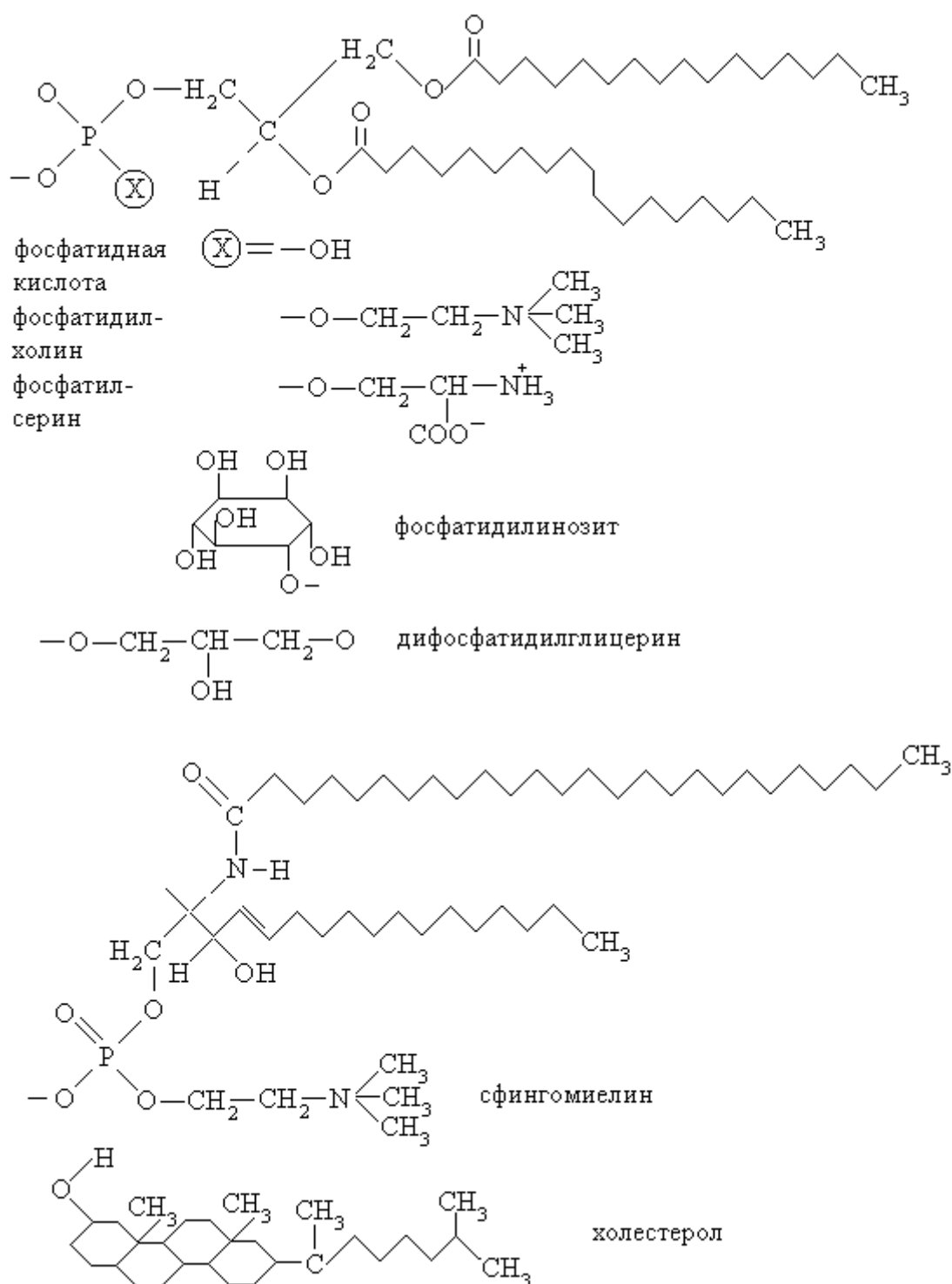


Рис. 2. Липиды мембран

Жирнокислотные остатки липидных молекул мембран клеток представляют собой неразветвленные цепи с четным числом атомов углерода – чаще всего от 14 до 24 (табл. 4).

Ненасыщенные ацильные цепи в молекулах природных липидов присоединяются, как правило, ко второму углеродному атому глицерина и содержат двойные связи у девятого углеродного атома или ещё дальше к концу цепи. В основе классификации фосфолипидов лежит химическая природа полярного радикала. Содержание фосфолипидов составляет 40–90% общего количества мембранных липидов. В мембранах наиболее часто встречаются фосфолипиды пяти типов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, кардиолипин (дифосфатидилглицерол), сфингомиелин.

Таблица 4

Жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов

Рабочее название	Систематическое название	Отношение числа атомов С к двойным связям
НАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ		
Миристиновая	Тетрадекановая	14:0
Пальмитиновая	Гексадекановая	16:0
Стеариновая	Октадекановая	18:0
Арахидиновая	Эйкозановая	20:0
Бегеновая	Декозановая	22:0
Лигноцериновая	Тетракозановая	24:0
НЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ		
Пальмитолеиновая		16:1
Олеиновая		18:1
Линолевая		18:2
Линоленовая		18:3
Арахидононовая		20:4

Особое место среди мембранных липидов занимает вещество стероидной природы – холестерол. Это обязательный компонент плазматических мембран клеток животных, он присутствует в них в значительном количестве – и в свободном виде, и в виде эфиров с жирными кислотами. Его содержание в миелине достигает 17%.

Гликолипиды представлены цереброзидами, сульфатидами, ганглиозидами, содержащими моно- или олигосахаридные компоненты вместо обычных для многих

мембранных липидов фосфатов. Углеводные остатки чаще всего связаны со сфингозином, аминспиртом, с длинной ненасыщенной углеводородной цепью. Этот класс веществ обыкновенно обозначают как сфинголипиды. В состав ганглиозидов, кроме обычных глюкозы и галактозы входят также аминсахара и их производные, в том числе сиаловая (ацетилнейраминовая) кислота. Цереброзиды являются нейтральными соединениями. Их сульфозэферы, называемые сульфocereброзидами или сульфатидами, имеют ярко выраженный кислый характер.

Ввиду высокой скорости обмена мембранных липидов для их синтеза постоянно требуется большое количество жирных кислот для образования диацилглицеридов. Из них образуется фосфатидная кислота (основа фосфолипидов) или галактозилцерамид (основа гликолипидов).

СТРУКТУРА ЛИПИДОВ МЕМБРАН. У всех фосфолипидов общий тип строения: ионогенные группы молекул образуют гидрофильную головку, а углеводородные жирнокислотные хвосты придают им гидрофобность. Молекулы таких соединений образуют истинные растворы, находясь в мономерном состоянии, лишь при чрезвычайно малых концентрациях. Попадая в водное окружение, они стремятся расположиться так, чтобы гидрофобные неполярные остатки были изолированы от контакта с водой.

Все липиды мембран, кроме холестерина имеют характерную особенность: у каждого из них имеется два неполярных остатка. Одноцепочечные липиды (лизолецитин) способствуют распаду клеточных мембран.

Наличие в мембране в составе фосфолипидов цис-изомеров жирных кислот) разветвленных или содержащих кольца углеводородных цепей, а также высокая скорость вращения вокруг С-С-связей жирнокислотных радикалов делает бислой достаточно рыхлым. Наличие двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах изменяет их конфигурацию вследствие изгиба цепи в этом месте под углом 30°. Это нарушает параллельное расположение остатков в гидрофобной части бислоя и является центром образования дефектов. Двойные связи в ацильных остатках вызывают также заметное увеличение объема, занимаемого этой частью молекулы и, следовательно, разрыхление структуры бислоя.

При большом содержании ненасыщенных жирных кислот диффузия веществ через мембрану может идти в 20 раз быстрее, чем в тех мембранах, которые содержат только насыщенные жирные кислоты. Таким образом, многие функции мембран зависят от степени ненасыщенности жирных кислот.

В жидкокристаллическом состоянии находятся митохондриальные мембраны, благодаря высокому содержанию в них ненасыщенных жирных кислот и отсутствия холестерина. Мембраны миелиновой оболочки, благодаря крайне высокому содержанию холестерина (до 25% всех липидов) – более твердые.

Особое значение ненасыщенные жирные кислоты имеют в плазматической мембране лимфоцитов. Увеличение количества арахидоновой, линоленовой, линолевой кислот повышает стимуляцию лимфоцитов в ответ на митогены и антигены. Возрастание доли ненасыщенных жирных кислот может привести к изменению микровязкости мембраны, к последующим конформационным перестройкам рецепторных молекул и, как следствие, к стимуляции способности клеток к активации митогенами.

Обычное конформационное состояние углеводородных цепей жирных кислот – вытянутая цепочка. Её длина равна 2 нм для жирной кислоты, состоящей из 18 атомов углерода. Вращение вокруг единичной С-С-связи представляет очень важный процесс в формировании структуры мембраны. При температурах, превышающих температуру фазового перехода, цепи жирных кислот могут свободно поворачиваться вокруг С-С-связи на 120° , переходя из транс- в гош-(скошенную) конфигурацию. При переходе двух соседних транс-конфигураций в гош-конформацию, образуется складка или *кинк* (рис. 3).

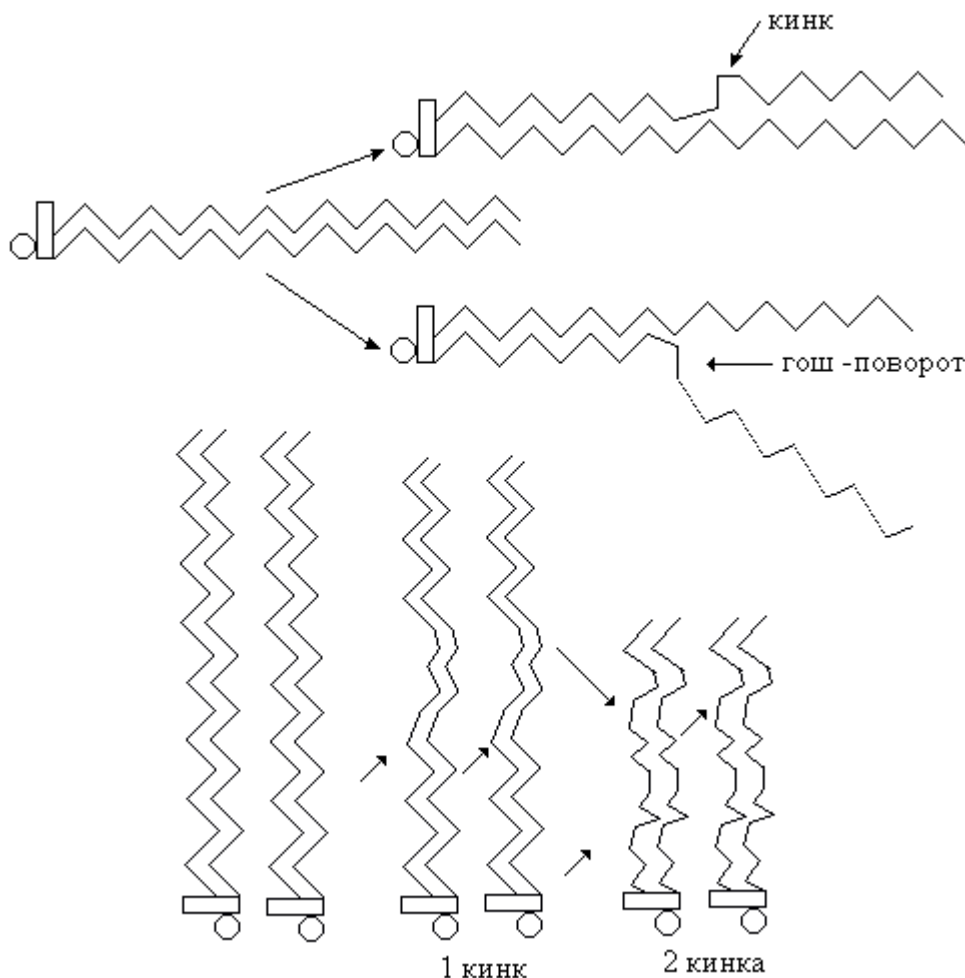


Рис. 3. Образование дефектов в бислое

Вблизи метильного конца транс- гош- изомеризация осуществляется для каждой молекулы независимо, но с приближением к полярной головке и возрастанием плотности упаковки (особенно начиная с 9 углеродного атома), гош-повороты могут осуществляться для нескольких цепей одновременно. При этом упаковка бислоя нарушается много меньше, если в каждой цепи происходит одновременно два гош- поворота и образуется кинк. Синхронные транс-гош-превращения могут быть представлены как движение кинков вдоль цепи. Вместе с этим движением через бислой возможно проникновение молекул гидрофильных веществ (воды). Образование кинков является основой появления дефектов в мембране и проникновения низкомолекулярных веществ внутрь клетки.

ПОДВИЖНОСТЬ ЛИПИДОВ. Отдельные липиды в своем слое не закреплены жестко и способны меняться местами. Для измерения подвижности липидных молекул и их частей используют "спиновую метку", например,

нитроксильную группу, имеющую неспаренный электрон, обнаруживаемый методом ЭПР.

Различают несколько видов движения липидов. Наиболее распространенной является латеральная диффузия, осуществляемая в пределах одного монослоя. Скорость латеральной диффузии чрезвычайно высока: 5 – 10 мкм/с. Такой обмен местами между соседними молекулами происходит 10 раз в 1 с. Перескок из одного монослоя в другой (флип-флоп) происходит реже одного раза в 2 недели. При "флип-флоп" переходе наружная часть поворачивается своей головкой внутрь и встраивается во внутренний слой и наоборот. Может наблюдаться также обмен хвостов липидами (внутримолекулярная подвижность), вращение и скручивание липидов, характерные для фазового перехода.

При изменении температуры, липидный бислой, состоящий из фосфолипидов, переходит из жидкого состояния в кристаллическое (или гелеобразное). Это изменение состояния называется фазовым переходом. Одним из важных факторов, определяющим текучесть мембран, является наличие холестерина.

РОЛЬ ХОЛЕСТЕРОЛА В РЕГУЛЯЦИИ СОСТОЯНИЯ МЕМБРАНЫ.

Холестерол обеспечивает подвижность липидов и, в то же время, увеличивает механическую прочность бислоя. Молекулы холестерина ориентируются в бислое таким образом, чтобы их гидроксильные группы примыкали к полярным головам фосфолипидных молекул. При этом плоские стероидные кольца молекул холестерина частично иммобилизуют участки углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к полярным головам. Холестерол, присутствующий в большинстве плазматических мембран эукариот, предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей. Его роль также заключается в ингибировании фазовых переходов, связанных с изменением температуры. Таким образом, предотвращается резкое уменьшение текучести мембран, которое в противном случае имело бы место при низкой температуре.

Избыток холестерина увеличивает микровязкость бислоя, понижает проницаемость мембран, что составляет основу наследственных гиперхолестеролемий, ишемической болезни сердца, атеросклероза. Однако исключение холестерина из диеты, не является той панацеей от атеросклероза, которой придавали значение клиницисты, т.к. избыток холестерина является не причиной, а следствием наследственной патологии обмена стероидов.

ЛИПИДЫ И АДАПТАЦИЯ. Когда вязкость мембранного бислоя превышает некоторый критический уровень, исчезают транспортные и ферментативные свойства мембраны. Теперь мы совершенно четко представляем себе, что мембраны клетки находятся в состоянии динамического равновесия. В процессе эволюции произошел отбор фосфолипидов в качестве главных компонентов мембран. Фосфолипиды обеспечивают термодинамическую стабильность и в то же время подвижность, устойчивость структуры, избирательную проницаемость.

В процессе адаптации организма к изменению условий среды в мембранах может происходить замена жирнокислотного состава липидов. Подобная адаптивная реакция очень ярко проявляется у зимнеящих животных. В период спячки температура тела у них снижается до 5°C . Мембранные ферменты при этой температуре уже не в состоянии функционировать, поскольку в области температур ниже фазового перехода мембраны слишком упорядочены, чтобы обеспечить конформационную лабильность белка. Подготовка к зимнему сезону включает изменение фосфолипидного состава мембран и увеличение количества полиненасыщенных жирных кислот в их составе. В результате активность мембранных ферментов таких животных оказывается на достаточно высоком уровне даже при низких температурах.

АСИММЕТРИЧНОСТЬ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ. Существует много экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу того, что свойства внутренней и внешней поверхностей мембран существенно различаются. Наиболее типичным фосфолипидом в мембранах эритроцитов многих млекопитающих является фосфатидилхолин, который находится на внешней поверхности мембран, также как холестерол, сфингомиелин и гликолипиды. Фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерол и другие фосфолипиды находятся на внутренней поверхности. Это обстоятельство облегчает образование изгибов, формирует градиент гибкости. Особенно ярко асимметричность липидов может быть продемонстрирована на изгибах крист митохондрий.

В последнее время большое значение придают аннулярным липидам, примыкающим к поверхности белка. Аннулярные липиды обладают меньшей подвижностью, тем самым они ограничивают движение мембранных белков. Отдельные белки могут быть окружены липидами одного типа. Это характерно для белков, способных к агрегации, например, бактериородопсина. При изучении состава липидов показано, что клетки стремятся существовать в условиях, близких к

фазовому переходу: изменение проницаемости, вязкости, скорости диффузии дает возможность управлять функциями клетки.

БЕЛКИ МЕМБРАН. Многие мембранные белки погружены в бислой липидов и имеют гидрофобные участки, которые взаимодействуют с гидрофобными хвостами липидных молекул внутри бислоя, и гидрофильные участки, обращенные к воде с одной или с обеих сторон мембран. Гидрофобность некоторых мембранных белков увеличивается за счет ковалентного присоединения одной или более цепей жирных кислот, которые помогают этим белкам удержаться в бислое. Внутри мембраны полярные группы полипептидной цепи стремятся образовать связи друг с другом. Число водородных связей между полипептидными группами оказывается максимальным, если участок полипептидной цепи, проходящий через бислой, образует α -спираль или β -слой.

Мембранные белки могут быть периферическими или интегральными. Периферические высвобождаются из мембран при сравнительно мягких условиях (например, при экстракции солевыми растворами). Интегральные белки можно выделить путем солюбилизации после полного разрушения бислоя.

Условия солюбилизации определяются задачей исследования. При изучении молекулярного состава мембран необходимо чтобы в растворе все компоненты мембран были полностью отделены друг от друга. В противном случае можно ошибочно идентифицировать какой-нибудь надмолекулярный комплекс как отдельную молекулу. В исследованиях такого рода конформация белков имеет второстепенное значение. Но если основной задачей является изучение биологической активности мембран, тогда конформация изолированных белков играет решающее значение и сохранение отдельных молекулярных связей может оказаться существенным. Такую ситуацию мы встречаем, когда биологическая активность зависит от целостности липопротеинового комплекса.

Солюбилизацию мембранных белков обычно проводят следующими методами:

- 1) обработка солевыми растворами (3 М KCl), слабыми кислотами или основаниями. При этом необходимо учитывать тип связи белка с мембраной;
- 2) Выделение белков с помощью протеолитических ферментов – трипсина, пепсина, папаина, проназы.
- 3) Обработка мембран детергентами.

Детергенты представляют собой небольшие амфипатические молекулы, стремящиеся образовать в воде мицеллы. При смешивании детергента с мембраной

гидрофобные концы его молекул связываются с гидрофобными участками на поверхности мембранных белков, вытесняя молекулы липидов. Поскольку противоположный конец молекулы детергента полярный, такое связывание приводит к тому, что мембранные белки переходят в раствор в виде комплексов с детергентом. Некоторые прочно связанные с белками молекулы липидов также остаются в этих комплексах.

Эффект детергента определяется двумя видами взаимодействий – взаимодействием молекул детергента с мембранными компонентами и взаимодействием молекул детергента друг с другом. Для выделения из мембран биологически активных молекул обычно используют тритон X-100, дезоксихолат, додецилсульфат натрия (ДСН). Детергенты могут быть нейтральными и заряженными. К неионным детергентам относятся тритон X-100, твин-20, твин-80, ДСН относится к анионным детергентам.

Сильные детергенты, к которым относится ДСН, разрушают нативную структуру белков. В типичном случае мембраны сначала прогревают до 100°C в 1 % растворе ДСН, который разрушает все нековалентные белок-белковые и белок-липидные взаимодействия. Тритон X-100 обычно используют в концентрации 0,1 %, при этом происходит частичное разрушение мембраны, 0,5 % раствор тритона X-100 полностью фрагментирует мембраны через 30 мин.

В состав мембран входят структурные, рецепторные белки и мембранно-связанные ферменты. Наиболее хорошо изучены структурные белки мембран эритроцитов. Лизированные в гипотоническом растворе эритроциты, представляют собой чистую плазматическую мембрану без примеси внутренних мембран. Такие мембраны или "тени" (пустые оболочки) эритроцитов позволяют изучать как поверхностные, так и интегральные белки. При изучении белков плазматической мембраны эритроцитов человека методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН были идентифицированы около 15 главных белков с молекулярной массой от 15 000 до 250 000 дальтон.

Около одной трети белка в мембране эритроцита приходится на долю *спектрина*, расположенного на внутренней стороне мембраны. Его молекула имеет фибриллярную структуру, состоящую из двух полипептидных цепей (около 220 и 240 кДа каждая). Этот белок образует сеть филаментов на внутренней поверхности мембраны. Существует ряд доказательств, что спектрин подобен миозину. В формировании сетчатой структуры участвует актин и ещё один низкомолекулярный

белок. Сетчатая структура необходима для поддержания двояковогнутой формы эритроцитов и в то же время позволяет им деформироваться при прохождении через узкие капилляры. Спектрин через белок анкирин, выполняющий якорную функцию, взаимодействует с белком полосы III.

Белок полосы III является трансмембранным белком, но в пределах липидного бислоя этот белок находится в свернутой, глобулярной конформации; при этом его полипептидная цепь пронизывает бислой несколько раз. Белок полосы III содержит относительно мало углеводов, мол. масса белка 100 000. Его молекулы содержат "каналы", необходимые для транспорта воды и анионов (хлоридов, бикарбонатов) и поэтому белок полосы III называют "туннельным белком".

Особый интерес представляет *гликофорин*, выполняющий структурную и рецепторную функцию. Гликофорин представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из 131 аминокислотного остатка, с молекулярной массой 13100. Большая часть его массы находится на наружной поверхности мембраны, где локализован его гидрофильный N-концевой участок. Около 60 % его массы составляют углеводы. С N-концевой частью связано 16 олигосахаридных разветвленных цепей, выступающих над поверхностью мембраны. Из-за высокого содержания сиаловой кислоты гликофорин имеет большой отрицательный заряд. К N-концевой части молекулы примыкает цепь из 32 гидрофобных аминокислотных остатков, которые образуют α -спиральный участок, пронизывающий бислой. Третий участок гидрофилен (C-конец) и обогащен остатками пролина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Он может достигать цитоплазмы и связывать ионы кальция или взаимодействовать с NH_3^- группами фосфолипидных головок.

Если бы все углеводные остатки гликофорина оказались равномерно распределенными на поверхности клетки, то они могли бы покрыть 1/5 её поверхности, образовав сетку. В действительности, они распределены, по-видимому, неравномерно и образуют выступающие из мембраны скопления. Было показано, что углеводородные выступы являются носителями антигенов групп крови MN-типа и ряда других иммунологических детерминант. Они служат также рецепторами для вирусов гриппа и местами присоединения растительных агглютининов.

МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ. В основном это глобулярные белки с α -конфигурацией. Как правило, мембранные ферменты работают только тогда, когда они находятся в контакте с липидами, в связи с этим ферменты мембран также обладают большими неполярными гидрофобными областями. В присутствии

липидов мембранные ферменты самоорганизуются в белково-липидные комплексы, в отсутствие липидов их активность резко падает. Мембранные ферменты являются векторными, т.е. участвуют в направленном транспорте растворимых молекул через липидный бислой. В них имеются участки связывания для транспортируемой молекулы (субстрата). При переносе субстрата через мембрану, как правило, происходит специфический гидролиз субстрата или реакция переноса сопряжена с гидролизом АТФ.

5'-нуклеотидаза является липидзависимым ферментом. Его каталитическая активность заключается в гидролитическом превращении внеклеточного АМФ с освобождением образовавшегося аденозина внутрь клетки. Таким образом, фермент регулирует уровень 5'-АМФ, который является аллостерическим эффектором ферментов гликолиза и цикла лимонной кислоты.

5'-нуклеотидаза относится к маркерным ферментам плазматической мембраны клеток. Увеличение *5'-нуклеотидазной* активности крови при гепатите является диагностическим тестом на повреждение мембран гепатоцитов.

Недостаточность

5'-нуклеотидазы сопровождается значительным изменением содержания аденозина в лимфоцитах, обуславливает нарушение функций Т- и В- клеток при тяжелых иммунодефицитных заболеваниях. Было показано, что степень активности фермента находится в определенной отрицательной взаимосвязи с интенсивностью клеточного метаболизма. Высокая активность *5'-нуклеотидазы* сопровождалась низким уровнем синтеза ДНК и белка, тогда как низкая активность фермента наблюдалась в регенерирующей печени и в плазматических мембранах, выделенных из клеток гепатомы. Это дало основание назвать *5'-нуклеотидазу* ферментом "деградации".

Na⁺, K⁺-зависимая АТФ-аза также является липидзависимым ферментом и выполняет функции ионного насоса. Для активации ферментной системы ионы Na⁺ и K⁺ должны находиться по разные стороны мембраны и, в соответствии с этим, белковая глобула АТФ-азы пронизывает мембрану насквозь. При гель-электрофорезе в присутствии ДСН очищенная Na⁺K⁺- зависимая АТФ-аза разделяется на 2 субъединицы.

Большая из них представляет собой полипептидную цепь с м.м. 100 кДа, а меньшая является гликопротеидом с м.м. 45 кДа. Большая субъединица относится к трансмембранным белкам и обладает каталитической активностью, а малая, с углеводным компонентом, расположена на наружной поверхности. Функция

гликопротеина неизвестна. Возможно, что в мембране ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) - АТФаза существует как тетрамер, состоящий из двух малых и двух больших субъединиц.

В клетке ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) - АТФаза ответственна не только за мембранный потенциал клетки, но и за регуляцию клеточного объема, а также за активный транспорт сахаров и аминокислот. Увеличение активности фермента имеет существенное значение в процессе активации лимфоцитов митогенами. Взаимодействие митогенов непосредственно с рецепторами приводит к открытию канала для катионов натрия, что вызывает деполяризацию мембраны. Затем происходит увеличение $\text{Na}^+ \text{K}^+$ - зависимой АТФазы, что усиливает ток K^+ внутрь лимфоцита.

Аденилатциклаза катализирует реакцию превращения АТФ в циклический АМФ (цАМФ). Известно, что аденилатциклаза связана с внутренней поверхностью плазматической мембраны и тем не менее её активность изменяется при взаимодействии гормонов с рецепторами, расположенными на внешней поверхности мембраны (рис. 4). Дело в том, что аденилатциклаза состоит из белков:

1. белок-рецептор. Таких рецепторов много и они подвержены латеральному движению;

2. М – субъединица, несущая сайты для моно- и бивалентных катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Li^+);

3. G-белок (G_S , G_I - субъединицы). G_I является ГТФ–зависимой ингибиторной субъединицей, осуществляет гидролиз ГТФ до ГДФ и P_i . Она образует стабильный комплекс с R–субъединицей, возможно, с помощью дисульфидных мостиков. G_S – является стимулирующей субъединицей, которая способна взаимодействовать с ГТФ, холерным токсином. G_S – также как G_I проводит гидролиз ГТФ до ГДФ и P_i . G_S , в отличие от G_I , ассоциирована с R на внутренней стороне плазматической мембраны и менее чувствительна к действию сульфгидрильных ядов. G-белок находится в толще мембраны и образует комплекс с C-белком. Он активируется при связывании с гуанозинтрифосфатом (ГТФ). G-белок является "усилительным ферментом". При взаимодействии гормонов с рецептором происходит аллостерическая перестройка G-субъединицы, способствующей катализу аденилатциклазной реакции на внутренней стороне мембраны.

4. C-белок: (каталитическая субъединица).

C-белок является собственно аденилатциклазой, превращает АТФ в молекулу вторичного мессенджера – циклического АМФ.

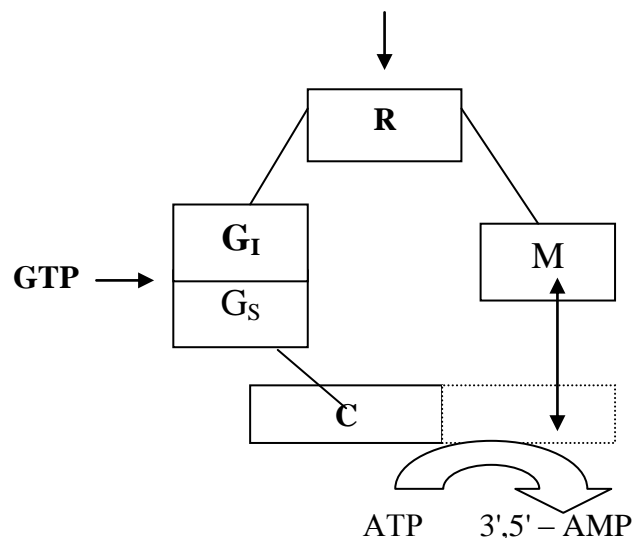


Рис. 4. Схематическое строение аденилатциклазы

Циклический АМФ, образующийся в результате активации аденилатциклазы, носит название вторичного мессенджера и представляет собой усилитель сигнала в каскадных системах метаболизма.

Из всех путей внутриклеточной передачи информации в настоящее время лучше всего изучена передача через мембрану и процессы усиления, ведущие к образованию цАМФ. Основные факты, касающиеся этих процессов, выяснялись постепенно, начиная с 1958 г., когда Э. Сазерленд-младший и Г. Ролл, работавшие в университете Кейс-Вестерн-Резерв в США, открыли сам цАМФ. Затем в 1971 г. М. Родбэлл и его коллеги показали, что при передаче сигнала через мембрану для образования цАМФ необходим ГТФ.

Важно отметить, что использование цАМФ как второго посредника приводит к значительному усилению гормонального сигнала. Многие гормоны в крови присутствуют в концентрациях порядка 10^{-10} М. В стимулированных клетках-мишенях концентрация цАМФ намного выше, так как каждая активированная молекула аденилатциклазы синтезирует много молекул цАМФ. На следующем этапе цАМФ активирует протеинкиназу А. Фосфорилирование множества молекул белка молекулой протеинкиназы, активированной цАМФ, представляет ещё один этап усиления гормонального сигнала. Каскад ферментативных реакций, регулирующий обмен гликогена служит примером того, как малые стимулы могут вызвать значительные изменения метаболизма клетки. (табл. 5).

Непосредственное участие цАМФ в патологических процессах было четко установлено при действии *холерного токсина*. Основным клиническим проявлением

холеры, вызываемой холерным вибрионом, является сильнейший понос (диарея). В течение нескольких часов организм может потерять несколько литров жидкости, и если потерю жидкости не возместить, то развивается шок и наступает смерть. Диарея обусловлена не прямым действием бактерий, а бактериальный токсином. Холерный токсин вызывает множество эффектов: накопление жидкости в петлях тонкой кишки, липолиз жировых клеток, ингибирование синтеза ДНК в фибробластах. Общим механизмом столь разнообразных эффектов является выраженная стимуляция (в 10 раз и более) активности аденилатциклазы и накопление цАМФ в указанных клетках. Увеличение цАМФ стимулирует активный транспорт K^+ в кишечном эпителии, вследствие чего резко возрастает выход Na^+ и воды в полость кишечника.

Таблица 5

Каскадный механизм регуляции адреналином расщепления гликогена

Каскад усиления сигнала	Этапы регуляции расщепления гликогена
Внешний сигнал (первичный мессенджер)	Адреналин
Рецептор	Адренэргический рецептор
Преобразователь	G-белок
Усилитель	C-белок
Вторичный мессенджер	Циклический АМФ
Усилитель	цАМФ-зависимая протеинкиназа
Внутренний эффектор	Фосфорилирование киназы фосфорилазы b
Клеточный ответ	Стимуляция распада гликогена

Молекула холерного токсина представляет собой белок с м.м. 87 кДа, состоит из двух А-субъединиц и пяти В-субъединиц. Приближение молекулы холерного токсина к поверхности мембраны клетки, на которой находятся рецепторы, вызывает перемещение рецепторов и они притягиваются к молекуле токсина. Рецепторами холерного токсина являются G_{m1} -ганглиозиды. Этот богатый углеводами сфинголипид узнает β -цепи токсина. На следующем этапе реагирующие молекулы меняют свою конформацию, в результате чего от токсина отделяется А-субъединица (23 кДа), которая в дальнейшем проникает вглубь мембраны и затем ковалентно

модифицирует G-белок, регулирующий активность аденилатциклазы. По существу, G-белок оказывается стабилизированным в ГТФ-форме, а аденилатциклаза – в непрерывно активированном состоянии. Аналогичный эффект можно получить путем добавления к G-белку гуанилилимидодифосфата – негидролизуемого аналога ГТФ. Этот аналог, подобно ГТФ, активирует G-белок, но не способен превращаться в ГДФ. Действие холерного токсина доказывает очень важное значение ГТФ-азной активности G-белка.

РЕЦЕПТОРНЫЕ БЕЛКИ – специфически связывающие те или иные низкомолекулярные вещества. При связывании сами рецепторные белки обратимо меняют' свою форму и запускают в клетке ответные химические реакции. Как правило, рецепторные белки бывают гликопротеидами.

Водорастворимые сигнальные молекулы, в том числе все известные нейромедиаторы, пептидные гормоны и факторы роста, присоединяются к специфическим белковым рецепторам на поверхности клеток-мишеней. Рецепторы связывают такую сигнальную молекулу (лиганд), проявляя большое сродство к ней, и это внеклеточное событие порождает внутриклеточный сигнал, изменяющий метаболизм клетки. Поскольку рецепторы являются нерастворимыми мембранными белками и составляют обычно менее 1% общей массы белков плазматической мембраны, их трудно выделить и изучить.

Используя лиганды, меченные радиоактивными или флуоресцентными соединениями, можно изучать количество, расположение и свойства поверхностных рецепторов. Было показано, что число рецепторов конкретного лиганда может варьировать от 500 до 100 000 молекул на клетку и что сразу после связывания лиганда рецепторы могут располагаться на плазматической мембране либо случайным образом либо скапливаться в определенной области.

На поверхности многих клеток имеются также специфические рецепторы к макромолекулам. Белковые сигнальные молекулы попадают внутрь клеток-мишеней путем эндоцитоза, опосредуемого рецепторами. Важный процесс, идущий, как известно, при помощи опосредуемого рецепторами эндоцитоза, – это поглощение клетками холестерина из внеклеточной среды. За счет этого обеспечивается потребность клеток в холестероле, необходимом для синтеза мембран. Основная часть холестерина переносится кровью в виде комплексов с белком, которые известны под названием липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Эти комплексы

включают в свой состав белки (Апо-В), жирнокислотные остатки и богаты эфирами холестерина.

Холестерол необходим клетке для синтеза мембран. На поверхности плазматической мембраны имеются белки-рецепторы, связывающие ЛНП. Все ЛНП-частицы, связавшиеся с ЛНП-рецепторами, быстро проникают внутрь клетки путем эндоцитоза. Эндосомы, содержащие ЛНП, сливаются с лизосомами. В лизосомах происходит гидролиз ЛНП и освобождение холестерина. Если в клетке скопилось слишком много холестерина, то его синтез, а также синтез белков-рецепторов ЛНП подавляются, в результате чего снижается его поступление в клетку.

Отсутствие рецепторов ЛНП, обусловленное дефектом генов белков-рецепторов ЛНП, приводит к гиперхолестеролемии и преждевременному атеросклерозу. При этом нарушении общая концентрация холестерина и ЛНП в сыворотке крови заметно увеличена. В результате повышения концентрации холестерина в крови, он откладывается в различных тканях. Гранулы холестерина называют ксантомами, они часто встречаются на коже. Более опасно отложение холестерина в бляшках на стенках артерий и, особенно, коронарных сосудов. Большинство гомозиготных больных гиперхолестеролемией погибает в детстве из-за поражения коронарных сосудов. У гетерозигот наблюдаются различные формы заболевания и в целом оно протекает легче. Содержание холестерина в сыворотке крови в норме 1,75 г/л у гетерозиготных больных – 3 г/л, а у гомозиготных – 6,8 г/л.

Ещё одним примером рецепции макромолекул на плазматической мембране является *опосредуемый рецепторами эндоцитоз*. Опосредуемый рецепторами эндоцитоз представляет собой концентрирующий механизм, позволяющий клетке захватывать большое количество специфических лигандов без поглощения других веществ. Гормон белковой природы инсулин связывается с рецепторами, диффузно распределенными на поверхности клетки-мишени. После того как молекулы инсулина связались с рецепторами, образовавшиеся комплексы ассоциируют с окаймленными ямками и проникают внутрь клетки. Происходит *интернализация* гормона, которая заключается в том, что многие проникшие внутрь рецепторы инсулина деградируют в лизосомах вместе с инсулином, и в результате концентрация инсулиновых рецепторов на поверхности клетки снижается. Путем интернализации гормон-рецепторного комплекса осуществляется один из путей регуляции уровня гормона во внеклеточной жидкости.

Итак, клетка отделена от внешней среды мембраной, состоящей главным образом из липидов и белков. Организованная в сложную мозаичную структуру, она защищает клетку от вирусов и токсических соединений, позволяет точно регулировать реакции обмена веществ и предотвращает утечку необходимых ионов и метаболитов. Внутреннее пространство клетки также разделено развитой системой цитоплазматических мембран, выполняющих барьерные и каталитические функции.

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

К наиболее важным функциям мембраны относится мембранный транспорт веществ. Поскольку внутренняя часть мембраны гидрофобна, преодолевать её труднее всего гидрофильным соединениям – сахарам и ионам, заряд которых этому препятствует.

Транспорт веществ через биологические мембраны может осуществляться при помощи четырех принципиально разных механизмов:

1. неспецифической диффузии через липидный бислой;
2. облегченной диффузии с участием переносчиков;
3. активного транспорта веществ;
4. специфических механизмов транспорта, сопровождаемых весьма существенным нарушением архитектуры мембран (пиноцитоз, транспорт биополимеров).

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДИФFUЗИЯ

Неспецифическая диффузия представляет собой чисто физический процесс диффузии по градиенту концентрации. Однако скорости, с которыми различные молекулы диффундируют через бислой, очень сильно варьируют в зависимости от размеров молекулы и её относительной растворимости в липидах. Малые неполярные молекулы (кислород, азот, бензол) легко растворяются в липидных бислоях и легко диффундируют через них. Незаряженные полярные молекулы (вода, мочеви́на, этанол, углекислый газ) проходят через бислой быстро, глицерол – медленнее. Большие незаряженные полярные молекулы (глюкоза, сахароза) вообще не способны пройти через бислой.

Скорость диффузии определяется растворимостью вещества в мембране, коэффициентом диффузии для незаряженных молекул. Вода и другие малые молекулы проникают через мембрану благодаря наличию кинков или мембранных дефектов.

ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФФУЗИЯ

Облегченная диффузия с участием переносчиков – это не требующее затрат энергии передвижение молекул через мембранный барьер по градиенту концентрации. В отличие от простой диффузии этот процесс высоко специфичен. Кроме того, скорость этого вида транспорта намного выше, чем можно было бы ожидать исходя из законов обычной диффузии. Такое увеличение скорости достигается присутствием в мембране особых белков-переносчиков. Неспецифическая и облегченная диффузия составляют пассивный транспорт.

Функциональное назначение переносчиков заключается в обеспечении передвижения молекул через липидный бислой мембраны. Соединяясь с транспортируемым веществом, которое само проходить через мембрану не может, переносчик как бы «протаскивает» его сквозь бислой. Необходимые условия транспорта с участием переносчика заключается в следующем: 1) транспортируемое вещество может пересечь мембрану только в комплексе с переносчиком; 2) образовавшийся комплекс должен находиться в динамическом равновесии с несвязанными компонентами.

С помощью переносчиков в клетку транспортируются аминокислоты, сахара, нуклеотиды, органические кислоты. Для каждого конкретного вещества существуют специфические переносчики. Некоторые транспортные белки просто переносят какое-либо растворенное вещество с одной стороны мембраны на другую. Такой простой перенос называется *унипортом*. Другие белки одновременно или последовательно переносят вещества либо в одном (*симпорт*), либо в противоположном (*антипорт*) направлениях. Например, транспорт сахаров внутрь многих бактерий происходит путем направленного в клетку симпорта протонов и молекул сахаров.

Наиболее хорошо изучены переносчики эритроцитов человека. Их мембрана содержит набор разнообразных специализированных транспортных систем, относительное содержание которых однако невелико. Например, количественное содержание переносчика глюкозы в одной клетке составляет 10^5 молекул – это всего 2% мембранных белков эритроцита. И все же эффективность действия этой системы высока. Так как гидрофобный липидный матрикс практически непроницаем для гидрофильной молекулы глюкозы, скорость её прохождения через искусственные липидные бислои незначительна. Переносчик увеличивает скорость процесса в 10^5 – 10^6 раз. Характерная черта переносчика глюкозы – высокая степень специфичности.

Белок осуществляет транслокацию (перенос) через эритроцитарную мембрану только D-глюкозы. Сродство её стереоизомера, L-глюкозы, отличающегося всего лишь пространственным расположением радикалов H^+ и OH^- , к взаимодействию с белком в 2000 раз меньше. Установлено, что переносчик глюкозы – это интегральный белок, пронизывающий мембрану эритроцита и образующий в ней пору (рис. 5). Селективные центры связывания субстрата расположены внутри поры и одинаково доступны как с внешней, так и с цитоплазматической стороны, а углеводный компонент экспонирован наружу. Механизм действия основан на способности белкового комплекса находиться в двух различных конформационных состояниях. В одном из них он селективно связывает глюкозу, а в другом – освобождает её с противоположной стороны мембраны.

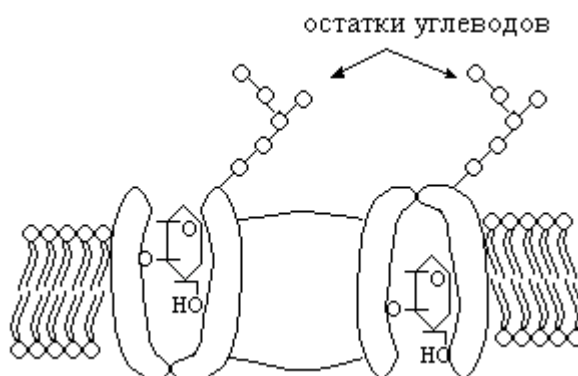


Рис. 5. Модель переносчика глюкозы в мембране эритроцитов

Некоторые транспортные белки, осуществляющие пассивный транспорт, формируют *каналы*, которые позволяют растворимым молекулам, имеющим соответствующие размер и заряд, проходить бислой за счет простой диффузии. Такие белки называются *каналообразующими*. Электрическое возбуждение мембран нервных и мышечных клеток связано с кратковременным увеличением их проницаемости для ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Мембраны этих клеток содержат три отдельные транспортные системы, обеспечивающие этот процесс, и называемые *натриевыми*, *калиевыми* и *кальциевыми* каналами.

Проникновение многих соединений через мембрану может быть индуцировано мембраноактивными веществами *ионофорами*. К ионофорам относятся различные природные и синтетические соединения, содержащие большое количество атомов кислорода. Все они отличаются способностью связывать ионы металлов, образуя с ними липидрастворимые катионные комплексы. Установлено, что ионофор охватывает ион со всех сторон, ион проходит в полость, образуемую

лигандами. При этом все полярные группы находятся внутри, все гидрофобные снаружи. Полость, формируемая молекулой валиномицина, монактина для ионов K^+ , оптимальна только для него.

Специфика комплексообразования: 1) при образовании комплекса иона с переносчиком удаляется гидратная оболочка иона; 2) взаимодействие между лигандами переносчика и ионом должно быть более сильным, чем между ионом и растворителем.

Условно ионофоры можно разделить на две большие группы. К первой из них относятся нейтральные соединения, не содержащие протонов, способные к диссоциации. Поэтому комплексы, образуемые ими с ионами металлов заряжены положительно. В ионофорах второй группы обязательно присутствует карбоксильный остаток, включенный в кальциевую структуру. Наличие или отсутствие этой единственной карбоксильной группы критично для проявления транспортной функции веществ. В зависимости от механизмов взаимодействия ионофоров с мембранами они делятся на вещества-переносчики и вещества-каналоформеры. Классическим примером подвижного мембранного переносчика является антибиотик *валиномицин*. Он обладает высокой антимикробной активностью против различных бактерий, дрожжей и патогенных грибов. Тем не менее применения в медицинской практике валиномицин не нашел из-за высокой токсичности и плохой растворимости в воде. Однако была установлена его необычайно высокая избирательность действия по отношению к ионам калия. Валиномицин обладает уникальной способностью "узнавать" калий среди различных катионов и переносить именно его через мембрану. Причина избирательности валиномицина для калия заключается в его особой пространственной структуре. Молекула его построена из трех идентичных фрагментов, содержащих регулярно чередующиеся остатки D- и L-валина L-молочной и D-изовалериановой кислот (рис. 6).

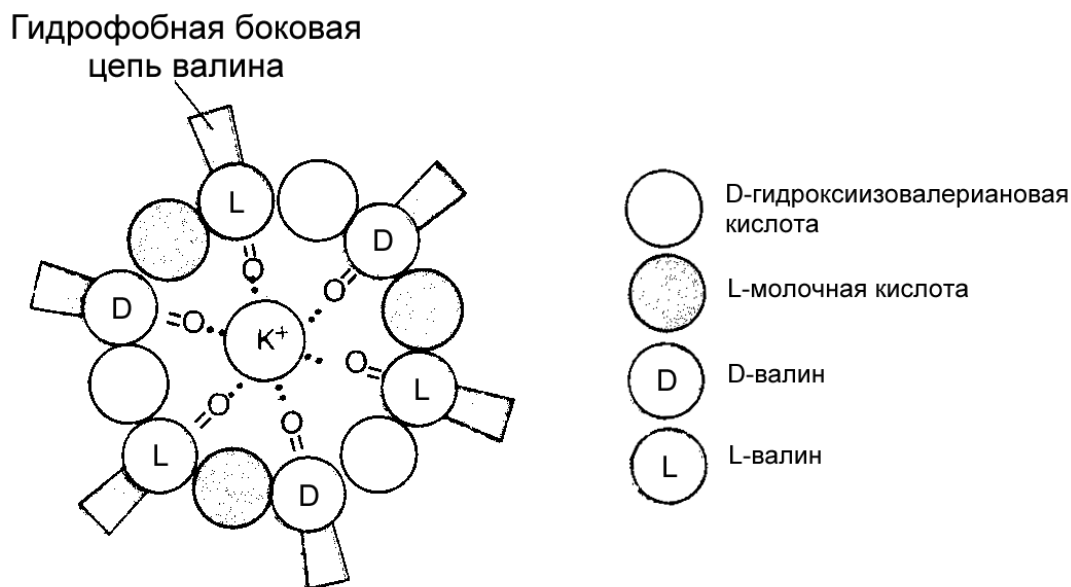


Рис. 6. Молекула валиномицина с ионом K^+

Пространственная организация его определяется образованием внутримолекулярных водородных связей между атомами кислорода карбонильных групп и атомами водорода NH-групп. Наличие водородных связей создает упорядоченную вторичную структуру, в которой молекула приобретает компактную конформацию браслета.

Свободные карбонильные группы направлены ко внешней стороне кольца (структура "все наружу"). При появлении ионов калия карбонильные группы немедленно приобретают ориентацию "все внутрь", образуя внутри браслета полость, обеспечивающую координационное взаимодействие с катионом всех шести карбонильных групп. Наружу оказываются ориентированы углеводородные остатки органических кислот, что придает липофильный характер молекулярной поверхности образуемого комплекса и делает его легко растворимым в гидрофобной мембране. Внутримолекулярные водородные связи придают жесткость полости в браслете, специально приспособленной для ионов калия. Её трудно сжать до размера натрия, взаимодействие всех шести атомов кислорода с ионом натрия энергетически невыгодно. Это и есть причина высокой избирательности ионофора по отношению к ионам калия. Пассивный транспорт ионов калия при помощи валиномицина происходит с большой скоростью: одна молекула его переносит через мембрану 10^3 ионов в секунду. Процесс переноса включает реакцию комплексообразования на границе раздела мембрана – раствор, диффузию через мембрану и освобождение ионов калия с противоположной ее стороны.

К группе каналоформеров относятся антибиотики группы *грамицидина*. Грамицидин проявляет высокий терапевтический эффект при лечении стафилококковых и стрептококковых инфекций, нашел широкое применение в медицинской практике, но сейчас вытесняется другими, более эффективными в этом отношении препаратами. Пространственная структура грамицидина представляет собой β -спиральную конформацию полипептидной цепи с антипараллельным расположением СО- групп пептидной связи, соединенных между собой остатков L- и D-аминокислот. Длина такой спирали составляет половину толщины мембраны. Ее конформация создает возможность для образования димеров по типу "голова к голове". Гидрофобные боковые цепи расположены на внешней поверхности спирализованного димера, образуют липофильную молекулярную поверхность, способную к контакту с углеводородными радикалами липидов. Таким образом, из двух молекул грамицидина формируется трансмембранный ионный канал, пронизывающий бислой насквозь. Считают, что движение ионов натрия (в основном) во внутримолекулярном канале сопровождается локальными изменениями конформации спирали, в ходе которых атомы кислорода карбонильных групп взаимодействуют с проходящим ионом, образуя временные комплексы. Такой канал остается открытым в течение секунды, обеспечивая за это время перемещение 10^7 катионов.

Ещё один пример подвижного переносчика ионов – ионофор A23187, который транспортирует двухвалентные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} . Функционируя, как правило, в условиях низких концентраций ионов, этот ионофор действует как ионообменный "челнок": на каждый двухвалентный катион, вносимый им в клетку он переносит два иона H^+ из клетки. Под действием ионофора A23187 ионы Ca^{2+} поступают в клетку и концентрация этих ионов в цитозоле может существенно возрасти.

Таким образом, транспортные белки формируют сквозные проходы через мембрану и переносимые вещества непосредственно с гидрофобной внутренней частью бислоя не контактируют. Существуют три вида переноса ионов: электродиффузионное движение через гидрофильные поры, карусельный или челночный механизм с помощью подвижного переносчика и эстафетная транслокация. В реальной плазматической мембране эти отдельно рассмотренные механизмы в чистом виде встречаются довольно редко.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН ПРИ МИОТОНИЧЕСКОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

Примером мембранной патологии, связанной с нарушением транспорта ионов, является миотоническая мышечная дистрофия. Миотония – это клинический синдром, характеризующийся отсутствием расслабления мышц после сокращения. Миотония чаще всего связывается с мышечной дистрофией в виде многосистемного заболевания. При этом заболевании метаболические нарушения широко распространены и захватывают многие системы органов. Миотонии сопровождаются катарактой, облысением, костными нарушениями, поражением мускулатуры скелетных и сердечной мышц, центральной нервной системы и снижением содержания γ -глобулинов.

Для доказательства того, что причиной метаболических расстройств у больных миотонической мышечной дистрофией является мембрана клеток, была выделена фракция мембран мышц и получены тени эритроцитов. Установлено, что в тех и других мембранах понижено фосфорилирование белков, которое осуществляет фермент протеинкиназа. (табл. 6).

Таблица 6

Включение ^{32}P (пмоль/кг белка) в мембраны миоцитов и эритроцитов у больных миотонической мышечной дистрофией

	Тени эритроцитов	Мембраны мышц
Норма	17,5	15,9
Миотония	8,7	10,0

Такое значительное снижение активности протеинкиназы на 30–50% в миотонических мембранах было довольно специфическим, поскольку активность аденилатциклазы, $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазы}$ были одинаковыми в контрольных и миотонических препаратах. Одним из существенных моментов, влияющих на снижение фосфорилирования в эритроцитах больных миотонической мышечной дистрофией является нарушение транспорта K^+ , которое происходит под действием Ca^{2+} . Утечка K^+ , стимулированная кальцием, осуществляется через Ca^{2+} зависимые калиевые каналы, на долю которых приходится 35% выходящего из эритроцитов K^+ . В действии кальция на каналы существенную роль играет кальмодулин.

Для проверки специфичности обнаруженных явлений в мембране были проведены исследования с эритроцитами больных миотонией по сравнению с эритроцитами больных с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна (ПМД) как модели дистрофии без миотонии (табл. 7).

Было показано, что исходно концентрация K^+ была идентична в клетках всех трех групп пациентов. Утечка K^+ , в отсутствие Ca^{2+} составляла 4–5 мкМ и также не отличалась в этих группах. После введения Ca^{2+} в эритроцитах больных миотонической мышечной дистрофией утечка калия была на 50% меньше, а у больных ПМД – на 30% больше, чем в контроле.

Таблица 7

Транспорт K^+ в эритроцитах больных миотонической дистрофией и дистрофией Дюшенна

	Концентрация K^+ (ммоль/л клеточной массы)	Утечка K^+ (мкмоль/л)	Утечка K^+ , вызванная Ca^{2+}
Контроль	90,0	4,2	35,4
Миотоническая дистрофия	89,2	4,7	19,4
Дистрофия Дюшенна	92,0	5,0	52,0

Таким образом, миотония, которая клинически проявляется как ненормально устойчивое сокращение поперечно-полосатой мышцы, на клеточном уровне является наследственным мембранным заболеванием с нарушением фосфорилирования белка и транспорта K^+ , индуцированного Ca^{2+} . Миотоническая мышечная дистрофия наследуется по аутосомно-доминантному типу.

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

В отличие от пассивного транспорта, который может идти по градиенту концентрации, системы активного транспорта осуществляют перенос против концентрационного и электрохимического градиента (рис. 7).

Такое движение обязательно должно быть связано с источником энергии. Чаще всего в качестве источника энергии используется гидролиз АТФ, осуществляемый ферментативным путем. Способность мембран к активному транспорту была названа ионным насосом. Насос в отличие от переносчика представляет молекулярный комплекс, к которому сопрячен и переносчик, но в котором участвуют, кроме того, энергодающие и регуляторные системы. Благодаря механизму активного транспорта клетки способны концентрировать ионы K^+ , Mg^{2+} и выкачивать из клетки Na^+ и Ca^{2+} (табл. 8).

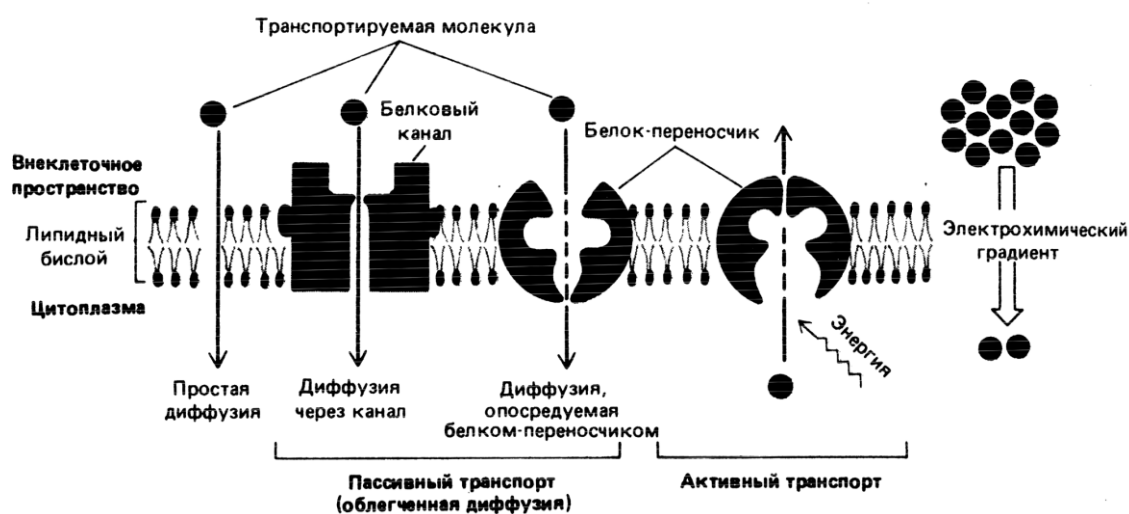


Рис. 7. Пассивный и активный транспорт молекул

Ионные насосы широко распространены в различных по специализации мембранах. Они аккумулируют или выделяют ионы в направлении, противоположном их электрохимическим градиентам, и одновременно являются ферментами АТФазы, осуществляющими гидролиз АТФ. Основная функция АТФаз – не просто катализ реакции гидролиза, а использование высвобождающейся в этом процессе энергии для транслокации ионов.

**Содержание ионов (ммоль/л) в плазме крови человека
и в клетках скелетной мышцы**

Ион	Плазма крови	Скелетная мышца
Na^+	150	14
K^+	5	150
Mg^{2+}	0,9	8
Ca^{2+}	2,5	1
HPO_4^-	6	146

Транспортные АТФазы можно разделить на два больших класса:

1. протонные насосы – H^+ -АТФазы;
2. $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы.

Протонные АТФазы отличаются сложной субъединичной структурой и при физиологических условиях могут работать как в прямом, так и в обратном направлении реакции, не только действуя как АТФ–зависимый протонный насос, но и синтезируя АТФ при использовании электрохимического протонного градиента. $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза устроены более просто и при физиологических условиях функционируют только в направлении гидролиза АТФ, действуя как ионные насосы. Для молекулярного механизма реакций, катализируемых АТФазами второго типа, обязательны стадии фосфорилирования и дефосфорилирования, сопряженные со структурными переходами белка. Большинство ионных насосов электрогенны, они переносят не только частицу, но и электрический заряд через мембрану, создавая таким образом мембранный потенциал.

$(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -насос плазматических мембран работает по принципу антипорта, качая Na^+ из клетки, а K^+ – внутрь клетки. Он был открыт в результате работ, посвященных передаче возбуждения вдоль аксона нервной клетки. При возбуждении мембрана становится проницаемой на несколько миллисекунд для ионов Na^+ . Они проникают в клетку, изменяя тем самым мембранный потенциал. Непосредственно после своего поступления в клетку, они вновь выкачиваются из неё, что сопровождается расходом энергии, одновременно в клетку транспортируются ионы K^+ . Градиенты концентраций ионов Na^+ и K^+ , поддерживаемые натриево-калиевым насосом, ответственны не только за мембранный потенциал клетки, но и за

регуляцию клеточного объема, а также за активный транспорт сахаров и аминокислот. Это связано с тем, что осмотическое давление, которое вызывает разбухание или сжатие клетки, осуществляется за счет заряженных макромолекул. Макромолекулы всегда существуют в окружении ионов, в том числе K^+ , которые усиливают осмотическое давление. Давление на внутреннюю поверхность мембраны уравнивается осмотическим давлением внеклеточной жидкости (главным образом, ионами Na^+ и Cl^-). Na^+ и Cl^- имеют тенденцию проникать в клетку по градиентам их концентраций. При этом равновесие между внешним и внутренним давлением нарушается и клетка разбухает. (Na^+, K^+) -АТФаза выкачивает из клетки проникшие в неё ионы Na^+ и в то же время противодействует просачиванию внутрь ионов Cl^- , поддерживая в клетке отрицательный потенциал, нейтрализующий эффект градиента концентрации Cl^- . Важная роль (Na^+, K^+) -АТФазы в регуляции клеточного объема подтверждается тем фактом, что при обработке клеток *убаином*, ингибирующим (Na^+, K^+) -АТФазу, они набухают и разрываются.

Типичный для нормальных физиологических условий режим работы натрий – калиевого насоса – 3:2:1, т.е. при распаде одной молекулы АТФ из клетки выкачиваются 3 иона Na^+ , а извне в клетку накачивается 2 иона K^+ . Поскольку из клетки выкачивается больше положительно заряженных ионов, чем попадает в неё, внутри клетки создается избыточный отрицательный заряд (избыточный электрохимический потенциал). Как и для всех реакций, протекающих с расщеплением АТФ, для работы Na^+, K^+ – насоса требуются ионы Mg^{2+} . Высокое содержание ионов Ca^{2+} в клетке блокирует Na^+, K^+ – насос, он снова вступает в действие как только в клетке устраняется избыток Ca^{2+} .

В настоящее время элементарная функциональная единица транспортной системы Na^+, K^+ выделена в виде белково–липидного комплекса, содержащего две субъединицы: $\alpha \approx 100000$ (большой) и $\beta \approx 45000$, около 90 молей холестерина и фосфолипидов. Во многих препаратах фермента обнаружена ещё одна γ -субъединица, (≈ 10000). α -субъединица является каталитической, проявляет гидролитическую активность, β -субъединица не способна катализировать гидролиз АТФ, но необходима для насосной функции белка. Как правило в каждом из элементарных комплексов содержится 2–4 набора субъединиц. Система работает со скоростями $10^2 - 10^5$ циклов в минуту, в зависимости от объекта. На поверхности эритроцита человека находится 400–600 помповых единиц.

В мембране молекула АТФазы ориентирована таким образом, что ионсвязывающие центры на внешней поверхности клетки обладают сродством к ионам калия, а на внутренней к ионам натрия. (рис. 8). Гидролитический центр расположен на цитоплазматической стороне мембраны, и субстратом для фермента служит только внутриклеточный АТФ. Долгое время было непонятно как именно гидролиз АТФ связан с транспортом ионов. Исследования показали, что концевая фосфатная группа АТФ в присутствии Na^+ переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле АТФазы, происходит конформационный переход.

Связавшаяся с АТФазой фосфатная группа затем гидролизуется в присутствии K^+ и происходит переход в исходную конформацию, характерную для связывания Na^+ .

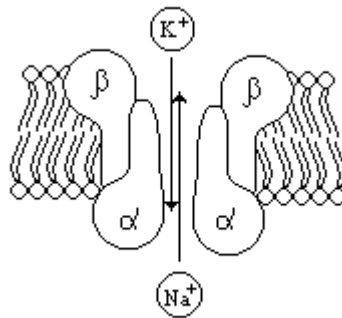


Рис. 8. Расположение Na^+ , K^+ – АТФазы в мембране

Итак, предполагается, что белки ионного насоса находятся в двух конформациях. В одной конформации (А) белок связывает 3 иона Na^+ , а в другой (В) – 2 иона K^+ . В центре между двумя α -субъединицами имеется узкая щель в которую выступают хелатообразующие группы (например, CO -группы пептидной цепи). Открывание и закрывание канала на противоположных сторонах мембраны и чередующееся изменение эффективности связывания Na^+ и K^+ обеспечивается энергией гидролиза АТФ.

(Na^+ , K^+)-АТФаза связана с плазматической мембраной и широко распространена у животных, растений, в клетках простейших. Оптимум рН составляет $\approx 7,5$; все АТФазы ингибируются различными гликозидами, самый распространенный из них – убаин, подавляет активность фермента на 50 % в концентрациях 10^{-7} – 10^{-4} М. Убаин, также как растительный препарат дигитоксин, относятся к кардиотоническим стероидам. Кардиотонические стероиды ингибируют реакцию дефосфорилирования (Na^+ , K^+)-АТФазы. Ингибирование происходит

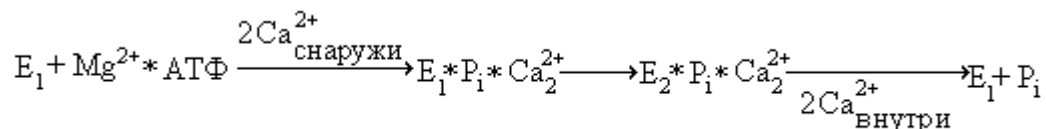
только в том случае, если кардиотонические стероиды локализованы на внешней стороне мембраны. Таким образом, подавление дефосфорилирования этими стероидами также асимметрично, как и активация дефосфорилирования ионами калия. Медикам давно известно, что при отравлении дигитонином (алкалоид наперстянки) больного можно излечить или ослабить его действие с помощью ионов K^+ . Кардиотонические стероиды связываются с (Na^+, K^+) -АТФазой по конкурентному типу и избыток субстрата (K^+) устраняет эффект ингибитора.

Использование *дигитонина* в качестве средства лечения острой сердечной недостаточности основано на том, что в клетках сердечной мышцы повышается содержание Na^+ . Это сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что в свою очередь повышает сократительную активность миокарда.

Для жизнедеятельности клетки большое значение имеет ещё одна система активного транспорта – *кальцевый насос*. Благодаря ему клетка обеспечивает строгий контроль за концентрацией ионов кальция. Малейшие изменения здесь являются пусковым механизмом для многих жизненно важных процессов: мышечного сокращения и расслабления, секреции, клеточного деления, межклеточных взаимодействий и др. Аналогично натриевому насосу, кальцевый – выполняет также функции фермента Ca^{2+} -АТФазы, катализируя гидролиз АТФ. В зависимости от выполняемой работы существует два типа кальцевых насосов: Ca^{2+} -АТФаза плазматических мембран, ответственная за выброс Ca^{2+} из клетки во внешнюю среду, и насос внутриклеточных мембран, обеспечивающий накопление этого иона во внутриклеточных депо.

Специализированная функция мембран саркоплазматической сети мышечной клетки заключается в активном транспорте ионов кальция для обеспечения регуляции цикла "сокращение – расслабление" мышцы. Система саркоплазматического ретикулума – это специальное депо, накапливающее ионы кальция в состоянии покоя мышцы благодаря активности кальцевого насоса. Его работой создается высокий градиент ионов кальция. Концентрация этого иона составляет 10^{-3} М внутри цистерн и всего лишь 10^{-7} М в цитоплазме клетки. В состоянии покоя Ca^{2+} всасывается в саркоплазматический ретикулум при участии Ca^{2+} -АТФазы, так что непосредственно вокруг миофибрилл концентрация Ca^{2+} бывает очень низкой. Ca^{2+} -АТФаза является составной частью Ca^{2+} -насоса подобно тому, как (Na^+, K^+) -АТФаза – часть (Na^+, K^+) -насоса. При высокой концентрации Ca^{2+}

в среде внутрь переносится 2 моля Ca^{2+} на один моль АТФ. Ca^{2+} -АТФаза также подвергается фосфорилированию в ходе гидролиза АТФ:



Цикл конформационных изменений, обусловленных фосфорилированием и дефосфорилированием, обеспечивает перенос двух ионов Ca^{2+} при расщеплении одной молекулы АТФ.

По современным представлениям кальциевый насос мембран саркоплазматической сети состоит из нескольких структурных областей, включает фосфолипиды, большую и малую субъединицы. В этом комплексе содержатся два кальций-селективных и один АТФ-связывающий центры. Большая субъединица (100 кДа) Ca^{2+} -насоса пронизывает мембрану и содержит участок фосфорилирования, представленный остатком аспартата. Малая субъединица 55 кДа представлена гликопротеином, связана с большой субъединицей, контролирует вход ионов в канал. Ингибиторами Ca^{2+} -АТФазы являются рутениевый красный, ванадат, SH-реагенты, но не убаин. Для активизации работы Ca^{2+} -АТФазы необходимы ионы Mg^{2+} .

Большой интерес представляют системы симпорта, совместного переноса веществ. По механизму сопряжения потоков в клетку поступают сахара, аминокислоты, витамины катионы и анионы.

Натрий-зависимое накопление глюкозы. Особенность белковой молекулы переносчика заключается в формировании на её поверхности двух различных центров связывания: для ионов натрия и для глюкозы. Ион натрия присоединяется к переносчику на внешней стороне мембраны, индуцируя при этом возникновение такой структуры белка, в которой конфигурация центра связывания субстрата соответствует пространственному строению этой молекулы, что во много раз увеличивает скорость взаимодействия. При присоединении иного иона, например, калия конформация переносчика изменена таким образом, что сродство молекулы белка к глюкозе минимально. Поэтому перенос возможен только в случае ассоциации иона натрия с транспортным белком. Образовавшийся тройной комплекс: ион натрия-белок-глюкоза пересекает бислой по направлению разности потенциалов на мембране. Так как на внутренней поверхности концентрация натрия низкая, он легко оставляет белок и комплекс диссоциирует с освобождением

глюкозы. Попавшие в клетку ионы натрия выбрасываются наружу натриевым насосом. Экспериментальными данными установлено, что энергии, накопленной градиентом натрия, достаточно для обеспечения переноса органического вещества – глюкозы (рис. 9)

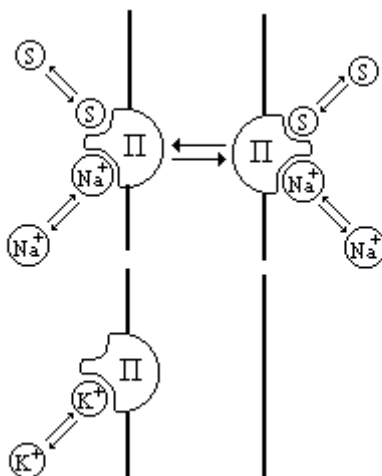
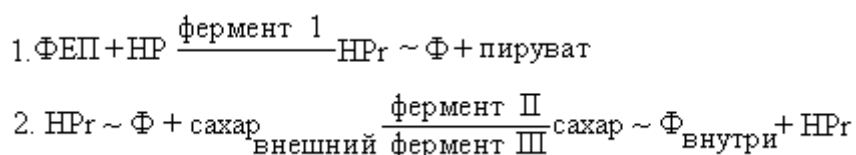


Рис. 9. Na^+ -зависимый перенос глюкозы
 П – переносчик
 S – глюкоза

Интересен перенос веществ в клетках микроорганизмов. Для них характерно большое разнообразие транспортных систем. Так называемые *пермеазы* переносят через мембрану субстрат или аналоги субстрата этого фермента. Для жизнедеятельности бактериальной клетки наиболее важное значение имеют пермеазы, обеспечивающие перенос во внешнюю среду. Пермеазными системами используются два различных источника энергии.

1. В пермеазных системах первого типа перенос углеводов в клетку является векторным и осуществляется фосфотрансферазной системой. Она включает группу растворимых и мембранно-связанных белков, в которой переносчики сахаров объединены с общими компонентами ферментативной системы. Особенность транспорта этого типа, называемого транслокацией группы, состоит в том, что в ходе транспорта происходит модификация растворенного вещества. Донором фосфорильной группы служит фосфоенолпируват (ФЕП). В транспорте принимают участие четыре белка, и суммарная реакция выглядит так:



где фермент I и HPr – постоянные компоненты, общие для всех субстратов, фосфорилируемых этой системой, в то время как ферменты II и III сахароспецифичны. Данная пара белков связывает и переносит только определенный вид молекул. Первый этап проходит в цитоплазме клетки, второй – на мембране. Фермент II является интегральным компонентом мембраны и, по-видимому, образует трансмембранный канал.

2. В пермеазных системах второго типа перенос метаболитов сопряжен с потоком протонов и использованием энергии их электрохимического градиента. Совместным транспортом с протоном через бактериальную мембрану проходят глицин, пролин, серин, лактоза и др. В этом случае система транслокации представлена только одним белком.

Наиболее изученной является бактериальная система симпорта лактозы у *E.coli*. Насос для этого дисахарида представляет собой одну полипептидную цепь массой 30 кДа и называется пермеазой для лактозы, (или M-белком). Это интегральный мембранный белок, который кодируется геном *u*, входящим в *lac*-оперон. На его долю приходится около 4 % белков мембраны. Транспорт молекул лактозы у кишечной палочки сопряжен с движением протона в клетку. При физиологических условиях протонный градиент, необходимый для этого активного транспорта, возникает за счет потока электронов от донора, обладающего высоким потенциалом (например, NADH) по дыхательной цепи.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ИХ РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ

Одним из свойств плазматической мембраны клетки является её асимметричность. Это связано с тем, что наружный и внутренний монослои различаются как по липидному составу, так и по белковому. Ещё более выраженная асимметрия наблюдается в распределении углеводов: олигосахаридные боковые цепи гликолипидов и гликопротеинов локализованы исключительно на той стороне мембраны, которая не контактирует с цитоплазмой. Поверхностные гликопротеины, гликолипиды и гликозамингликаны формируют *гликокаликс* или поверхностный матрикс клетки (рис. 10). В мембранах гликозилировано около 10% всех белков и от 5 до 26% липидов, в зависимости от объекта. Углеводные цепи белков колеблются по составу от двухзвенных структур до разветвленных 18-членных полисахаридов. Наиболее часто в мембранных гликопротеинах и гликолипидах встречаются галактоза, манноза, фукоза, галактозамин, глюкозамин, глюкоза и сиаловая кислота.

Остатки сиаловой кислоты находятся обычно на концах углеводных боковых цепей, и в основном, именно они ответственны за общий отрицательный заряд клеточной поверхности, характерный для всех эукариотических клеток.

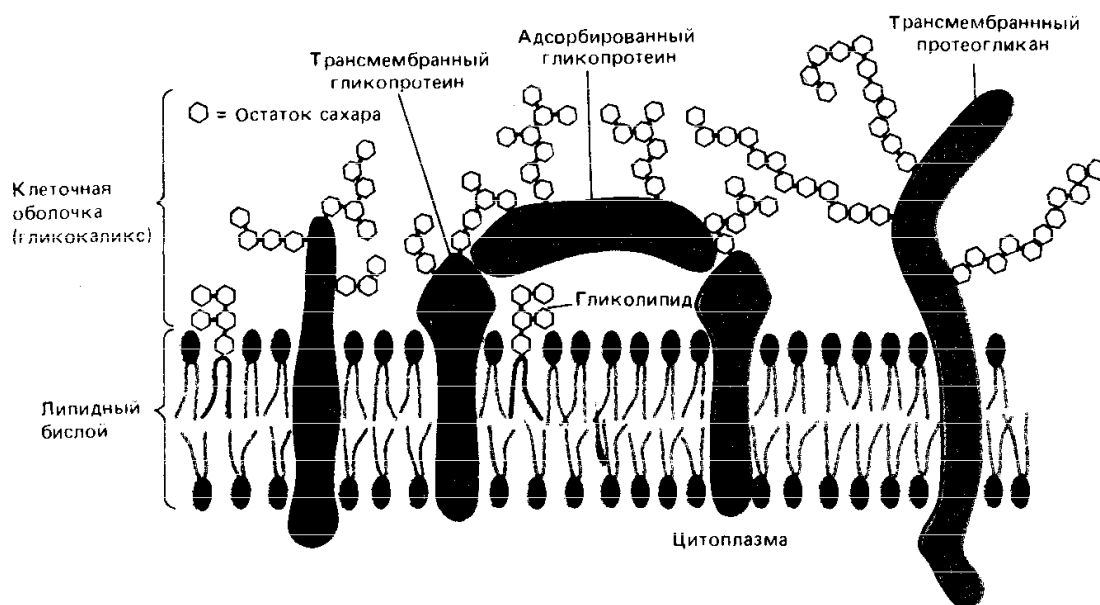


Рис. 10. Схематическое изображение гликокаликса

Сложность некоторых олигосахаридов, входящих в состав гликопротеинов и гликолипидов плазматической мембраны, а также то, что углеводы располагаются только на поверхности клеток, свидетельствует о важной роли углеводов поверхностного матрикса. Углеводы являются участками иммобилизации мембранных белков, способствуют ориентации, транспорту и стабильности белковых молекул в мембране, определяют заряд поверхности, их функции связаны с контролем за межклеточными взаимодействиями.

Клетки, непосредственно соприкасающиеся с соседними клетками, часто бывают связаны с ними так называемыми межклеточными контактами. Межклеточные контакты разделяют на три функциональные категории:

- 1) адгезионные контакты, которые механически скрепляют клетки (десмосомы);
- 2) замыкающие контакты, которые не только механически связывают клетки, но и делают невозможным прохождение между ними молекул (плотные и септированные контакты);
- 3) проводящие контакты, которые пропускают малые молекулы из одной клетки в другую (щелевые контакты и химические синапсы).

Наиболее распространены в тканях животных и человека *щелевые контакты*. Они позволяют небольшим водорастворимым молекулам непосредственно переходить из цитоплазмы одной клетки в другую, обеспечивая таким образом электрическое и метаболическое сопряжение клеток. Щелевые контакты располагаются кластерами в определенных участках плазматических мембран прилегающих друг к другу клеток. По щелевым соединениям из одной клетки в другую могут поступать все полярные вещества массой до 1 кДа: неорганические ионы и большинство метаболитов (сахара, аминокислоты, нуклеотиды). Белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды не проходят по этим каналам из-за своих больших размеров.

Щелевые соединения играют важную роль в межклеточной коммуникации. Так, например, в сердечной мышце клетки объединены в единую систему быстрым потоком ионов через эти соединения: таким путем достигается быстрый и синхронный ответ на стимуляцию. Через щелевые контакты происходит питание клеток, удаленных от кровеносных сосудов, например, в костях или хрусталике глаза.

Проницаемость щелевых контактов регулируется ионами кальция. Повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} приводит к тому, что щелевой контакт закрывается. Межклеточные каналы полностью открыты при концентрациях Ca^{2+} ниже 10^{-7} М и полностью закрываются при концентрации Ca^{2+} превышающей $5 \cdot 10^{-5}$ М. Увеличение содержания Ca^{2+} в указанном диапазоне приводит к сужению просвета межклеточных каналов и снижению проницаемости для более крупных молекул. Ионный контроль межклеточного контакта, вероятно, играет решающую роль при гибели или повреждении клетки, когда необходимо, чтобы она быстро отсоединилась от своих соседей. Полагают, что это происходит в результате сильного повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция, которые либо входят в клетку через поврежденную плазматическую мембрану, либо накапливаются из-за того, что поврежденная клетка уже не способна эффективно откачивать Ca^{2+} из цитозоля.

Большинство клеток различных тканей контактируют со сложной сетью *внеклеточного матрикса*. Матрикс не только скрепляет клетки в тканях и ткани в органах, но и влияет на развитие, полярность и поведение соприкасающихся с ним клеток. В образовании матрикса участвуют два основных класса макромолекул:

- 1) коллагены, фибриллярные белки, образующие коллагеновые волокна;

2) гликозамингликаны, обычно связанные с белком в протеогликаны.

Молекулы гликозамингликанов и протеогликанов образуют сильно гидратированный гель "основного вещества", в который погружены коллагеновые волокна. Эти длинные волокна укрепляют и упорядочивают матрикс, а водная фаза полисахаридного геля обеспечивает диффузию питательных веществ, метаболитов и гормонов между кровью и клетками ткани. Во многих случаях в матриксе имеются также волокна белка эластина, придающие ему упругость. Кроме того, к основным компонентам внеклеточного матрикса относятся два высокомолекулярных гликопротеина: фибронектин и ламинин.

Фибронектин представляет собой высокомолекулярный гликопротеин, который состоит из двух субъединиц с м. м. 220 кДа каждая. Около 5% массы составляет углеводный компонент. Фибронектин образует на поверхности многих клеток фибриллярные структуры. Предполагают, что основная функция фибронектина – обеспечение адгезии клеток между собой. При злокачественном перерождении клеток часто наблюдают снижение концентрации фибронектина, что происходит наряду с уменьшением адгезивности и ростом способности к метастазированию опухолевых клеток. При добавлении к культуре трансформированных клеток, синтезирующих сравнительно мало фибронектина, большого количеству этого белка, клетки восстанавливают адгезивность, но по-прежнему бесконтрольно размножаются как опухолевые клетки. Вероятно, фибронектин способствует клеточной адгезии, но непосредственно не контролирует пролиферацию клеток.

Важным гликопротеином базальных мембран (подстилающих эпителиальные клетки, мышечные волокна, жировые клетки и отделяющих их от соединительной ткани) является гликопротеин *ламнин*, состоящий из двух субъединиц (м.м. 220 и 440 кДа). Молекулярная организация базальных мембран детально не изучена, однако известно, что ламинин и протеогликаны сосредоточены у внутренней и наружной поверхностей мембраны, а молекулы коллагена находятся в её среднем слое.

Коллагены представляют семейство фибриллярных белков соединительной ткани, характерная особенность молекул коллагена – их жесткая трехцепочечная спиральная структура, скрученная наподобие каната. Имеется несколько коллагенов, наиболее изучены типы I, II, III, встречающиеся в соединительной ткани. После того, как молекулы этих трех типов коллагена переходят из клеток в межклеточное

пространство, они организуются в упорядоченные полимеры, называемые коллагеновыми фибриллами. Молекулы коллагена типа IY встречаются только в базальной мембране. В месте образования фибрилл они организуются в плоскую сеть.

Разрушение коллагена IY в базальной мембране имеет решающее значение в распространении опухолей. Механизм *опухолевой инвазии* представляет собой трехступенчатый процесс: 1) взаимодействие опухолевой клетки с поверхностными ламининами, фибронектином; 2) секреция гидролитических ферментов и локальное нарушение внеклеточного матрикса; 3) движение опухолевых клеток по модифицированному протеолизом матриксу. Ферменты, участвующие в разрушении коллагенов I и IY, являются наиболее активными участниками процесса инвазии. Коллагеназы I и IY усиливают миграцию опухолевых клеток. Увеличение активности коллагеназы IY типа наиболее выражено при высокозлокачественных опухолях. Этот фермент является маркером опухолей.

Полагают, что все белки и полисахариды матрикса могут взаимодействовать, образуя множество различных пространственных структур. Тип структуры матрикса влияет на ориентацию заключенных в нем клеток.

Адгезивность является важным свойством мембран, связанным с функциями гликопротеинов. Для изучения адгезивности известен специальный метод с использованием лектинов. *Лектины* – это белки неиммунного происхождения, способные преципитировать гликопротеины и вызывать агглютинацию клеток. Наиболее хорошо изучены растительные лектины: фитогемагглютинин (ФГА, из семян фасоли), конканавалин А (КонА, из канавалии мечевидной), рицин (из семян клещевины). Лектины способны специфически связывать углеводные группы на поверхности клеток. Так, КонА связывается с D-глюкозой и D-маннозой, рицин с D-галактозой и N-ацетилгалактозамином.

Имеются сведения о том, что негликозилированные белки или частично гликозилированные (с укороченными олигосахаридными остатками) быстрее подвергаются протеолизу. Очень ярким примером подобной патологии является недостаточность α_1 -антитрипсина. Синтез этого ингибитора протеолиза происходит в печени. Его недостаточность в крови обнаружена при эмфиземе легких, связана она с тем, что образуются недостроенные олигоманнозидные цепи гликопротеиновой молекулы α_1 -антитрипсина, количество которых снижается в результате их протеолиза. При недостаточности ингибитора усиливается

расщепление структур соединительной ткани под влиянием трипсина, причем особенно поражается ткань легких, где прежде всего разрушаются межальвеолярные перегородки. В легких, вместо отдельных альвеол, образуются обширные полости, способность которых к обмену O_2 и CO_2 снижена по причине малой площади поверхности (по сравнению с общей площадью поверхности отдельных альвеол). Развивается эмфизема, в том числе и у молодых людей.

Некоторые лектины вызывают избирательную агглютинацию злокачественных клеток. Это указывает на различия в структуре поверхностей опухолевых и нормальных клеток. Линии клеток лимфомы, резистентных к КонА, представляют собой пример такого избирательного взаимодействия лектина и опухолевой клетки. На поверхности этих клеток отсутствует антиген Thy-I, хотя другие гликопротеиновые антигены обнаруживаются в обычном количестве.

Интерес к опухолевым антигенам, имеющих гликопротеиновое происхождение, возрос с открытием так называемых *онкобелков*. Известно, что в зоне злокачественного перерождения идут как процессы исчезновения некоторых, ранее присутствовавших поверхностных антигенов, так и возникают новые антигены. Появление новых онкобелков происходит в результате экспрессии генетической информации, содержащейся в перерожденной клетке. В нормальных условиях онкобелки функционируют на ранних стадиях эмбриогенеза. Они реализуют программу нормального развития, участвуя в регуляции пролиферации. В процессе онтогенеза они перестают функционировать, однако под действием канцерогенных факторов гены амплифицируются. Протоонкогены превращаются в онкогены. Активация протоонкогенов может происходить под влиянием вирусов. Было показано, что стимуляция процессов пролиферации, связанных с регенерацией печени после гепатэктомии, приводит к последовательному включению протоонкогенов *fos*, *myc*, *myb*, *ras* через 1 минуту после операции. После деления протоонкогены выключаются. В опухолевых клетках они не выключаются. Следует отметить онкогены, участвующие в продукции мембранных онкобелков: *sis* – поверхностный мембранный белок; *erb B* – белок, пронизывающий мембрану насквозь; *sac* и *ras* – находятся на внутренней поверхности мембраны.

Из типично опухолевых антигенов, освобождающихся от поверхности клеток и выходящих в кровь, для целей диагностики используется α -фетопротеин и канцероэмбриональный антиген.

α-Фетопротеин – гликопротеин, образующийся в печени зародыша. Его молекулярная масса 70 кДа, содержание углеводов – 4%. Изоэлектрическая точка (pI 4,6) близка к таковой альбумина, от которого его очень трудно дифференцировать (в том числе из-за генетической близости обеих молекул). После рождения ребенка его синтез прекращается и содержание в крови находится на крайне низких значениях, которые могут быть установлены только с помощью чувствительных радиоиммунных методов. Его используют для диагностики первичного рака печени и тератом различной природы.

Канцероэмбриональный антиген обычно получают из метастазов в печень колоректальной карциномы. Это гликопротеин (180–200 кДа), содержащий 50–60% углеводов. Он состоит из одной полипептидной цепи, с которой связано 90 углеводных остатков, из 10 моносахаридов каждый. В физиологических условиях раковоэмбриональный антиген возникает в клетках слизистой пищеварительного тракта и с их поверхности выделяется в просвет кишечника. В крови он определяется иммунохимически, в среднем его концентрация 2,5 нг/л. Кроме типичных случаев злокачественных опухолей (толстого кишечника, прямой кишки, поджелудочной железы, печени и бронхов) его концентрация может увеличиваться при циррозе печени и обструкции желчевыносящих путей, а также при всех состояниях, сопровождающихся повышенной секрецией слизи (хронический бронхит, кистозный фиброз, курение). Очевидно, что определение канцероэмбрионального антигена в крови для диагностики опухолей не является специфическим тестом. Контроль за его концентрацией более эффективен для оценки действенности терапии. После удаления опухоли его концентрация в крови резко снижается, а в случае дальнейшего развития процесса или образования метастазов она резко увеличивается в период, когда ещё отсутствуют другие признаки.

Ещё одним ярким примером значения межклеточных взаимодействий является проявление врожденных болезней мозга у мышей при *reeler-мутации*. Роль клеточной мембраны в развитии и функционировании нервной системы известна в основном только для синапсов. Свойства и геометрия поверхностных компонентов очень важны также при взаимодействии нейронов между собой и с клетками глии. При *reeler-мутации* межклеточные взаимодействия могут маскировать генетический дефект. *Reeler-мутация* мышей (*reel* – качаться, кружиться) проявляется как атаксия и передается по аутосомно-рецессивному типу. Обусловлено это тем, что нейроны,

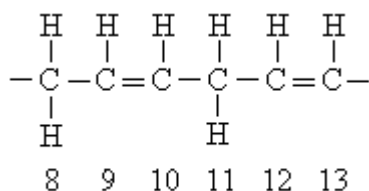
которые обычно находятся глубоко в коре мозга, расположены у мутантных мышей на поверхности, и наоборот поверхностные нейроны лежат глубоко в коре.

С помощью одного из методов биологии развития – синтеза экспериментальных химер гомозиготных и нормальных зародышей, были получены мыши, характеризующиеся поведением либо *reeler*, либо нормальных мышей, но не средним между ними, т.е. наблюдалось отсутствие проявления фенотипа у гетерозиготных особей. Было показано, что у химер все-таки имеются как *reeler* зоны, так и зоны доминантного типа в коре мозга. Дело здесь заключается в правильных межклеточных контактах. Клетки коры у химер не проявляют ожидаемого фенотипа потому, что несмотря на аномальное расположение в коре формируются нормальные синапсы, т.е. афферентные аксоны распознают только свои нейроны-мишени, несмотря на явно неправильный адрес. Таким образом, было доказано, что формирование межклеточных контактов может маскировать проявление генной мутации.

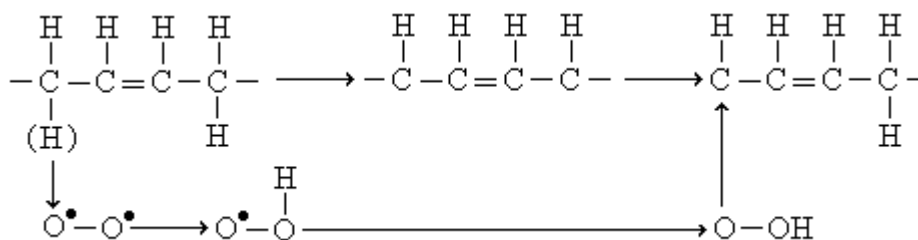
Глава 4. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Изучение структуры и функции мембран в норме и при патологии существенно расширяет наши представления о механизмах возникновения и развития патологических процессов на уровне клетки и целого организма. Одним из мощных факторов, повреждающих клеточные мембраны, является образование свободных радикалов, вызывающих в клетке неконтролируемые реакции. В небольших количествах свободные радикалы всегда присутствуют в клетке. Однако при воздействии ультрафиолетового или ионизирующих излучений, количество свободных радикалов в клетке существенно возрастает. Наиболее интенсивно свободные радикалы образуются при аутоокислении ненасыщенных жирных кислот в процессе перекисного окисления липидов (ПОЛ). Перекисное окисление липидов является альтернативным процессу биологического окисления. При биологическом окислении кислород присоединяется к атомам водорода лишь в заключительной цепи реакций, происходящих в митохондриях. Как промежуточные, так и конечные продукты биологического окисления, не токсичны. При перекисном окислении образуются продукты аутоокисления: свободные радикалы, перекиси, альдегиды, обладающие чрезвычайной токсичностью для клетки.

Особенно подвержены перекисному окислению ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран. Атом водорода, расположенный у них рядом с двойной связью, очень непрочен связан с соответствующим атомом углерода. Такой атом углерода называют α -метиленовым, а его водород – аллильным. Например, в линолевой кислоте, имеющей две двойные связи, α -метиленовыми будут атомы углерода в 8 и 11 положениях.



Аллильный водород очень быстро переходит к окислителю, в результате чего возникает алкильный радикал, который затем превращается в гидроперекись:




Таким образом, гидроперокси – группа присоединяется к α -метиленовому углероду жирных кислот. Это и вызывает цепочку реакций, изменяющих структуру, а затем и функции мембран.

Свободный радикал может образоваться при отщеплении от молекулы одного атома или группы атомов. У молекулы появляется неспаренный электрон на внешней (валентной) атомной орбите. Наличие неспаренного электрона обуславливает высокую активность свободного радикала, который, вступая в химические реакции, приобретает недостающий электрон. Свободный радикал с одним неспаренным электроном называется монорадикалом, а с двумя – бирадикалом. Радикал может нести избыточный электрический заряд, и тогда его называют ион-радикалом. В основном, свободные радикалы являются неустойчивыми, они могут существовать сотые доли секунды (метил-, гидроксил-радикалы), есть относительно устойчивые радикалы, для которых характерно наличие в составе молекулы ароматических колец. Нестабильность радикалов обусловлена: 1) их высокой способностью к рекомбинации друг с другом; 2) их большой реакционной способностью по отношению к многим нейтральным молекулам. При этом протекают химические реакции замещения, рекомбинации, присоединения, полимеризации и др.

В биологических системах можно выделить несколько типов свободных радикалов. Одни из них образуются в качестве нормальных продуктов обмена веществ, например, образование эндоперекисей при аутоокислении холестерина. Другие возникают при измененных условиях жизнедеятельности, к ним относятся свободные радикалы воды и органических молекул, образующиеся при действии на клетку ионизирующих излучений, различных токсических веществ.

Комиссия по номенклатуре радикалов в 1990 г предложила следующие названия радикалов:

O_2^{\bullet}	$[^{\bullet}OO]$	– синглетный кислород
O_2	$[^{\bullet}OO^{\bullet}]$	– диоксиген
$O_2^{\bullet-}$	$[^{\bullet}OO^-]$	– диоксид (супероксид)
O_3		– триоксиген
H^{\bullet}		– алкил
HO^{\bullet}		– гидроксил
HO_2^{\bullet}	$[HOO^{\bullet}]$	– гидродиоксид
H_2O_2		– перекись водорода
RO^{\bullet}		– алкоксил
RO_2^{\bullet}	$[ROO^{\bullet}]$	– алкилдиоксид
$ROOH$		– алкилгидропероксид

Для образования свободных радикалов существенное значение имеют так называемые *активные формы кислорода* (АФК). Под АФК понимают продукты восстановления кислорода, образующиеся при окислительно-восстановительных процессах в организме. К ним относятся синглетный кислород, супероксидный радикал и свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии кислорода с водородом. Свыше 5% потребляемого кислорода восстанавливается в супероксид-анион, а около 10% O_2 превращается в H_2O_2 .

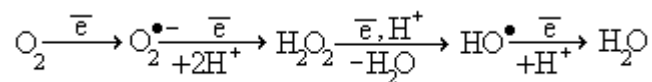
Обычный молекулярный кислород находится в триплетном состоянии, его обозначают $O=O$. Молекула O_2 содержит 2 неспаренных электрона, одновременно принадлежащих двум её атомам и имеющих одинаково направленные параллельные спины, что придает молекулярному кислороду парамагнитные свойства.

Молекула кислорода является достаточно стабильной и этому свойству она обязана именно своим двум неспаренным электронам.

Синглетный кислород образуется при переходе электрона внутри молекулы между внешними орбиталями и в связи с этим обладает дополнительной энергией, его обозначают как радикал $O^{\bullet}-O$. Электронно-возбужденное синглетное состояние кислорода не содержит неспаренных параллельных электронов и является гораздо более реакционно-способным, чем основное состояние. Одноэлектронное образование синглетного кислорода является одним из путей восстановления кислорода, с которым связано образование свободнорадикального продукта. При одноэлектронном восстановлении в качестве промежуточных продуктов могут

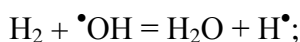
возникать супероксид $O_2^{\bullet-}$, перекись водорода H_2O_2 и гидроксильный радикал $\bullet OH$. Для полного восстановления O_2 необходимо 4 электрона.

Супероксидный анион представляет собой отрицательно заряженный свободный радикал $O_2^{\bullet-}$. Считается, что супероксид-анион дает ограниченный токсический эффект. $\bullet OH$ – монорадикал, образуется при взаимодействии с

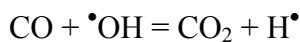


водородом. Эти продукты также очень реакционноспособны и их присутствие может представлять угрозу для целостности живых систем. На самом деле, $\bullet OH$ – наиболее мутагенный продукт ионизирующей радиации – представляет собой чрезвычайно мощный окислитель, который может атаковать все органические соединения. Гидроксильный радикал с высокой скоростью реагирует практически со всеми молекулами клетки, включая ДНК, белки, липиды, углеводы. Чувствительными к действию радикалов $\bullet OH$ и $O_2^{\bullet-}$ являются сукцинатдегидрогеназа, цитохромоксидаза, ксантиноксидаза.

Свободные радикалы обладают высокой химической активностью и взаимодействуя с молекулами, могут превращать их также в свободные радикалы. Монорадикал $\bullet OH$, реагируя с водородом дает атом-радикал H^{\bullet} и образуется вода:



с оксидом углерода монорадикал $\bullet OH$ дает CO_2 и также атом-радикал водорода:



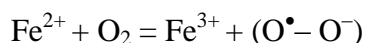
Взаимодействуя с белками, АФК снижают содержание отдельных пептидов, образуют продукты белковой интеграции и липопротеиновые комплексы. В пределах клеточной мембраны особенно подвержены взаимодействию со свободными радикалами ненасыщенные жирные кислоты и алифатические спирты (сфингозин), ненасыщенные углеводороды (сквален, каротины), ненасыщенные стеринны. Наличие в структуре мембран многих ненасыщенных соединений способствует их легкому окислению. Перекисному окислению также подвергаются ароматические аминокислотные остатки белков. Отдавая свой водород свободным радикалам, они деформируются. В результате перекисного окисления образуются свободные радикалы $\bullet OH$, вытесняющие атомы водорода из жирных кислот и белков. Атомы водорода, соединяясь с гидроксильными группами, образуют в гидрофобном слое мембраны молекулы воды. Происходит распад на фрагменты жирных кислот и пептидов с образованием отрицательно заряженных

карбоксильных групп, приводящих к повреждению мембраны и увеличению её проницаемости.

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

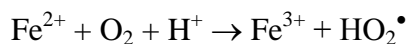
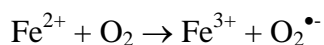
Процесс образования перекисей липидов в биологических мембранах осуществляется по цепному свободнорадикальному механизму, подобно тому как по цепному механизму происходит деление ядер урана. Особенность цепных реакций состоит в том, что свободные радикалы, реагируя с другими молекулами, не исчезают, а превращаются в другие свободные радикалы.

Наличие в радикалах одиночных электронов обуславливает их свойство присоединять электрон. Поэтому радикалы выполняют роль окислителей. Присоединяя атом водорода они выполняют функцию дегидрирования. Молекула кислорода может активироваться при взаимодействии с ионом железа:

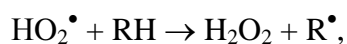


Получается супероксидный радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$. Он энергично реагирует с органическими молекулами, отрывая водород или присоединяясь к ненасыщенным связям. Поэтому ионы железа катализируют цепные реакции окисления молекулярным кислородом.

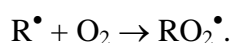
В любом химическом свободнорадикальном процессе принято рассматривать три характерные стадии: реакцию зарождения цепи, её продолжение и реакцию обрыва цепи. Свободнорадикальное окисление начинается с реакции инициирования цепи. Инициаторами могут быть химические реакции, связанные с изменением валентности иона металла (Cu^{2+} , Fe^{2+}). При окислении ионов железа молекулярным кислородом в растворе образуются как $\text{O}_2^{\bullet-}$, так и гидродиоксид- радикал HO_2^{\bullet}

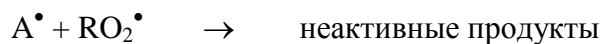


Появление бирадикала дает начало цепи при взаимодействии его с молекулой жирной кислоты RH :

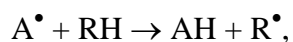


при этом образуется перекись водорода, а радикалы R^{\bullet} подвергаются аутоокислению с образованием алкилдиоксил – радикала:





Самым распространенным антиоксидантом является *витамин Е*. Наиболее активен витамин Е в относительно низких концентрациях (*in vitro* $\sim 10^{-6}$ М), при повышении концентрации, его антиоксидантная активность снижается. Это объясняется усилением реакции

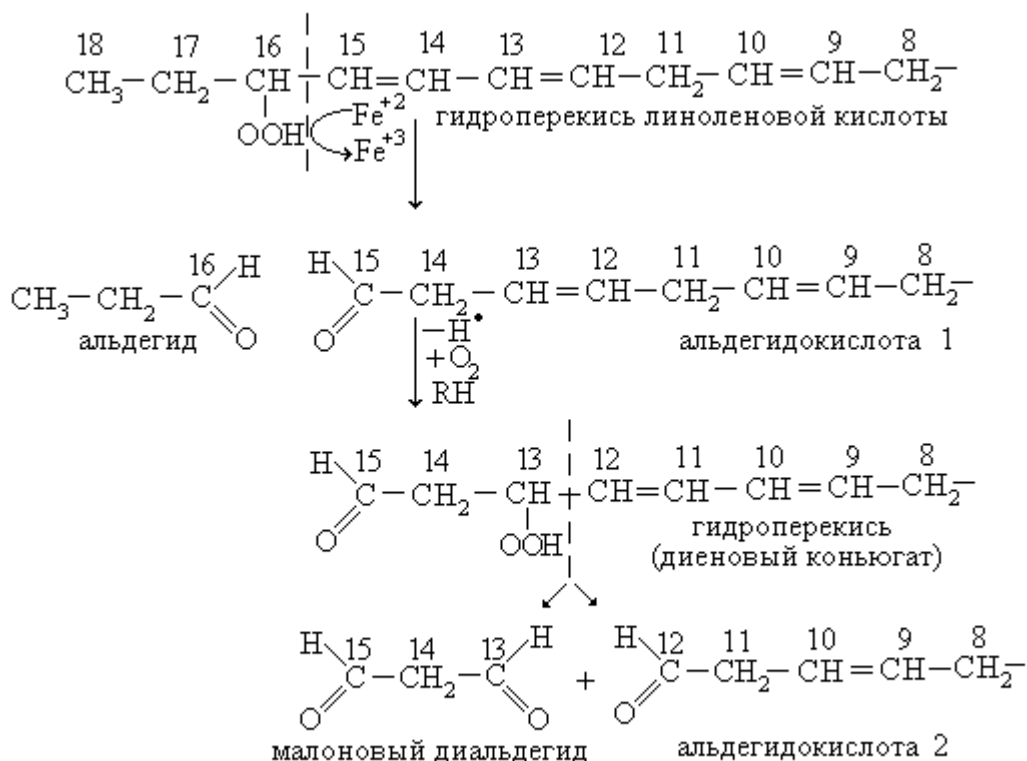


которая при низких концентрациях витамина Е не дает существенного вклада в реакцию инициирования новых цепей.

ПРОДУКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

В результате самоускоряющихся реакций свободнорадикального окисления образуется множество продуктов ПОЛ. При взаимодействии свободных радикалов с неокисленными молекулами непредельных жирных кислот образуются липидные гидроперекиси (ROOH). *Липоперекиси* – неустойчивые вещества, легко подвергаются дальнейшим превращениям с образованием целого ряда более устойчивых вторичных продуктов окисления: альдегидов, кетонов, ряда низкомолекулярных кислот (муравьиной, уксусной, масляной), эпоксисоединений и многих других. Эти вещества являются токсичными для клетки, приводят к нарушению функций мембран и метаболизма в целом.

В случае линоленовой кислоты, имеющей три двойные связи, последовательность накопления продуктов ПОЛ может быть представлена следующим образом:



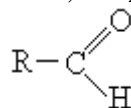
Накопление продуктов ПОЛ имеет существенное значение для определения интенсивности этого процесса.

Продуктами ПОЛ являются:

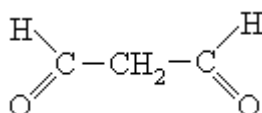
1. Гидроперекиси липидов (ROOH).
2. Диеновые конъюгаты (липоперекиси с сопряженными двойными связями)
 $=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$

3. Перекисные радикалы: H^\bullet , OH^\bullet , NO_2^\bullet

4. Альдегиды:



5. Малоновый диальдегид



Повреждающее действие продуктов перекисного окисления липидов на белки реализуется за счет их взаимодействия с $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$ и CH_3- группами. Продукты ПОЛ могут образовывать комплексы с белками и инициировать полимеризацию белковых молекул, что способствует ещё большему разрушению клеточных

структур, подавляет функцию мембраносвязанных ферментов. Перекиси полиненасыщенных жирных кислот, диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми группами аминокислот, входящих в белки, образуют конъюгированные соединения – так называемые основания Шиффа, которые обладают большой реакционной способностью и могут производить межмолекулярные "сшивки", а также вступать в реакции полимеризации и поликонденсации. В результате этих реакций также теряются присущие биополимерам функциональные свойства. Продукты реакций между малоновым диальдегидом с белками, фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами по размеру в несколько раз превосходят исходные молекулы. В результате прочных связей они не подвергаются разрушению и накапливаются с возрастом. К таким биополимерам относится *липофусцин*, называемый «пигментом старости». Полагают, что липофусцин образуется при взаимодействии продуктов распада фосфолипидов с NH₂- группами белков.

Свободнорадикальное окисление липидов играет ведущую роль в развитии ультрафиолетовой эритемы кожи, световых ожогов глаз, радиационных повреждений, отравлений четыреххлористым углеродом, свободные радикалы имеют существенное значение в накоплении необратимых повреждений, приводящих к старению организма.

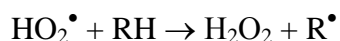
ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКЕ

Утилизация кислорода в клетке осуществляется в следующих процессах:

- 1) биологического окисления в митохондриях, сопряженных с образованием АТФ;
- 2) аутоокисления и образования свободных радикалов;
- 3) микросомального окисления, связанного с окислением ксенобиотиков;
- 4) окисления, сопровождаемого образованием перекиси водорода (H₂O₂).

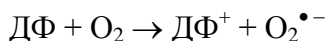
Рассмотрим три пути образования H₂O₂ в клетке.

1. *Неферментативное* образование H₂O₂ за счет аутоокисления субстратов. Этот путь был рассмотрен ранее для случая взаимодействия гидродioxid-радикала с ненасыщенной жирной кислотой:

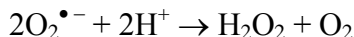


2. Перекись водорода образуется при взаимодействии кислорода с *дыхательными ферментами* (ДФ) в результате одно- и двухэлектронного

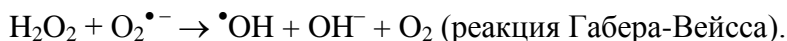
восстановления O_2 , причем одновременно с H_2O_2 образуется супероксидный радикал:



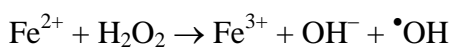
Далее с ним реагируют движущиеся по дыхательной цепи протоны, образуется H_2O_2



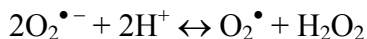
В свою очередь перекись водорода взаимодействует с супероксидным радикалом и образуется третье вещество этой группы – гидроксильный радикал HO^{\bullet}



Генерация гидроксильных радикалов в этой реакции протекает очень медленно, но значительно ускоряется в присутствии ионов металлов с переменной валентностью:

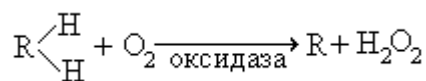


Одним из путей образования синглетного кислорода считается обратимая ферментативная реакция взаимодействия супероксидного радикала с протонами, которая дает также перекись водорода:



3. Энзиматическое образование перекиси водорода.

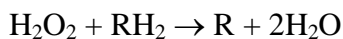
Из интермедиатов кислорода перекись водорода считается наиболее стабильным веществом и, следовательно, наименее реакционноспособным. Ее образование требует больших затрат кислорода. Около 10% всего кислорода, потребляемого организмом, расходуется на ферментативное окисление, осуществляемое оксидазами, локализованными в пероксисомах. Оксидазы катализируют прямые реакции между своими субстратами и кислородом. При этом



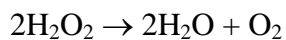
они восстанавливают O_2 до H_2O_2 .

Сюда относятся оксидазы D- и L- аминокислот, уратоксидаза, ксантинооксидаза, моноаминооксидаза и др.

Перекись водорода, образуемая в оксидазных реакциях, может либо разлагаться каталазой, либо использоваться в реакциях, катализируемых пероксидазой. Каталаза утилизирует образующуюся H_2O_2 для окисления разнообразных субстратов, в том числе фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида, этанола и метанола



Кроме того, каталаза, при низких концентрациях RH_2 превращает H_2O_2 в H_2O



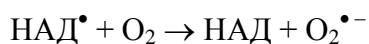
Эту реакцию иногда рассматривают как спасательный механизм, предотвращающий опасное накопление сильного окислителя H_2O_2 , при отсутствии достаточного количества доноров водорода RH_2 .

Перекись водорода образуется также с участием фермента супероксиддисмутазы (СОД). *Супероксиддисмутаза* – медьсодержащий фермент, превращает супероксидный анион в перекись водорода в реакции дисмутации:



Клетки млекопитающих содержат как цитоплазматическую, так и митохондриальную СОД, которая абсолютно необходима для аэробной жизни и отсутствует только у облигатно анаэробных организмов. В цитоплазме эритроцита СОД обеспечивает удаление супероксидного аниона, обладающего повреждающим действием. Перекись водорода разрушается затем каталазой эритроцитов. Противовоспалительные свойства СОД и ее высокая антирадикальная активность рассматриваются как важный фактор неспецифической резистентности.

Существует и другая группа ферментов, генерирующая образование перекиси водорода, связанная с окислением и восстановлением НАД и НАДФ. Так, восстановленная форма НАДН посредством одноэлектронного окисления переходит в радикал НАД^\bullet . Когда этот радикал взаимодействует с молекулярным кислородом, то посредством простого переноса электрона образуется супероксидный радикал:

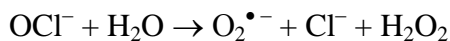
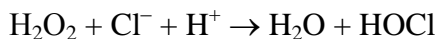
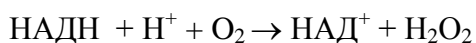


Если же супероксидный радикал будет реагировать с НАДН в присутствии ионов водорода, то реакция протекает с образованием перекиси водорода:



Например, лактатдегидрогеназа в ходе превращения лактата в пируват восстанавливает НАД в НАДН, НАДН под действием НАДН-оксидазы вступает в реакцию с O_2 , при этом образуется H_2O_2 .

АФК в фагоцитирующих клетках (гранулоциты, эозинофилы, макрофаги) образуются при действии НАДФН (НАДН)-оксидазы, миелопероксидазы.



Гипохлорит, также как H_2O_2 , является сильным окислителем.

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ОРГАНЕЛЛАХ КЛЕТКИ

Процесс аутоокисления, сопровождаемый образованием перекиси водорода, довольно активно протекает в микросомах (1,5–2 нмоль/г белка в мин) и в митохондриях (0,5 нмоль/г белка в мин). В микросомах H_2O_2 образуется на НАД или НАДФ-зависимом флавопротеиде, т.е. в начале цепи переноса электронов микросом. В митохондриях перекись водорода образуется пропорционально восстановленности переносчиков дыхательной цепи. Здесь аутоокисление дыхательных переносчиков (КоQ) происходит с образованием супероксидного аниона и последующего образования перекиси водорода. Скорость образования H_2O_2 в микросомах и митохондриях зависит от содержания кислорода. В этом заключается альтернативность процесса образования перекисей процессу биологического окисления. Многочисленные флавопротеиды митохондрий и микросом образуют $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 при аутоокислении гемоглобина, восстановленных цитохромов, адреналина.

Супероксидный анион активно образуется полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами. Поглощение бактерий лейкоцитами в процессе фагоцитоза сопровождается вспышкой дыхания, а именно увеличением потребления O_2 с образованием супероксидного аниона ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Вспышка дыхания сопровождается увеличением потока глюкозы по фосфоглюконатному пути, ведущему к образованию НАДФН. Окисление НАДФН приводит к образованию перекиси водорода, которая также как супероксидный анион оказывает бактерицидное действие. Механизм бактерицидного действия $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 связан с тем, что они могут вызывать нарушение структуры нуклеиновых кислот, полисахаридов, окислять тиоловые группы в белках и инициировать ПОЛ.

ПЕРОКСИСОМЫ – специфические органеллы, в которых происходит образование и разрушение H_2O_2 . Скорость образования перекиси водорода в пероксисомах 80 нмоль/мг белка в мин. Кислород, расходуемый на образование H_2O_2 используется для осуществления катаболических реакций.

Пероксисомы локализованы вблизи эндоплазматического ретикулаума почти всех эукариотических клеток. Они представляют собой микротельца сферической структуры, диаметром 0,5–10 мкм, т.е. несколько меньше митохондрий. Окружены однослойной мембраной и чаще всего наполнены довольно компактным аморфным матриксом. В некоторых клетках этот матрикс содержит включение – плотную кристалловидную сердцевину (ядро) или нуклеоид, с удивительно красивой и тонкой трубчатой структурой. Нуклеоид содержит пероксисомные ферменты в чрезвычайно концентрированном виде. Однако часто такая структура отсутствует. Пероксисомы выделяют из клетки методом дифференциального центрифугирования. Они имеют удельную плотность 1,25, близкую к митохондриям (1,19) и лизосомам (1,23), выделяются в митохондриальной фракции. От лизосом отделяются после добавления тритона WR-1339, который снижает плавучую плотность лизосом и они всплывают, а пероксисомы не изменяют своей плотности и осаждаются.

Принято считать, что пероксисомы представляют собой рудиментарный остаток органеллы, которая в примитивных проэукариотических клетках выполняла все функции, связанные с метаболизмом кислорода. Де Дюв, изучивший впервые функции пероксисом, высказал мысль, что пероксисомы относятся к древнейшим органеллам, выполнявшим защитную и энергетическую функции. В процессе эволюции энергетическая функция отошла к митохондриям, пероксисомы же выполняют защитную и метаболическую функции. Маркерный фермент пероксисом – *уратоксидаза*.

Метаболическая функция пероксисом заключается, прежде всего, в образовании перекиси водорода при участии ферментов оксидаз. При окислении уратов H_2O_2 образуется активнее, чем при окислении D- и L- аминокислот. Доноры электронов в этих реакциях представлены аминокислотами, жирными производными ацил-кофермента А, пуринами и некоторыми продуктами метаболизма углеводов, такими, как молочная кислота.

В пероксисомах находится большая часть содержащейся в клетке каталазы. Однако несмотря на высокую активность каталазы 40–60% H_2O_2 переходит из пероксисом в цитозоль. Благодаря тому, что ферменты, образующие перекись

водорода, и каталаза локализована внутри пероксисом, остальное содержимое клетки защищено от разрушающего действия перекисей.

Пероксисомы участвуют в липидном обмене, они часто локализуются вблизи капель нейтрального жира, имеют цепь β -окисления, более слабую, чем в митохондриях. Образующийся ацетил-коэнзим А может транспортироваться через цитозоль в митохондрии. В пероксисомах расщепляется около одной четверти жирных кислот. Пероксисомы стероидных секреторных гранул могут регулировать содержание холестерина. Крупные пероксисомы клеток печени и почек, как полагают, играют важную роль в обезвреживании различных веществ. Например, половина выпитого спирта (этанола) окисляется в организме в пероксисомах до ацетальдегида.

Защитная функция пероксисом связана с тем, что каталаза и оксидазы аминокислот обладают антимикробным и противогрибковым действием. В связи с тем, что пероксисомы в больших количествах локализуются в клетках желудочно-кишечного тракта, желчного пузыря, крови, дыхательных путей – они могут являться важной антибактериальной системой организма.

Морфологически показано, что пероксисомы очень лабильные органеллы. Их количество увеличивается при авитаминозе Е, голодании, недостатке незатерифицированных жирных кислот, при изменении гомеостаза в процессе адаптации. Важная роль принадлежит пероксисомам в возникновении гиперхолестеролемии и развитии атеросклероза. Нарушение обезвреживающей функции пероксисом в отношении этанола наступает при алкоголизме. При злокачественном росте в клетках опухоли исчезают пероксисомы и их ферменты. Все это примеры адаптивной роли пероксисом. Имеются сведения также о наследственных дефектах ферментов пероксисом.

При акаталазии, связанной с недостатком каталазы, наблюдается угнетение липидного обмена. Очень редкое генетическое нарушение у людей, известное как болезнь Цельвегера, характеризуется отсутствием пероксисом. Заболевание сопровождается резкой мышечной слабостью, нервными расстройствами, восприимчивостью к инфекциям. Новорожденные, страдающие таким тяжелым недугом, живут всего несколько месяцев.

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКЕ

Состояние ПОЛ в клетке определяется следующими факторами:

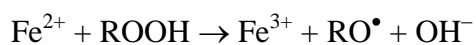
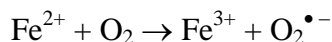
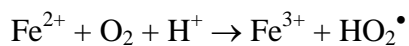
1. Качественным составом ненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов мембран.
2. Наличием достаточного количества кислорода, его активных форм.
3. Наличием катализаторов или прооксидантов.
4. Наличием антиоксидантов.
5. Факторами инициации.

У различных организмов состав жирных кислот неодинаков и различается по количеству углеродных атомов (коротко- средне- и длинноцепочечные), четным или нечетным их числам, количеству насыщенных и ненасыщенных (двойных) связей. Из ненасыщенных жирных кислот у человека содержатся олеиновая, линолевая, арахидоновая кислоты. Эти полиненасыщенные жирные кислоты получили название эссенциальных (незаменимых) факторов питания, так как они необходимы для нормальной жизнедеятельности человека. Жирные кислоты являются наиболее лабильными компонентами фосфолипидов, их обновление происходит гораздо быстрее, чем целых молекул фосфолипидов. Однако различные фракции фосфолипидов отличаются по составу ненасыщенных жирных кислот и, следовательно, по их способности к перекисному окислению. Спектр фосфолипидов изменяется таким образом, что при усилении ПОЛ мембраны обогащаются более устойчивыми к окислению фракциями фосфолипидов (фосфатидилхолин, сфингомиелин). Напротив уменьшение скорости ПОЛ влечет за собой повышение в мембранах уровня легкоокисляемых фракций фосфолипидов (фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин), содержащих больше высоко-ненасыщенных жирных кислот, что повышает скорость образования свободных радикалов. Такие колебания в составе фосфолипидов позволяют поддерживать стационарный уровень ПОЛ. Роль кислорода, его активных форм мы рассмотрели ранее.

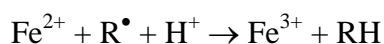
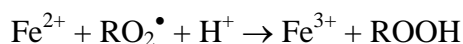
ПРООКСИДАНТЫ. Прооксиданты (или катализаторы) – это вещества, стимулирующие процессы ПОЛ. К ним относятся: активные формы кислорода, перекись водорода, радикалы, ионы металлов с переменной валентностью, витамин D. Наиболее хорошо изучена роль ионов железа.

Прооксидантное действие Fe^{2+} на ненасыщенные жирные кислоты в биологических мембранах обусловлено следующими факторами.

1. Ионы Fe^{2+} участвуют в реакциях инициирования и разветвления цепей:



Эти процессы имеют автокаталитический, самоускоряющийся характер. Следует обратить также внимание на то, что взаимодействие радикалов с Fe^{2+} дает противоположный эффект, происходит обрыв цепей:



Образовавшиеся в этом случае продукты являются нетоксичными (RH) или менее токсичными (ROOH), чем свободные радикалы.

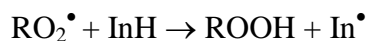
Таким образом, ионы Fe^{2+} выполняют двойную роль в реакциях ПОЛ: с одной стороны, способствуют развитию процесса, с другой – ингибируют его. Конечный эффект зависит от концентрации ионов в системе. До концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М процесс ПОЛ ускоряется, при более высокой концентрации Fe^{2+} проявляется его антиоксидантное действие. В этом случае ионы Fe^{2+} выступают в роли триггера, переключающего процесс ПОЛ с самоускоряющегося (при низких концентрациях) на самозатухающий (при высоких концентрациях). В биологических системах содержание Fe^{2+} обычно находится в пределах $10^{-5} - 10^{-4}$ М, следовательно, более характерной для Fe^{2+} в клетках является прооксидантная функция.

Способностью индуцировать ПОЛ обладает также витамин D. Характерным физико-химическим свойством кальциферола является чувствительность к действию кислорода и света. Окисление витамина D на воздухе носит аутокаталитический свободнорадикальный характер. Подтверждением его прооксидантного действия являются данные об увеличении концентрации свободных радикалов после введения больших доз витамина D, а также тот факт, что при гипервитаминозе D понижается перекисная резистентность эритроцитов, повышается активность лизосомальных ферментов, чрезвычайно чувствительных к действию продуктов ПОЛ.

АНТИОКСИДАНТЫ. Токсичность кислорода и его различных интермедиатов, а также озона обусловила необходимость постоянного функционирования в организме специальных механизмов противooksидательной биологической защиты. К антиоксидантам относятся в первую очередь вещества, способные в малых дозах тормозить свободнорадикальное окисление, а также вещества – синергисты, которые сами не обладают выраженными

противоокислительными свойствами, но способны усиливать антиоксидантный эффект. Являясь донорами водорода, они способны восстанавливать окисленную форму антиоксиданта и тем самым замедляют его расходование. К таким веществам – синергистам относятся аскорбиновая, лимонная, никотиновая кислоты. Среди антиоксидантов много веществ природного происхождения. В медицине находят применение синтетические антиоксиданты.

Биоантиокислители разделяются на жирорастворимые и водорастворимые. К жирорастворимым относятся витамины групп Е, К, убихинон, билирубин, стероидные гормоны. К водорастворимым – серусодержащие аминокислоты, глутатион, адреналин. Высокие антиокислительные свойства имеют многие антибиотики: тетрациклин, пенициллин, левомецетин, феназан. Из синтетических антиокислителей в медицине используют барбитураты, пирогаллол, фенолы, фенотиазин. Характерным представителем семейства антиоксидантов искусственного происхождения является ионол и лекарственные препараты (дибунол (противоожоговый), эмоксипин (для внутриглазных инъекций против кровоизлияний)). Основную массу антиокислителей составляют вещества, содержащие подвижный атом водорода с ослабленной связью с углеродом. В результате при перекисном окислении липидов активный радикал, ведущий цепь окисления, заменяется на мало активный радикал ингибитора (In^{\bullet}), например,



Наиболее хорошо изучено действие *витамина Е*. Витамин Е имеет разностороннее биологическое значение. При его недостаточности развиваются дегенеративные и дистрофические процессы в скелетных мышцах и миокарде, нервных и печеночных клетках, повышается проницаемость капилляров. Специфическим признаком Е-витаминной недостаточности является повышенная чувствительность эритроцитов к перекисному гемолизу.

Токоферол является соединением фенольного ряда антиоксидантов. Но только восстановленные формы, имеющие гидроксильную группу, рассматриваются как ингибиторы свободнорадикальных процессов. При накоплении перекисей в биологических системах снижается уровень токоферола вплоть до его полного исчезновения. Особенно активно уменьшают содержание витамина Е в клетках жиры, богатые полиненасыщенными жирными кислотами (например, кукурузное масло). И если уровень линолевой кислоты в рационе животных превышает 2%, то начинает обостряться Е-витаминная недостаточность. Когда же этот показатель

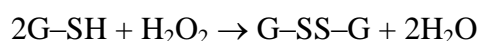
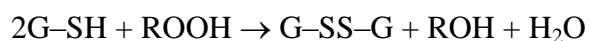
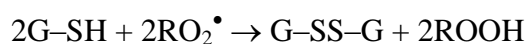
превышает 7%, то у животных нарушается функция оплодотворения и происходят другие нежелательные сдвиги, а дополнительное введение препаратов витамина Е предупреждает эти явления.

Противоокислительная роль витамина Е проявляется на всех уровнях организации – от субклеточного до организма в целом. Так, если в митохондриях искусственно повысить содержание гидроперекисей линолевой кислоты, то наблюдается разобщение процессов дыхания и фосфорилирования. Но если одновременно с перекисями ввести животным α -токоферол, то это приводит к восстановлению окислительного фосфорилирования. Если животных содержать на диете, бедной витамином Е, то у них происходит выраженная активация лизосомальных ферментов. С другой стороны установлено, что витамин Е защищает лизосомы от действия перекисей, которые губительно действуют на лизосомальную мембрану. Токоферол является незаменимым фактором резистентности эритроцитов по отношению к гемолитическим агентам. Если в течение многих месяцев скормить животным пищу, не содержащую витамина Е, то у них в конце концов развивается гемолитическая анемия. Многие вещества, вызывающие гемолиз, при своём окислении в организме становятся источником свободных радикалов, которые инициируют перекисное окисление липидов и тем самым способствуют разрыхлению эритроцитарных мембран и деградации их фосфолипидов.

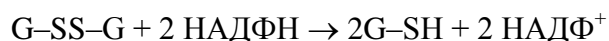
Существуют восемь разновидностей витамина Е, наиболее активным является α -токоферол. Витамин Е способен снижать агрегацию тромбоцитов, повышать уровень ЛПВП в крови, которые в свою очередь снижают содержание холестерина. Антитромботическое действие проявляется при ежедневном приеме витамина Е в дозах 300–600 мг.

К антирадикальным ингибиторам фенольного типа, механизм действия которых состоит в отдаче подвижного водорода свободному радикалу, относится также *убихинон*. Биологическое действие убихинонов как коферментов основано на способности к обратимым окислительно-восстановительным реакциям, в том числе и одноэлектронным, с образованием семихинонов. Их роль особенно значительна в процессах переноса электронов по дыхательной цепи. Антиоксидантная активность убихинона оказалась сопоставимой с активностью токоферола, в особенности по свойству блокировать перекисные радикалы. Среди *серусодержащих соединений* существенное значение имеют метионин, глутатион, цистеин. Эти соединения, включающие SH-группы, обеспечивают функционирование одного из основных

механизмов антиоксидантной защиты клетки. Глутатион находится в клетке как в окисленной (G-SS-G), так и восстановленной (G-SH) форме, и представляет собой основной клеточный фонд мобильных сульфгидрильных групп. Окисление глутатиона и инактивацию перекисей обеспечивает *глутатионпероксидаза* (ГП). Система глутатион-глутатионпероксидаза обладает антирадикальным и антиперекисным действием:



Для этих процессов необходим восстановленный глутатион G-SH. Он образуется из окисленного под действием глутатионредуктазы (ГР) в присутствии НАДФН.



Глутатион-пероксидазная система может использоваться в качестве субстратов как гидроперекиси фосфолипидов, так и гидроперекиси свободных жирных кислот. Антиокислительное действие восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазы, участвующих в защите эритроцитов от токсического действия кислорода, заключается в следующем: при аутоокислении гемоглобина в метгемоглобин образуется супероксидный радикал, который при участии супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода, образующаяся перекись водорода разрушается каталазой, а также восстановленным глутатионом.

При понижении активности ГП наблюдается повышение гемолиза эритроцитов в результате повреждающего действия на мембраны H_2O_2 и липоперекисей. Наследственный дефицит ГП известен при желтухе новорожденных. ГП функционирует главным образом в цитоплазме клетки и является селен-зависимым ферментом, содержит 4 атома Se. Следует отметить, что Se участвует в фотохимических реакциях, связанных с функцией зрения. Полагают, что глутатионпероксидазная система, входя в состав фоторецепторов пигментного слоя сетчатки, влияет на интенсивность фотоиндуцированных свободнорадикальных процессов.

Необходимо отметить, что по антиокислительной активности и содержанию фосфолипидов ткани и органы можно разделить на 3 группы:

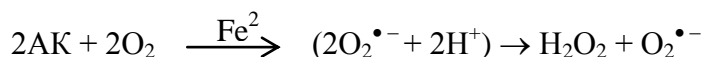
1) с высокой антиокислительной активностью и высоким содержанием фосфолипидов: нервная ткань (кора мозга, спинной мозг), легкие;

2) со средним содержанием фосфолипидов и антиокислительной активностью: селезенка, почки, сердце, печень;

3) с низкой антиокислительной активностью: подкожная жировая клетчатка, мышцы, тимус;

КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕРЕКИСНЫХ СИСТЕМ. В образовании липидных перекисей в клетках животных принимают участие 2 системы:

1. Аскорбатзависимая неферментативная система ПОЛ (АЗП). Она включает в себя ионы Fe^{2+} , мощным активатором (индуктором) является аскорбиновая кислота. Участие аскорбата в индукции ПОЛ связано с его способностью: а) восстанавливать Fe^{2+} из Fe^{3+} и б) проявлять прооксидантный эффект в присутствии Fe^{2+} :



Аскорбиновая кислота, как было отмечено ранее, является синергистом антиоксидантов, в частности токоферола. Прооксидантное действие связано с её окислительно-восстановительными свойствами. Подтверждением того, что АЗП является неферментативной системой является её нечувствительность к нагреванию и действию сульфгидрильных ядов.

2. НАДФН- или НАДН-зависимая система ПОЛ (НЗП). Эта система является ферментативной, представлена гемоглобином, цитохромами (особенно активен цитохром С). Для её работы необходимы НАДН или НАДФН, пирофосфат, Fe^{2+} и ферментоактивный белок. Система нечувствительна к ЭДТА и другим комплексообразователям.

Различие АЗП и НЗП состоит в использовании различных восстановителей, аскорбата или НАДФН, а также в сродстве к железу. Благодаря наличию ферментов, НЗП обладает очень высоким сродством к Fe^{2+} и в некоторых случаях даже не нуждается в добавлении его извне. Для проявления её активности вполне хватает эндогенного железа. АЗП, напротив, всегда нуждается в добавлении значительных количеств Fe^{2+} .

Интенсивность ПОЛ не зависит от типа индуктора. При обоих типах ПОЛ последовательно образуются гидроперекиси липидов, альдегиды, малоновый диальдегид. Для кинетики накопления перекисей характерен период индукции или латентный период. Длительность латентного периода зависит от концентрации антиоксиданта в системе. Чем больше концентрация антиоксиданта в системе и чем медленнее он окисляется, тем более длительным оказывается период индукции.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Процесс ПОЛ представляет собой нормальный биохимический процесс. Через стадию образования перекисей липидов в клетках осуществляется синтез простагландинов, стероидных гормонов, образование желчных кислот из холестерина. Процесс ПОЛ необходим для нормальной работы цепи переноса электронов при митохондриальном окислении.

СИНТЕЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ. *Простагландины* – биологически активные вещества, обладающие широким спектром физиологического действия: участвуют в регуляции работы сердечно-сосудистой системы, эндокринной, нервной и половой систем, регулируют такие важные процессы как пищеварение, кровообращение, оплодотворение, развитие плода, роды. Источником субстрата для биосинтеза простагландинов в организме являются сильно ненасыщенные фосфолипиды клеточных мембран, содержащие арахидоновую кислоту, имеющую в своем составе 4 –С=С– связи. Конверсия арахидоновой кислоты под влиянием фермента циклооксигеназы осуществляется в несколько стадий через образование эндоперекисей простагландинов, с включением кислорода. Образующиеся короткоживущие соединения – эндопероксиды дают ПГЕ₂ и ПГФ_{2α}, под воздействием ферментных систем эндоплазматического ретикулума (изомеразы и редуктазы); под влиянием тромбоксансинтетазы, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме тромбоцитов, образуются тромбоксаны, а при воздействии на эти же эндоперекиси простациклинсинтетазы, содержащейся в неповрежденном эндотелии сосудов, образуется простациклин. В процессе синтеза простагландинов происходит взаимодействие эндопероксидов с глутатионпероксидазной системой, которая, очевидно, защищает мембраны ЭПР от действия перекиси.

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ В МИКРОСОМАХ. Продукты ПОЛ образуются в митохондриальной цепи переноса электронов при окислении Fe²⁺ в Fe³⁺. Конечным акцептором электронов в НАДФН-специфичной цепи является цитохром P-450, гем которого содержит ион Fe³⁺. В процессе гидроксилирования, протекающего на цитохроме P-450, Fe³⁺ восстанавливается до Fe²⁺, окисление которого сопряжено с образованием эндопероксидов (например, при аутоокислении холестерина). Более подробно процесс гидроксилирования при участии цитохрома P-450 будет рассмотрен в разделе «Митохондриальное окисление».

ОБРАЗОВАНИЕ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ ИЗ ХОЛЕСТЕРОЛА. Холестерол является одноатомным вторичным спиртом, молекула которого включает 8 углеродных атомов в боковой цепи и легко образует комплексы с солями кальция и магния.

Холестерол относится к числу самоокисляющихся соединений, он окисляется даже при хранении в кристаллическом виде. Основные продукты аутоокисления холестерина: 7-кетохолестерол, 7 α - и 7 β -оксихолестеролы. В организме человека и животных окислению подвергается как сама циклическая структура, так и боковая цепь. В результате образуются соединения, лучше растворимые в воде, что способствует их выведению из организма. До 90% холестерина путем окисления превращается в желчные кислоты, около 3% окисляется в прегненолон, из которого в дальнейшем образуются стероидные гормоны. Наряду с этим, путем окисления холестерола из него образуется также 7-дегидрохолестерол, который при участии цитохрома P-450 окисляется в витамин D₃ (рис. 11).

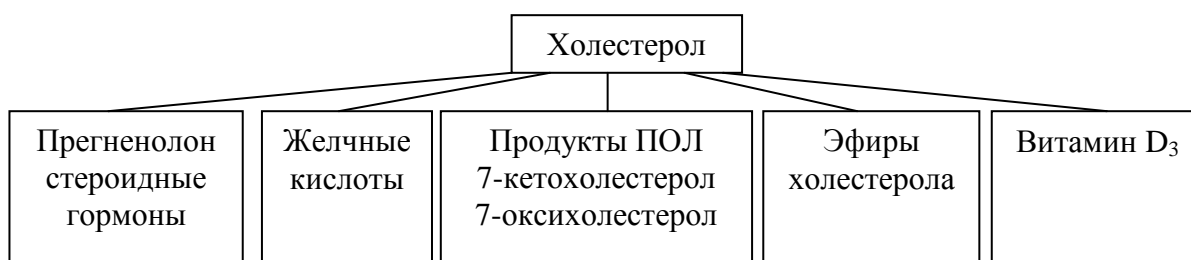


Рис. 11 Пути превращения холестерина в организме человека

Окисление холестерина в желчные кислоты осуществляется в печени монооксигеназной ферментной системой, локализованной в микросомальной фракции. Здесь же на цитохроме P-450 может происходить окисление холестерина по перекисному механизму в 7-кетохолестерол и 7-оксихолестерол, которое происходит при окислении Fe²⁺ в Fe³⁺. Активирование перекисного окисления холестерина тормозит реакции его микросомального гидроксирования т.е. превращения в желчные кислоты. Иными словами, существуют конкурентные взаимоотношения между процессами перекисного окисления холестерина и образования желчных кислот. Этот факт имеет значение для понимания процессов ПОЛ при атеросклерозе.

РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ.

Усиление образования свободных радикалов и ПОЛ наиболее характерно для действия ионизирующих излучений. При действии ионизирующих излучений в организме образуется большое количество продуктов радиолиза воды, свободных радикалов, ионов, в результате чего в ряде органов и тканей после облучения накапливаются продукты свободнорадикального окисления: перекиси; альдегиды, кетоны, эпоксиды, которые рассматривают как радиотоксины. Степень выраженности влияния ионизирующих излучений на организм зависит от наличия кислорода. При повышении концентрации кислорода происходит усиление радиобиологического эффекта и, наоборот, облучение при пониженном содержании кислорода или в его отсутствии дает менее выраженное повреждение организма. Это явление получило в радиобиологии название *кислородного эффекта*.

Образующиеся в живом организме свободные радикалы могут нарушать метаболические процессы и повреждать структуру молекул. Принято считать, что одной из главных причин повреждения мембранных структур под влиянием облучения является накопление продуктов ПОЛ. При облучении белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов в них возникают скрытые повреждения, которые могут проявить себя под влиянием различных химических и физических факторов. К таким повреждениям относятся: окисление SH-групп в белках, образование односторонних разрывов в молекулах ДНК и др., которые в дальнейшем проявляется в задержке деления клеток и клеточной гибели. Снижение числа делящихся клеток после облучения было замечено вскоре после открытия рентгеновских лучей, что и послужило одним из оснований к применению этих лучей для подавления опухолевого роста.

Накопление липоперекисей сопровождается снижением антиокислительной активности тканей после облучения, что создает условия для цепного образования продуктов ПОЛ. Свободные радикалы, образующиеся под влиянием облучения, могут способствовать появлению раковых опухолей. Здесь проявляется двойная роль ионизирующих излучений: 1) под его влиянием гибнет все живое и в больших дозах облучение применяется для радиотерапии опухолей; 2) облучение может индуцировать опухоли через образование свободных радикалов.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЙ РОСТ. Способностью вызывать злокачественное перерождение тканей человека обладают ряд химических соединений,

ионизирующие излучения, вирусы. Многие канцерогенные факторы индуцируют появление свободных радикалов, изменяющих структуру и функции жизненноважных компонентов клетки, прежде всего их генетического аппарата. Свободные радикалы имеют большое значение не только в процессах злокачественного перерождения клеток, но и в дальнейшем развитии и росте опухоли. Например, в селезенке, печени, почках и других органах экспериментальных животных максимальное увеличение количества свободных радикалов происходит на 3–4 сутки развития лейкоза (злокачественное заболевание крови), т.е. тогда когда ещё не обнаруживаются основные признаки этого заболевания: увеличение размеров селезенки и резкое возрастание количества лейкоцитов в крови. По мере развития этих проявлений количество свободных радикалов уменьшается и к моменту гибели становится минимальным. Установлено, что в сформировавшейся опухоли количество свободных радикалов уменьшается, но значительно возрастает в других тканях. Это связано с тем, что опухоль энергично поглощает весь витамин Е, который поступает к ней из крови. Б.Н. Тарусов показал, что перераспределение антиоксидантов в организме в процессе развития опухоли является следствием того, что опухоль перекачивает их из здоровых тканей, т.е. выполняет функцию "ловушки антиоксидантов". Если направленно изменять уровень антиоксидантов, то можно влиять на течение опухолевого процесса. В качестве такого агента можно использовать синтетический антиоксидант ионол (дибунол), который оказался эффективным как при лечении раковых, так и воспалительных, ожоговых заболеваний.

АТЕРОСКЛЕРОЗ – хроническое поражение артерий, вызванное разрастанием множественных плотных узловатых утолщений артерий (бляшек), суживающих её просвет и способствующих образованию тромба. Атеросклеротические изменения сосудов наблюдаются при ишемической болезни сердца и мозга, гипертонической болезни.

Наиболее распространенной теорией патогенеза атеросклероза является липидноинфильтративная, которая базируется на том, что при атеросклерозе повышается уровень холестерина в крови, увеличивается свертываемость крови, в стенке сосудов обнаруживаются очаговые отложения липидов и разрастание соединительной ткани. Высокая концентрация холестерина в составе ЛПОНП и ЛПНП и низкая концентрация холестерина в составе ЛПВП (α -холестерола) усиливают степень риска атеросклероза и ишемической болезни сердца. Однако

липидная теория атеросклероза подверглась критике академика Е.И. Чазова в связи с тем, что снижение уровня холестерина и липидов в крови под действием лекарственных препаратов не снижало смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Тогда появилась перекисная концепция атеросклероза. Суть её заключается в том, что при атеросклерозе происходит активация аутоокисления холестерина и наблюдается антиоксидантная недостаточность. При антиоксидантной недостаточности, свойственной атеросклерозу, возрастает ПОЛ, что нарушает основной путь удаления холестерина из организма – превращения его в желчные кислоты; увеличивается холестериноз (который может быть наследственно обусловленным). Все это в свою очередь отягощает проявления атеросклероза.

Усиление ПОЛ вызывает комплекс патологических проявлений атеросклероза, названный *окислительным стрессом* (Ю.А. Владимиров). Он характеризуется повреждением мембран клеток и внутриклеточных органелл, нарушением активности антиоксидантных и ряда мембранных ферментов, накоплением первичных и вторичных продуктов ПОЛ в крови и различных органах. Свободнорадикальное окисление способствует распаду липопротеинов и фосфолипидов, вызывает распад эластических волокон. При этом наиболее уязвимыми являются мембраны клеток эндотелия артерий, потому что в их составе довольно много окисляемых фосфолипидов и одновременно они контактируют с относительно высокими концентрациями кислорода.

Существует 3 главных момента, предрасполагающих организм к тромбозу: 1) повреждение эндотелия; 2) изменение скорости кровотока; 3) склонность к повышенной свертываемости крови. Химические, бактериальные экзо- и эндотоксины, иммунологические сдвиги являются мощными факторами повреждения эндотелиальных клеток. К важным моментам неожиданного повреждения капиллярной стенки относится *дефицит витамина С*. Полагают, что аскорбиновая кислота связывает токсические вещества в комплексы, удаляемые организмом через почки. Так, например, витамин С эффективен при устранении токсического действия свинца, мышьяка, бензола, бактериальных и вирусных агентов. Недостаточная обеспеченность витамином С является фоном, на котором обычно развиваются сердечные приступы или инсульты головного мозга. При этом сравнительно легко происходит локальное формирование кровяного сгустка на участке повреждения или сдавления кровеносного сосуда.

При отложении липидов в стенке артерий нарастает угроза ломкости сосудов, которую способен предотвратить витамин С. Одновременно при атеросклеротическом процессе возникают условия, способствующие сравнительно легкому развитию стрессовых состояний. Стрессы, спровоцированные состоянием гнева, страха и другими эмоциональными срывами, способны вызвать за несколько минут резкое повышение содержания липидов, холестерина в крови.

Наконец, следует упомянуть ещё об одной функции витамина С как антиоксиданта, предотвращающего образование и накопление свободных радикалов в организме; этим поддерживается целостность сосудистой стенки и сердечной мышцы. Фактором, разрушающим витамин С, является никотин, в связи с чем у курильщиков резко выражена тенденция к образованию кровяных сгустков и они нуждаются в усиленном введении витамина С.

Факторами риска при атеросклерозе являются: гиподинамия, снижение поступления антиоксидантов в рафинированной пище. Периоды активного развития атеросклероза, атеросклеротические кризы, инфаркт миокарда и кровоизлияния в мозг чаще наблюдаются в зимне-весенний период года, т.е. в те месяцы, когда в организм меньше всего поступает витаминов-антиоксидантов Е, С, Р. В стрессовых ситуациях, которые часто сопровождаются инфарктами, есть все условия для вспышки свободнорадикального процесса: усиленное поступление кислорода и выброс в кровь жирных кислот, основных источников ПОЛ.

Обогащение пищи антиоксидантами ослабляет явления аутоокисления холестерина и оказывает терапевтический эффект. Благоприятное действие на больных атеросклерозом и ишемической болезнью сердца оказывают токоферол, аскорбиновая кислота, рутин, препарат аевит (содержит ретинол и токоферол), а также дибунол.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС. Нарушение внутриклеточного баланса антиоксидантов и прооксидантов приводит к развитию окислительного стресса. Ключевую роль в развитии окислительного стресса выполняют АФК: супероксидный анион-радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, органические радикалы и перекиси. При окислительном стрессе происходит усиление свободнорадикального и перекисного окисления липидов. Образование свободных радикалов может приводить к необратимому ингибированию ферментов, содержащих SH-группы, инициировать образование поперечных сшивок с

накоплением инертных биополимеров. Липоперекиси и липоперекисные радикалы проявляют токсичность на уровне мембранно-связанных молекул.

АФК, являясь прооксидантами, способствуют развитию воспаления. АФК образуются при активации нейтрофилов, способны повреждать эндотелий сосудов. Фибриллярный белок коллаген под влиянием АФК теряет эластичность и способность к набуханию. АФК служат источником повреждения клеток крови и, в частности, медиатором их окислительного гемолиза.

Цитотоксичность АФК крови проявляется в основном к эритроцитам, что ведет к увеличению содержания метгемоглобина, инициации процесса ПОЛ мембран, а гемоглобин служит катализатором образования радикалов $\cdot\text{OH}$

Существует три линии защиты эритроцитов от цитотоксического действия АФК. Первая линия защиты – СОД, вторая – ГП и глутатионтрансфераза. При недостаточности антиоксидантной защиты нарушается организация мембранных структур, изменяется микровязкость мембран, увеличивается неспецифическая проницаемость для ионов кальция. происходит высвобождение лизосомальных ферментов.

Явление окислительного стресса наиболее характерно для таких заболеваний как атеросклероз, гипертензия, диабет.

ПЕРЕКИСНЫЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ

Согласно перекисной гипотезе гибели клетки наиболее вероятной причиной необратимых нарушений в клетке, приводящей к её биологической гибели является повреждение мембран. Существует три причины, свидетельствующие в пользу правильности такого представления.

1. В биологических мембранах клетки содержатся субстраты ПОЛ – ненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды, холестерол, а также катализаторы процесса, содержащие ионы Fe^{2+} . В нормально функционирующих клетках скорость ПОЛ ограничена структурным фактором и антиоксидантами. Нарушение молекулярной организации мембран или разрушение антиоксидантов могут приводить к усилению реакций ПОЛ.

2. Процесс ПОЛ имеет аутокаталитический, самоускоряющийся характер. Раз начавшись, процесс идет со всё возрастающей скоростью и остановить его чрезвычайно трудно.

3. Очень существенна высокая токсичность продуктов ПОЛ. Вызывая полимеризацию белков, окисление сульфгидрильных групп ферментов эти продукты приводят в первую очередь к поражению мембран клетки.

Последовательность реакций в процессе гибели мембран клетки можно проиллюстрировать следующей схемой (рис. 12).



Рис. 12. Перекисный тип повреждения клетки

ГЛАВА 5. ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ И МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

МИКРОСОМЫ. Мембраны эндоплазматического ретикулума составляют более половины внутриклеточных мембран. С помощью эндоплазматического ретикулума в клетке происходит разделение новосинтезированных молекул между цитозолем и остальными компартментами, в нем осуществляется биосинтез макромолекул, используемых для сборки мембран других клеточных органелл. Липиды, белки, сложные углеводы, транспортируемые в аппарат Гольджи, плазматическую мембрану, лизосомы или во внеклеточное пространство – все они синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме. Шероховатый эндоплазматический ретикулум содержит рибосомы, ответственные за синтез белков в клетке, а гладкий эндоплазматический ретикулум содержит ферменты, катализирующие реакции детоксикации, в результате которых обезвреживаются лекарственные вещества и вредные соединения, образующиеся в процессе метаболизма.

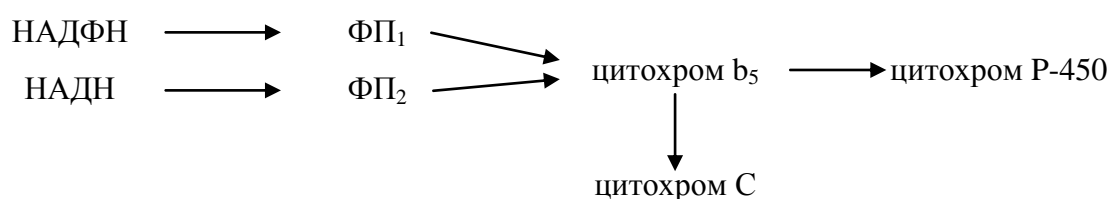
Чтобы изучить функции и биохимические свойства эндоплазматического ретикулума, необходимо сначала выделить его из клетки. В процессе гомогенизации тканей и клеток выделяются фрагменты эндоплазматического ретикулума, которые были названы микросомами. При центрифугировании в градиенте плотности сахарозы микросомы оседают в виде микросомальной фракции при 105000 g в течение 1 часа. К микросомам относят две подфракции: 1) осаждаемую при высокой концентрации сахарозы (шероховатые микросомы) и 2) осаждаемую при низкой концентрации сахарозы (гладкие микросомы). Шероховатые микросомы являются препаратом эндоплазматического ретикулума, способного к синтезу белка, гликозилированию и синтезу мембран. Гладкие микросомы содержат ферменты цепи переноса электронов, осуществляют процесс микросомального окисления и метаболизм ксенобиотиков.

При изучении микросом основное внимание мы уделим метаболизму ксенобиотиков. Значение проблемы ксенобиотиков связано со всё возрастающим поступлением в организм лекарственных и других химических веществ. Для обеспечения гомеостаза клеток в процессе эволюции в организме выработались защитные системы, основная функция которых заключается в удалении ксенобиотиков (чужеродных для организма веществ). Чужеродные соединения и

метаболиты, попадающие в организм извне, плохо выводятся из организма, если представляют собой жирорастворимые и высокомолекулярные агенты. Жирорастворимые соединения, как известно, легко проникают в клеточные мембраны и связываются с липидными компонентами. Водорастворимые вещества выводятся из организма путем фильтрации через почки, в то время как липидорастворимые вещества предварительно проходят этап метаболизма в мембранах эндоплазматического ретикулума печени, где они претерпевают ферментативную конверсию в водорастворимые метаболиты. Химическую модификацию ксенобиотиков, в том числе лекарственных, выполняет *монооксигеназная система* микросомального окисления.

В состав микросомальных ферментов, наряду с монооксигеназными системами, входят эстеразы (глюкозо-6-фосфатаза, Mg^{2+} -зависимые нуклеозиддифосфатазы, неспецифические эстеразы), которые также как оксидоредуктазы используются в качестве контрольных ферментных тестов при изучении гетерогенных мембран эндоплазматического ретикулума. Первое место как маркер ЭПР занимает *глюкозо-6-фосфатаза*, которая имеет непосредственное отношение к переносу глюкозы через гидрофобную зону. Следует также отметить ферменты, катализирующие реакции конъюгации: глюкуронозилтрансферазу, сульфотрансферазу, глутатионтрансферазу, участвующие в механизмах детоксикации. Реакции конъюгации составляют вторую фазу биотрансформации липидорастворимых веществ после их взаимодействия с микросомальными монооксигеназами.

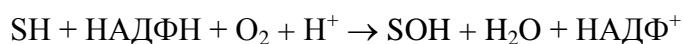
МИКРОСОМАЛЬНАЯ СИСТЕМА ОКИСЛЕНИЯ представляет собой полиферментный комплекс, зависящих от НАДФН и НАДН, цепей переноса электронов. Общим звеном этих цепей является цитохром P-450. В состав этого комплекса входят: цитохром b_5 , НАДФН – цитохром P-450-редуктаза и НАДН-цитохром b_5 -редуктаза.



НАДФН и НАДН являются донорами электронов для процессов гидроксилирования, осуществляемых цитохромами b_5 и P-450. ФП₁ и ФП₂ являются переносчиками

электронов, флавопротеинами. ФП₁ представляет собой НАДФН-цитохром Р-450-редуктазу, а ФП₂ является НАДН-цитохром b₅-редуктазой. С ФП₁ и ФП₂ возможен перенос электронов на цитохром С – основной компонент дыхательной цепи митохондрий. В результате осуществляется межмембранный перенос электронов.

Наиболее важной реакцией микросомального окисления является гидроксирование, сущность которого заключается во внедрении одного атома активированного кислорода в окисляемое вещество, в то время как другой его атом идет на образование воды, т.е. гидроксирование протекает по монооксигеназному типу:



где SH – окисляемый субстрат, НАДФН – донор электронов, SOH – гидроксированный продукт.

Превращение атомов кислорода в молекулу воды и гидроксильную группу окисляемого субстрата осуществляет цитохром Р-450. В некоторых клетках эта система включает ещё дополнительный промежуточный переносчик электронов между редуктазой и цитохромом Р-450. *Цитохром Р-450* представляет собой комплекс белка с гемом (фосфолипидпротогем-сульфидпротеиновый комплекс). Этот гемопrotein получил такое название в связи с тем, что в восстановленной форме, присоединяя СО, образует спектральный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 450 нм. По высоте этого пика поглощения определяют его содержание в исследуемых образцах. В эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов имеется много изоформ Р-450 с молекулярной массой в пределах 45–55 кДа. Цитохром Р-450 представляет собой очень гидрофобный белок, локализованный внутри мембраны. Простетическая группа по типу гема протопорфирина IX содержит ион Fe³⁺. Простетическая группа помещается в гидрофобной полости, активном центре цитохрома Р-450. Fe³⁺ в поле лиганда сильно искажено, что регистрируется необычным для него спектром поглощения в области 450 нм. Чем больше цитохрома Р-450 содержится в мембране, тем в лучшем состоянии она находится. Стареющие мембраны имеют цитохром Р-420 (неактивная форма).

Среди различных форм цитохрома Р-450 существенную роль играет цитохром Р-448. Они отличаются друг от друга первичной последовательностью аминокислот и формой взаимодействия гема с белком. Цитохром Р-448 служит терминальной оксидазой в системе арилгидроксилаз, обеспечивающих, в частности,

метаболизм полициклических углеводов. Наличие многих изоформ позволяет монооксигеназным системам осуществлять биотрансформацию разных липотропных ксенобиотиков.

Цитохром b_5 представляет собой гемопроteid с молекулярной массой 11–13 кДа, содержит 1 моль Fe^{3+} протопорфирина IX на 1 моль апофермента. В окисленной форме цитохром b_5 обладает максимумом поглощения при 412–426 нм. В отличие от цитохрома P-450, расположенного в глубоких слоях мембраны, цитохром b_5 локализован на поверхности эндоплазматического ретикулума. Цитохромы P-450 и b_5 функционально тесно связаны. Они могут образовывать сложные гемопротеиновые комплексы, тем самым повышая скорость катализируемых ими реакций. Локализация цитохромов и флавопротеидов показана на рис. 13.

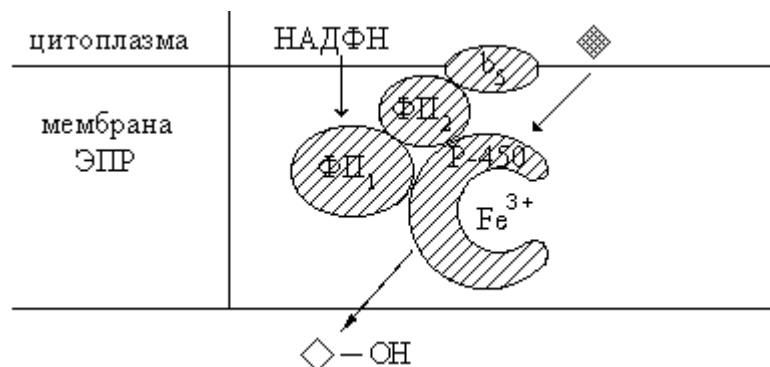


Рис. 13. Локализация цитохромов в мембране ЭПР

МЕХАНИЗМ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

Существует несколько схем действия микросомальных оксигеназ. Наиболее распространенной является схема Эстабука. В соответствии с ней в механизме гидроксилирования выделяют пять стадий (рис. 14).

- 1) Связывание окисленной формы цитохрома P-450 с субстратом ($\text{Fe}^{3+} - \text{S}$);
- 2) Восстановление образовавшегося комплекса в НАДФН-специфичной цепи переноса электронов ($\text{Fe}^{2+} - \text{S}$);
- 3) Образование тройного комплекса: восстановленная форма цитохрома P-450 – $\text{S} - \text{O}_2$;
- 4) Активирование молекулярного кислорода в этом комплексе путем его восстановления ($\text{Fe}^{2+} - \text{S} - \text{O}_2^{\bullet -}$);
- 5) Распад комплекса на окисленный цитохром P-450, окисленный субстрат и гидроксил (Fe^{3+} , SOH , OH^-).

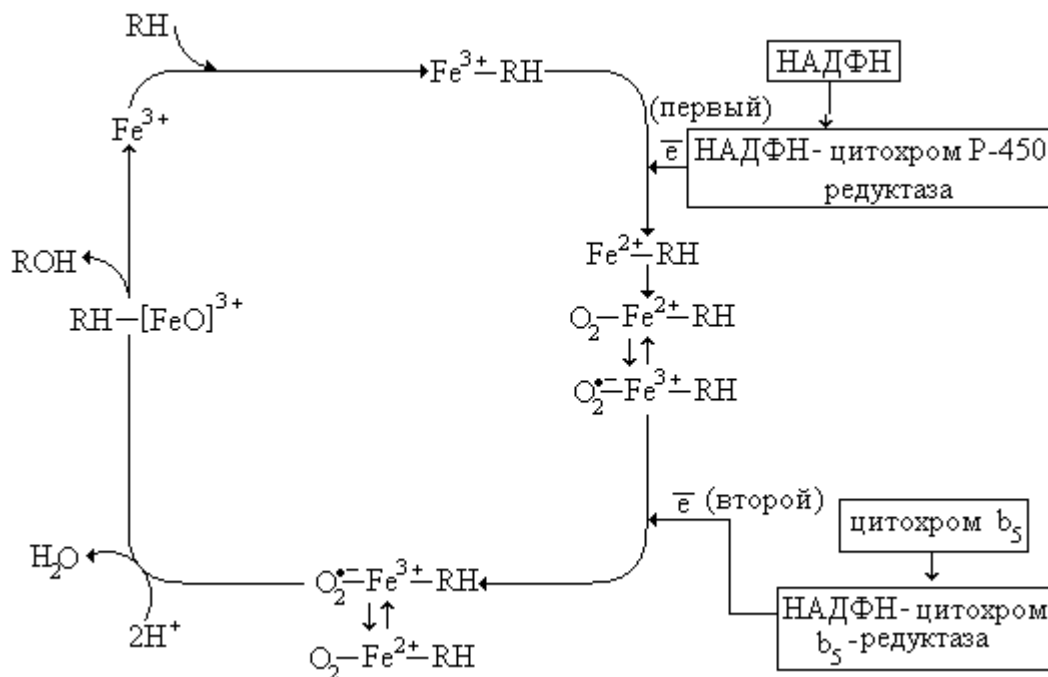


Рис. 14. Механизм гидроксирования в монооксигеназной системе

Схема Эстабука хорошо раскрывает механизм биотрансформации химических веществ при участии цитохромов и флавопротеидов, используя в качестве доноров электронов НАДФН и НАДН. Первый электрон, поступающий из НАДФН-зависимой цепи, участвует в восстановлении Fe^{2+} (вторая стадия). Второй электрон поступает из НАДН-зависимой цепи и расходуется на образование активированного комплекса в четвертой стадии процесса гидроксирования. Стехиометрия окисления НАДФН, потребления кислорода и выхода, гидроксированного продукта в большинстве случаев равна 1.

Недостатком этой схемы является отсутствие учета генерации свободных радикалов и в первую очередь супероксидного аниона ($O_2^{\bullet-}$) при функционировании микросомальных оксигеназ. Дело в том, что тройной фермент – субстрат – кислород комплекс (3 этап) до восстановления вторым электроном (4 этап) может вступить в обратимую реакцию превращения в окисленный фермент – субстратный комплекс $Fe^{2+} - S - O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} - S - O_2^{\bullet-}$, при этом генерируется супероксидный радикал, дающий в дальнейшем перекись водорода.

Установленные закономерности функционирования микросомальных оксигеназ получены при исследовании печени. В ней подвергается метаболизму две трети от общего количества экзогенных химических веществ, поступающих в организм. Микросомальные монооксигеназы обнаружены также в коже, легких, тонком кишечнике, почках, головном мозге и лимфоцитах. В клетках этих органов

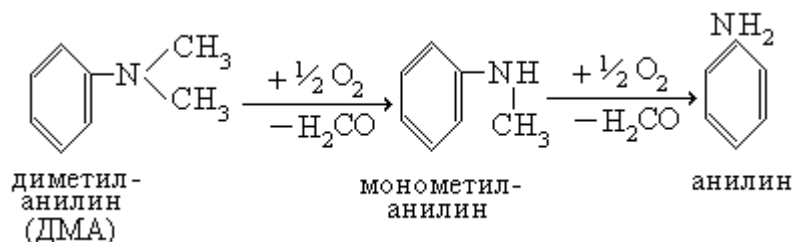
микросомальное окисление протекает менее интенсивно, однако имеет существенное значение при выполнении их специфических функций. В отличие от печени, цитохром Р-450 коры надпочечников находится в митохондриальной мембране, где происходит расщепление боковой цепи холестерина до прегненолона, а также гидроксирование различных стероидов в положении 11β.

МЕТАБОЛИЗМ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

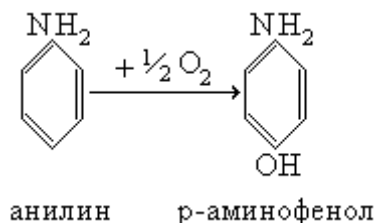
Ферментная система окисления ксенобиотиков в печени является местом обезвреживания самых разнообразных по своей природе химических соединений. К их числу относятся: большинство чужеродных для организма соединений; ряд эндогенных субстратов, среди которых следует отметить прежде всего насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты; стероидные гормоны, холестерол, желчные кислоты и простагландины.

К наиболее важным реакциям протекающим в мембранах ЭПР при участии цитохрома Р-450 относятся как гидроксирование, так и ряд других, которые будут рассмотрены ниже.

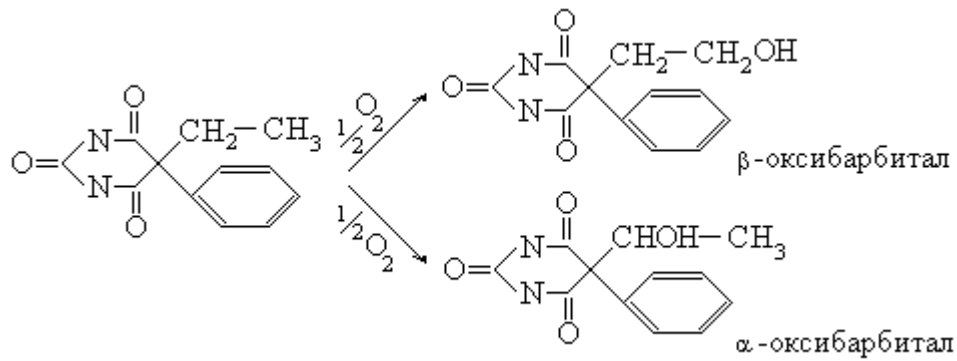
1. Деалкилирование алкилзамещенных аминов:



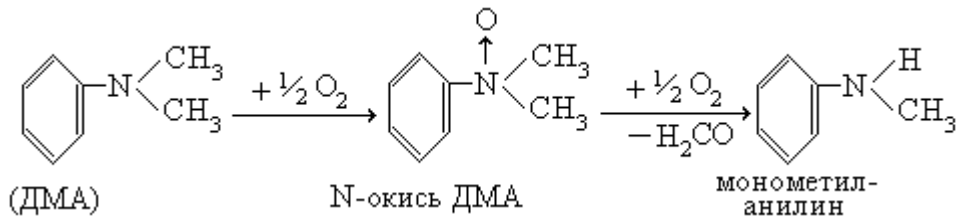
2. Гидроксирование циклических углеводов:



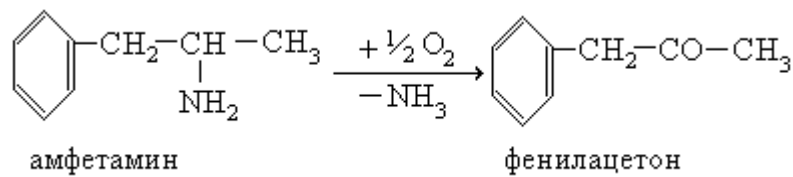
3. Гидроксилирование алифатических соединений



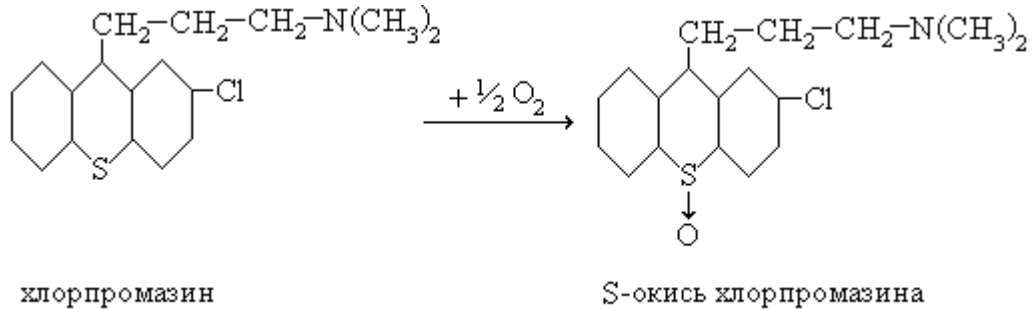
4. N-окисление



5. Окислительное дезаминирование

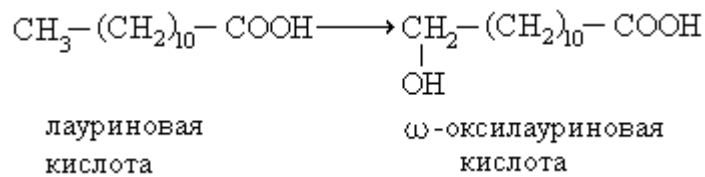


6. Сульфоокисление



ОКИСЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

1. ω-окисление природных жирных кислот



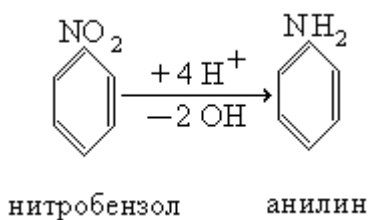
2. Гидроксилирование стероидных гормонов, холестерина и гема. Ферментная система ЭПР печени гидроксилирует стероидные гормоны в 2β-, 6β-, 7α- и 16α-положениях. Гидроксилирование холестерина протекает преимущественно в 7α-положении. 7α-гидроксилаза является, по-видимому, начальным звеном, лимитирующим скорость превращения стероидов и холестерина в желчные кислоты. Гемоксигеназа принимает участие в процессах окисления гема в билирубин. В реакции используются НАДФН и O₂; один из метеновых мостиков тетрапиррольной структуры гема окисляется, при этом от гема отщепляется железо, образуется биливердин, который затем восстанавливается в билирубин.

3. Перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот осуществляется в НАДФН-специфичной цепи. Эта редокс-цепь является местом биосинтеза простагландинов. Роль её в этом процессе сводится к образованию эндопероксидов, являющихся промежуточными соединениями образования простагландинов.

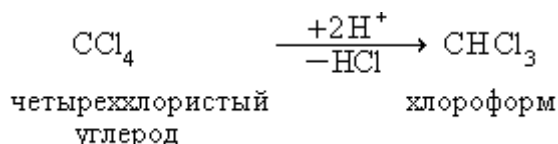
РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

При участии цитохрома Р-450 микросомы способны восстанавливать азокрасители и нитросоединения. В цепи окисления НАДФН, по-видимому, существуют два пункта сопряжения с реакциями восстановления: на уровне флавопротеида и на уровне цитохрома Р-450. Особое внимание эти реакции привлекают в связи с высокой канцерогенной активностью продуктов восстановления.

1. Восстановление нитросоединений



2. Восстановительное дегалогирование



НАДН-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ

1. При участии НАДН-цитохром b₅-редуктазы происходит реакция десатурации насыщенных жирных кислот с отщеплением одной молекулы воды и

образованием двойной связи. Таким путем идет образование олеиновой кислоты из стеариновой.

2. Эта же система может быть использована для окисления-восстановления аскорбиновой кислоты, причем реакция резко сдвинута в сторону восстановления семидегидроаскорбата в аскорбат.

3. Реакции гидроксирования. Цитохром b_5 участвует в реакциях гидроксирования кинуренина, фенолов, анилина.

РЕАКЦИИ КОНЪЮГАЦИИ

Все рассмотренные реакции составляют первую фазу биотрансформации липидорастворимых ксенобиотиков. Вторую стадию обезвреживания ксенобиотиков составляют реакции конъюгации, в результате которых гидроксированные соединения связываются с глюкуроновой и серной кислотами, глутатионом, глутамином и аминокислотами, подвергаются метилированию и ацетилированию. Вещество в целом становится более растворимым в воде, что облегчает его выведение из организма. Химическая модификация токсических веществ, как правило, снижает их токсичность.

ИНДУКТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ

МИКРОСОМАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ

При введении многих лекарственных веществ наблюдается увеличение активности цитохрома P-450. Самым распространенным индуктором цитохрома P-450 является фенobarбитал. При его введении (50–80 мг/кг массы) активность цитохрома

P-450 увеличивается в 4 раза через 4 дня, при этом наблюдается бурный рост ЭПР печени.

К числу индукторов относятся различные лекарственные средства: анальгетики (амидопирин), противовоспалительные средства (бутадион), гипогликемические препараты (букарбан), антигистаминные (димедрол), антитуберкулезные средства (рифампицин), транквилизаторы (седуксен), стероиды (тестостерон, гидрокортизон, преднизолон). К индукторам относятся также инсектициды и канцерогены. Все индукторы являются субстратами гидроксирования. По характеру действия различают индукторы широкого и узкого спектра действия. К первой группе относятся фенobarбитал и другие барбитураты, хлорированные углеводороды, в том числе ДДТ. Индукторы этой

группы обладают способностью увеличивать содержание цитохрома P-450 и активность НАДФН-цитохром P-450-редуктазы, стимулировать процессы окисления, восстановления и реакции глюкуронидной конъюгации. К индукторам второй группы относится метилхолантрен. Этот вид индукторов вызывает появление в микросомальной фракции цитохрома P-448. Комбинированное действие индукторов, например, фенobarбитала и антипирина, дает более выраженный эффект, нежели раздельное применение этих соединений. Однако такие сочетания не всегда дают суммирование эффектов. Так, при введении фенobarбитала и эстрадиола не наблюдается дополнительной активации цитохрома P-450. Однако введение гормона через некоторое время после введения фенobarбитала также дает суммирование эффектов. Причиной этому являются, по-видимому, конкурентные отношения между ними.

При связывании с цитохромом P-450 субстраты гидроксилирования изменяют дифференциальный спектр поглощения. В соответствии с типами субстратов сдвиг спектра может быть двух типов:

1. Субстраты 1 типа, к которым относятся гексобарбитал, амидопирин, фенobarбитал, дают спектр с максимумом поглощения при 390 нм и минимумом 420–425 нм.

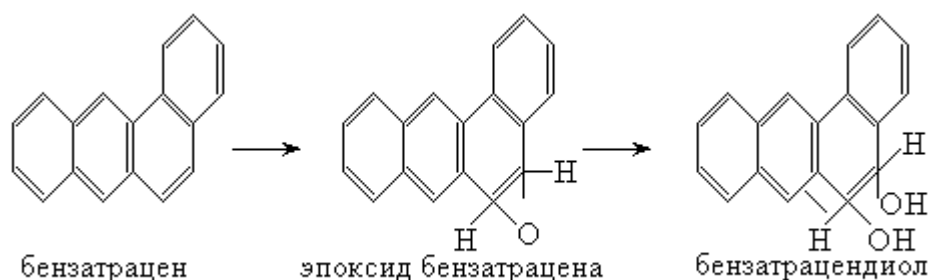
2. Второй тип спектральных изменений наблюдается при взаимодействии с субстратами второго типа с максимумом при 425–435 нм и минимумом 390–400 нм. К ним относятся анилин, метилхолантрен.

К числу ингибиторов относятся: 1) обратимые ингибиторы прямого действия – эфиры; спирты, кетоны, антиоксиданты; 2) обратимые ингибиторы непрямого действия – производные бензола, ариламины, алкиламины; 3) необратимые ингибиторы – алканы, олефины, меркаптиды; 4) тормозящие синтез или ускоряющие распад цитохрома P-450 – ионы металлов, ингибиторы белкового синтеза. Так, четыреххлористый углерод относится к необратимым ингибиторам, уменьшает содержание цитохрома P-450 и тормозит процесс гидроксилирования. При взаимодействии с цитохромом P-450 CCl_4 образуется радикал CCl_3^\bullet , который вызывает деструкцию цитохрома P-450. Действие ионов металлов направлено, в основном, на гем цитохрома P-450. При включении ионов кобальта в протопорфирин образуется неактивное соединение, лишенное каталитических свойств цитохрома P-450.

ТОКСИФИКАЦИЯ И ДЕТОКСИКАЦИЯ

В процессе биотрансформации ксенобиотиков происходит их модификация, в результате которой продукты гидроксилирования могут быть более токсичными, чем исходные субстраты (токсификация) или они становятся менее токсичными (детоксикация). Токсификация очень часто является причиной химического канцерогенеза, примером которого является рак кожи у трубочистов. Этот факт объясняется постоянным контактом с каменноугольной смолой и сажей. В 30-х годах из смолы был выделен бензантрацен и другие полициклические углеводороды.

Бензантрацен в организме подвергается гидроксилированию на цитохроме Р-450, в качестве промежуточного соединения, при этом образуется эпоксид бензантрацена. Эпоксиддегидратаза, локализованная рядом с цитохромом Р-450, превращает его в бензантрацендиол.

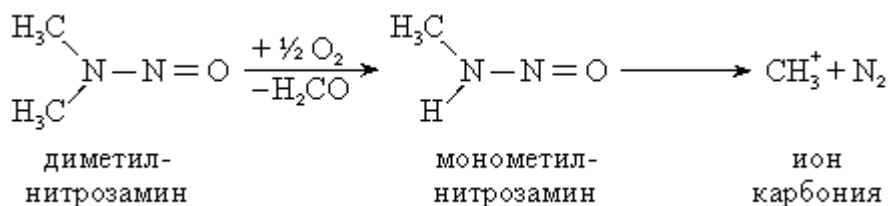


Бензантрацендиол является более полярным веществом, оно всплывает из гидрофобной области, вновь вступает во взаимодействие с цитохромом Р-450 и вторичный метаболит является более активным канцерогеном, чем сам бензантрацен.

К канцерогенам, подвергающимся гидроксилированию, могут быть отнесены производные бензпирена, нафтохиноны, ароматические амины. Это так называемые суицидные субстраты (несущие смерть).

Афлатоксины, продукты плесневого гриба *Aspergillus flavus* наиболее сильные из известных канцерогенов: даже однократное введение их вызывает рак печени у экспериментальных животных. Канцерогеном является эпоксид афлатоксина, образующийся в печени. Эпоксиды обладают высокой химической активностью и алкилируют ДНК, РНК, белки.

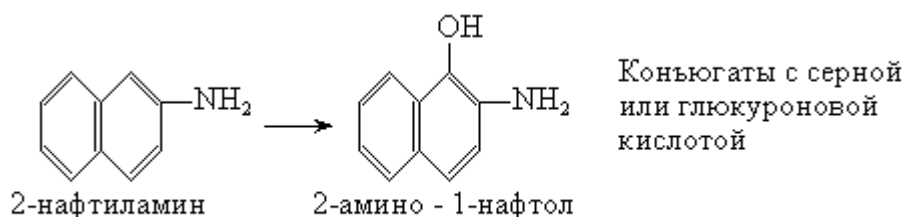
Метаболизм нитрозаминов в микросомальной системе окисления приводит к образованию высокоактивного иона карбония:



Ион карбония может метилировать нуклеиновые кислоты и белки.

Нитрозамины индуцируют злокачественные опухоли в печени, почках, легких, желудке, пищеводе. Индукция развития опухоли происходит, как правило, при длительном и неоднократном контакте с канцерогеном.

Система детоксикации включает в себя не только механизмы первой фазы биотрансформации, в результате которой образуются реакционноспособные метаболиты различной токсичности, но и механизмы второй фазы, объединяющие *реакции конъюгации*. Часто реакции конъюгации обезвреживают продукты гидроксилирования. Так, ароматические амины, используемые в производстве анилиновых красителей, являются преканцерогенами.



При гидроксилировании 2-нафтиламина в печени образуется 2-амино-1-нафтол, являющийся канцерогеном. Взаимодействие канцерогена с серной или глюкуроновой кислотой во второй фазе биотрансформации дает безвредные конъюгаты, которые выводятся с мочой. Однако при повторяющихся контактах человека с нафтиламином и при производстве красителей может развиваться рак мочевого пузыря. Причиной этого является расщепление конъюгатов гидролазами, содержащимися в небольшом количестве в моче, и образование вновь 2-амино-1-нафтола, который при постоянном контакте вызывает раковое перерождение клеток мочевого пузыря.

ТОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Процесс химического канцерогенеза является примером токсического повреждения клетки. В ряде случаев под влиянием индукторов микросомального

окисления, когда образуются нетоксичные продукты гидроксилирования, усиливается генерация активных форм кислорода и образование перекиси водорода. Тогда продукты перекисного окисления определяют исход токсического действия. К этим веществам относится аллоксан, образующий через диалуровую кислоту, в качестве промежуточного вещества, семихиноны и супероксидные радикалы, обуславливающие его цитотоксическое действие, гербициды, антибиотики антрациклинового ряда, доксорубицин, нитросоединения, входящие в состав лаков и красок. Свободные радикалы, сопровождающие процессы взаимодействия этих веществ с цитохромом P-450, вызывают повреждение ДНК, оказывают цитостатическое, мутагенное или канцерогенное действие.

Механизм токсического действия *четырёххлористого углерода* связан с его непосредственным действием на микросомальные оксигеназы. Введенный в организм CCl_4 растворяется во всех мембранных элементах печеночной клетки. Решающее значение имеет связывание тетрахлорметана с цитохромом P-450. Быстро протекающая реакция восстановления приводит к образованию радикала CCl_3^\bullet , что является пусковым звеном в механизме токсического действия CCl_4 . Соединения, индуцирующие активность НАДФН-специфичной цепи (ДДТ, фенобарбитал, бензпирен) резко усиливают токсическое действие тетрахлорметана. Стимулирование процессов перекисного окисления при образовании CCl_3^\bullet приводит к повреждению мембран ЭПР. Возможно, что страдают также мембраны других внутриклеточных структур, в частности лизосом. В мембранах эндоплазматической сети нарушаются процессы синтеза белка и липопротеинов, инактивируется глюкозо-6-фосфатаза. "Мембранный эффект", возникающий при этом играет решающую роль в гибели гепатоцитов. Механизм повреждения цитохрома P-450 при действии CCl_4 А.И. Арчаков назвал "летальным распадом". Итак, токсический тип повреждения клетки связан с процессами превращения чужеродных веществ в мембранах ЭПР с участием монооксигеназных систем (рис. 15).

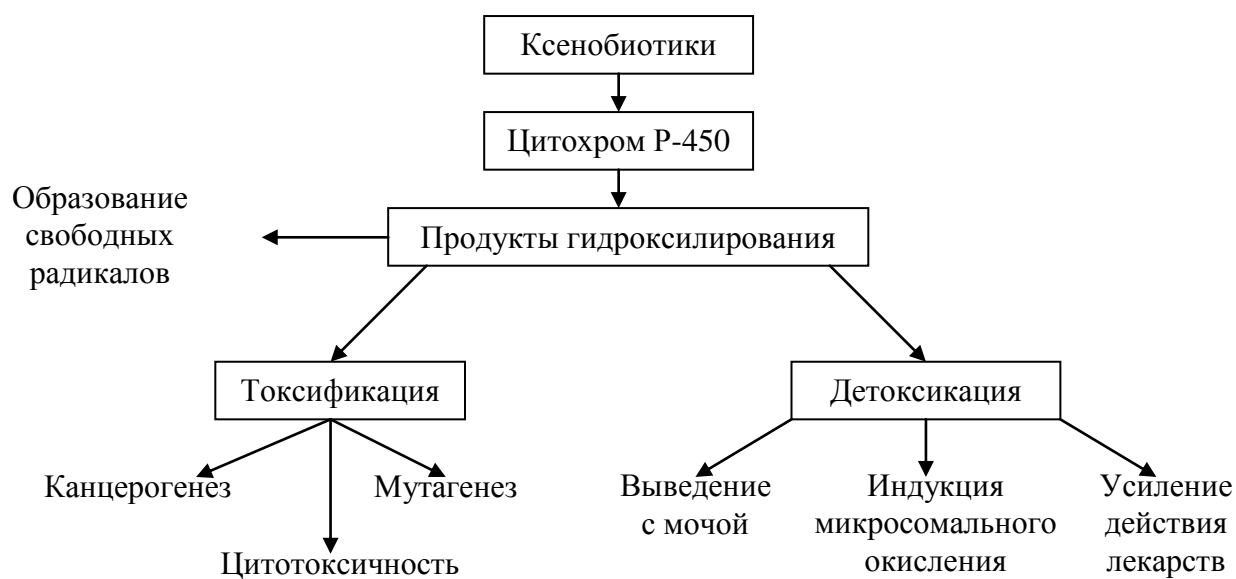


Рис. 15. Токсический тип повреждения клетки

МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ИММУННАЯ СИСТЕМА

Изучение механизмов инактивации ксенобиотиков выявило связь иммунной системы и микросомального окисления. В лаборатории И.Е. Ковалева было показано, что индукция цитохрома Р-450, связанная с возрастанием синтеза ферментативного белка, происходит только с помощью соединений, не имеющих в организме (химических, лекарственных веществ). Активация цитохрома Р-450 при повторном введении индуктора осуществляется более интенсивно. Если изменить структуру индуктора цитохрома Р-450, например, введя в молекулу алкилирующий агент, то такие ксенобиотики уже не смогут взаимодействовать с активным центром цитохрома Р-450, они становятся «добычей» иммунной системы. И.Е. Ковалеву удалось выработать антитела к альбумину, связанному с каким-либо гаптенем (измененный субстрат гидроксилирования). Такой образовавшийся в организме конъюгированный антиген индуцирует иммунный ответ и обеспечивает дополнительную защиту от низкомолекулярного потенциально опасного вещества. Клетки печени, которые очень интенсивно окисляют ксенобиотики, синтезируют альбумин. Хорошо известно, что именно альбумин играет роль детоксицирующего белка, связывающего различные соединения. Комплекс альбумина с измененным субстратом гидроксилирования представляет антиген. По мнению П.В. Сергеева печень и лимфоидная ткань осуществляют детоксикацию в тесном взаимодействии. В мембранах ЭПР печени осуществляется обезвреживание низкомолекулярных ксенобиотиков, лимфоциты участвуют в защите от высокомолекулярных

соединений. Кроме того, лимфоидная ткань сама содержит монооксигеназную систему и ферменты второго этапа биотрансформации. Следовательно, иммунокомпетентные клетки могут одновременно обеспечивать элиминацию из организма высоко- и низкомолекулярных чужеродных соединений.

ГЛАВА 6. МИТОХОНДРИИ

ФУНКЦИИ И СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии – внутриклеточные органеллы, выполняющие важнейшую роль обеспечения клетки и всего организма достаточным количеством энергии АТФ. В зависимости от функции тех или иных клеток количество митохондрий в них может варьировать от одной (в виде митохондриального синцития в мышечной клетке) до 100 и выше.

Основные функции митохондрий:

1. синтез АТФ, энергообеспечение клетки;
2. осуществление комплекса реакций энергетического обмена и регуляции интенсивности этих процессов;
3. образование в митохондриях различных субстратов (ацетил КоА, дикарбоновых и трикарбоновых кислот), необходимых для многочисленных процессов (синтез липидов, синтез гема и др.);
4. интегрирование всех метаболических процессов на пути биологического окисления в митохондриях;
5. хранение генетической информации, наличие собственного генома митохондрий.

Основная структурная особенность митохондрий – это наличие двух мембран – внешней (70 А) и внутренней (50–55 А). Отличительным признаком внешней мембраны является относительно высокое содержание холестерина и фосфолипидов (особенно фосфатидилинозитола), количество которых в 1,8 – 3,0 раза выше, чем во внутренней мембране.

Во фракции внешней мембраны 3 из 14 полипептидов с молекулярной массой от 27 000 до 46 000 дальтон составляют более половины всего мембранного белка. Внутренняя митохондриальная мембрана более богата дифосфатидилглицеролом. Она содержит около 33 полипептидов с молекулярным весом от 10 000 до 80 000 дальтон, которые расположены в мембране асимметрично.

Наружная мембрана не имеет складок и перегибов в отличие от внутренней мембраны, которая для увеличения площади своей поверхности образует большое число внутренних складок – крист, менее выраженных в ткани печени и более рельефных в миокарде и почках. Около 25% общего белка внутренней мембраны составляют ферменты, участвующие в функционировании системы переноса электронов и окислительного фосфорилирования. Оставшаяся часть белков вместе с

липидами поддерживает структуру мембраны. Внутреннее пространство митохондрий, заполнено матриксом – студнеобразной полужидкой массой состоящей на 50% из белка.

Содержание белка во внешней мембране – 4%, межмембранном пространстве – 6%, внутренней мембране – 21%, матриксе – 69%.

В толще внутренней мембраны на разном удалении от ее поверхности асимметрично в виде связанных друг с другом белково-ферментных комплексов I, II, III, IV и V располагаются ферменты, которые с помощью FeS-белковых центров участвуют в функционировании систем переноса электронов и процессах окислительного фосфорилирования. Комплексы дыхательной цепи получены с помощью воздействия на мембрану детергентов, которые разделяют все функциональные элементы дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования на отдельно функционирующие компоненты:

- Комплекс I – НАД/КоQ оксидоредуктаза (НАД/НАДН дегидрогеназа+КоQ)
- Комплекс II – Сукцинат/КоQ оксидоредуктаза
- Комплекс III – КоQ 2H /цитохром с оксидоредуктаза (КоQ, цит b, цит c₁, цит c)
- Комплекс IV – Цитохром с/кислород оксидоредуктаза (включает цит c, цит a + цит a₃)
- Комплекс V – АТФ-аза – фермент синтеза и гидролиза АТФ

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

К настоящему времени в митохондриях обнаружено более 100 ферментов. Точные сведения о локализации многих из них пока отсутствуют. Не вполне понятно отношение некоторых из этих ферментов к основным метаболическим процессам, протекающим в митохондриях. Поэтому мы ограничимся констатацией только основных закономерностей в распределении ключевых ферментативных систем между отдельными частями митохондрии (табл. 9).

Для каждой из мембран существуют ферменты-маркеры, которые позволяют определять чистоту выделения митохондриальных фракций. Как правило, это мембранно-связанные ферменты, а для матрикса и межмембранного пространства – ферменты, растворенные в их жидкой фазе.

Компартментализация ферментов митохондрий

Наружная мембрана
* Моноаминоксидаза Кинуренингидроксилаза НАДН цитохрома с редуктаза, нечувствительная к ротенону Гексокиназа Ферменты липидного метаболизма: Тиокиназы жирных кислот Ацетил–КоА синтетаза для жирных кислот с длинными цепями Ферменты элонгации жирных кислот Ферменты синтеза жирных кислот de novo Фосфолипаза A ₂ Ферменты, ацетилирующие глицерофосфат, лизофосфатидилхолин Ферменты, присоединяющие фосфат холина к диглицеридам
Пространство между мембранами
Креатинфосфокиназа * Аденилаткиназа Нуклеозиддифосфаткиназа
Внутренняя мембрана
FeS–белки Ферменты пируватдегидрогеназного комплекса; Цитохромы дыхательной цепи – b, c, c ₁ , входящие в состав ферментных комплексов I, II, III, IV; * Цитохром–с–оксидаза; Ферменты дыхательной цепи (НАДН – дегидрогеназа) Дегидрогеназы α–кетокислот Сукцинатдегидрогеназа Глицерофосфатдегидрогеназа β–оксибутиратдегидрогеназа Карнитин–ацетилтрансфераза Транслоказы АТФ–аза и ее компоненты
Матрикс
Цитрат–синтетаза Аконитаза Изоцитратдегидрогеназа * Малатдегидрогеназа α–кетоглутаратдегидрогеназа * Глутаматдегидрогеназа Аспаратаминотрансфераза Пируваткарбоксилаза Фумараза Ферменты активации жирных кислот Ферменты цикла β–окисления жирных кислот Нарастивание цепи при синтезе жирных кислот происходит за счет обратимых реакции β–окисления

*) маркеры митохондриальных компартментов

Так, маркерным ферментом внешней митохондриальной мембраны является *моноаминоксидаза* – флавопротеин, катализирующий окисление различных аминов, в частности, триптамина (продукт декарбоксилирования триптофана).

Маркером внутренней мембраны является *цитохром-с-оксидаза*, конечный фермент дыхательной цепи. Цитохром-с-оксидаза представляет собой комплекс погруженных в мембрану цитохромов а и а₃, с помощью которых происходит перенос электронов с цитохрома с на кислород.

Маркерными ферментами матрикса является *малатдегидрогеназа* – НАД-зависимый фермент ЦТК, катализирующий окисление L-малата в оксалоацетат. Следует отметить, что клетки высших организмов содержат две формы малатдегидрогеназы, одна из которых локализована в митохондриях, другая – в цитозоле. Поэтому для матрикса существует еще один маркер – *глутаматдегидрогеназа*, играющая центральную роль в процессе дезаминирования аминокислот и катализирующая НАД или НАДФ - зависимое окислительное дезаминирование глутаминовой в α-кетоглутаровую кислоту .

Жидкость межмембранного пространства принято маркировать по присутствию в ней *аденилаткиназы*, катализирующей перенос фосфатной группы с АТФ или АДФ на другие нуклеозидфосфаты, направляя таким способом высокоэнергетические фосфатные группы на различные биосинтетические пути.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ

Наружная и внутренняя мембраны митохондрий обладают различной проницаемостью. Через наружную мембрану легко проникают большинство растворенных низкомолекулярных метаболитов. Внутренняя мембрана митохондрий проницаема только для ограниченного ряда нейтральных молекул, которые попадают внутрь митохондрий путем обычной физической диффузии: вода, мочевины, глицерин, этанол и жирные кислоты, имеющие в своем составе до 10 углеродных атомов.

Внутренняя мембрана непроницаема для катионов и анионов, сахаров, большинства аминокислот. Она непроницаема для пиридиннуклеотидов – НАД, НАДН, НАДФ, НАДФН, адениловых нуклеотидов, нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатов, а также для КоА и его эфиров.

Для переноса протона через мембрану и тем самым объединения восстановленных и окисленных пулов пиридиннуклеотидов существует ряд

обходных шунтирующих челночных механизмов, так называемых водород – переносящих митохондриальных шунтов – глицерофосфатный, малатный, оксibuтиратный, где протон переносится через мембрану в виде различных метаболитов. Во взаимодействии субстратных пулов цитозоля и митохондрий принимают участие специализированные ферменты, расположенные снаружи и внутри митохондрий. К ним относится цитозольный и внутримитохондриальный "малик"-фермент, превращающий малат в пируват. Перенос метаболитов через митохондриальную мембрану в обоих направлениях происходит с участием набора специальных белковых переносчиков (транслоказ), присутствующих во внутренней митохондриальной мембране и работающих по принципу специфического обменного транспорта. Ниже приведены примеры транслоказ.

ТРАНСЛОКАЗЫ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ

1. *Транслоказа адениловых нуклеотидов* выносит из митохондрий АТФ в обмен на АДФ;
2. *Транслоказа фосфата* транспортирует фосфат внутрь митохондрий в обмен на выход из митохондрий гидроксила или одновременно с входом протона;
3. *Транслоказа дикарбоксилатов* обменивает малат на фосфат;
4. *Транслоказа пирувата* переносит пируват в обмен на выход из митохондрий ОН⁻ (антипорт) или на вход в митохондрию Н⁺ (симпорт);
5. *Транслоказа трикарбоксилатов* обменивает цитрат, изоцитрат аконитат и декарбоксилаты сукцинат, ФЭП (но не фумарат, оксалоацетат, α-кетоглутарат) на малат, требующий с свою очередь, транспорта фосфата;
6. *Транслоказа α-кетоглутарата* транспортирует этот субстрат в обмен на малат;
7. *Транслоказа глутамата* транспортирует глутамат в обмен на фосфат и аспарат;

Благодаря этой специфической особенности внутренней мембраны, во внутреннем пространстве имеется пул коферментов и нуклеотидов, физически и функционально отделенный от немитохондриального (цитозольного).

Кроме того, митохондрии способны поддерживать постоянный уровень ионов К⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, которые попадают внутрь митохондрий путем специальных переносчиков (к примеру, К⁺/Н⁺, Са²⁺/Н⁺-обменников), расположенных во внутренней митохондриальной мембране. Молекулярная природа данных переносчиков и детальный механизм их оперирования до настоящего момента продолжает оставаться не изученной. Известно лишь, что процесс транспорта ионов

металлов в митохондриях является энергозависимым и требует сопряженного переноса электронов через мембрану.

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ

Во внутренней мембране расположен белковый комплекс АТФ-азы, в котором за счет использования протонного градиента происходит процесс синтеза АТФ. АТФ-аза состоит из белкового протонного канала – фактора F_0 , расположенного внутри мембраны и комплекса семи белковых субъединиц, объединенных в ферментный фактор АТФ-азы – фактор F_1 , обращенный внутрь митохондриального матрикса.

Согласно хемиосмотической гипотезе Питера Митчела (P.Mitchel, 1961–1965) на комплексе переносчиков и ферментов дыхательной цепи ввиду их асимметричного расположения в плоскости внутренней мембраны митохондрий происходит окисление полученных в ходе процессов ЦТК восстановленных форм НАД и ФАД (НАДН и ФАДН). При этом начинается перенос электронов по дыхательной цепи на их конечный акцептор – кислород.

Во время транспорта по цепи дыхательных ферментов–переносчиков электроны шесть раз пересекают пространство внутренней митохондриальной мембраны. При этом в трех пунктах данный процесс сопровождается одновременным выходом шести (по два протона в каждом пункте) ионов водорода из митохондриального матрикса на наружную поверхность внутренней мембраны митохондрий – в межмембранное пространство.

Первый пункт транспорта протонов "наружу" располагается в белковом канале ФМН–зависимой НАДН-дегидрогеназы (комплекс I), второй пункт транспорта протонов функционирует за счет челночных движений в мембране убихинона – КоQ (комплекс III) и, наконец, третий пункт транспорта протонов образован каналом белковых субъединиц цитохромоксидазы (комплекс IV) и является самой мощной протонной помпой дыхательной цепи.

В межмембранном пространстве, на наружной поверхности внутренней мембраны, которая обладает полным отсутствием проницаемости для протонов, создается существенная концентрация ионов водорода. Именно этот протонный градиент и используется для синтеза АТФ в АТФ-азе в соотношении: одна молекула АТФ на два пропущенных через АТФ-азу иона водорода.

ГИПОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

В отсутствие кислорода или при его недостатке (гипоксия) процессы транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий тормозятся, что приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и снижению концентрации АТФ. При тканевой гипоксии, обусловленной разобщением процессов окисления и фосфорилирования, значительная часть энергии рассеивается в виде тепла и не может использоваться для нужд клетки.

Нарушение энергопродукции приводит к угнетению, прежде всего, анаболических реакций клетки, протекающих с участием АТФ, и развитию необратимых процессов. В организме человека в отсутствие процесса аэробного образования АТФ весь запас АТФ расходуется в течение 1 минуты. Анаэробный процесс энергообеспечения при этом абсолютно недостаточен. Гликолиз лишь усугубляет патологический процесс усилением накопления молочной кислоты и приводит к развитию лактатацидоза. Наиболее чувствительны к недостатку кислорода клетки нервной системы, миокарда. Прекращение снабжения мозга кислородом в течение 2,5–3 мин сопровождается появлением очагов некроза в коре головного мозга. Через 3–4 мин после нарушения доставки кислорода перестает сокращаться сердечная мышца.

В случае локальной гипоксии, связанной с нарушением обеспечения ткани кислородом, в сетчатке глаза, слуховом анализаторе, мозге, миокарде, скелетной мышце развиваются слепота, глухота, энцефалопатии, инфаркт миокарда. Полная гипоксия, возникающая при быстром отравлении угарным газом, цианидами, приводит к ингибированию образования АТФ, вследствие чего наступает практически мгновенная смерть.

Повреждающее действие на клетки оказывают продукты перекисного окисления липидов, которое в условиях гипоксии усиливается. Известно, что повышение концентрации O_2 в цитоплазме может способствовать развитию реакций ПОЛ. Однако установлено, что при гипоксии образование перекисей липидов происходит в 2,5 раза быстрее, чем в атмосфере воздуха. Считается, что при гипероксии активация ПОЛ является следствием избытка акцептора электронов – кислорода, а при гипоксии – результатом избытка доноров электронов – восстановленных переносчиков. Обе эти возможности активации ПОЛ могут следовать друг за другом, например, при ишемии с последующей реоксигенацией.

В качестве яркого примера проявления недостаточного снабжения организма энергией АТФ может быть рассмотрен ряд наследственных нарушений митохондриального генома с последующим повреждением тканей, органов и их функций.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ

Митохондрии имеют собственный генетический код, отличающийся от универсального, используемого ядерной ДНК.

Митохондриальный геном человека был идентифицирован в 1960 году и расшифрован группой Frederick Sanger (1981). Митохондриальная ДНК человека расположена в матриксе митохондрий (М-хромосома), представляет собой необычайно компактную двухцепочечную кольцевую молекулу, составленную из 16 569 основных нуклеотидных пар (рис. 16). Содержит 37 генов, 13 из которых кодируют:

- 7 единиц комплекса I дыхательной цепи (НАДН дегидрогеназа– коэнзим Q оксидоредуктаза);
- 1 субъединицу комплекса III (коэнзим Q – цитохром С оксидоредуктаза);
- 3 субъединицы комплекса IV – цитохром С оксидаза;
- 2 субъединицы комплекса V (АТФ синтетаза).

Все эти комплексы также содержат субъединицы, которые кодируются ядерными генами, синтезируются на рибосомах и затем последовательно импортируются в митохондрию. Комплекс II дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа – коэнзим Q оксидоредуктаза), кодируется только генами клеточного ядра.

Остальные 24 гена, закодированные в ДНК митохондрий, требуются для процесса трансляции белков на собственных митохондриальных рибосомах, причем 22 из 24 генов кодируют транспортные РНК (тРНК) и 2 кодируют рибосомальные РНК (рРНК). На рис. 16 показаны гены 12S и 16S рибосомальной РНК, а также представлена локализация некоторых патогенных точечных мутаций и типичных делеций митохондриальной ДНК.

Клинический диагноз митохондриальных болезней долгое время основывался на:

- биохимические признаки (молочнокислый ацидоз и дефицит функционирования дыхательной цепи);

– отклонения в морфологических особенностях мышц, наиболее выраженными из которых является присутствие "неровных красных нитей" ("ragged red fibers" – RRF).

С 1988 года для диагностики митохондриальных болезней используют методы молекулярной генетики.

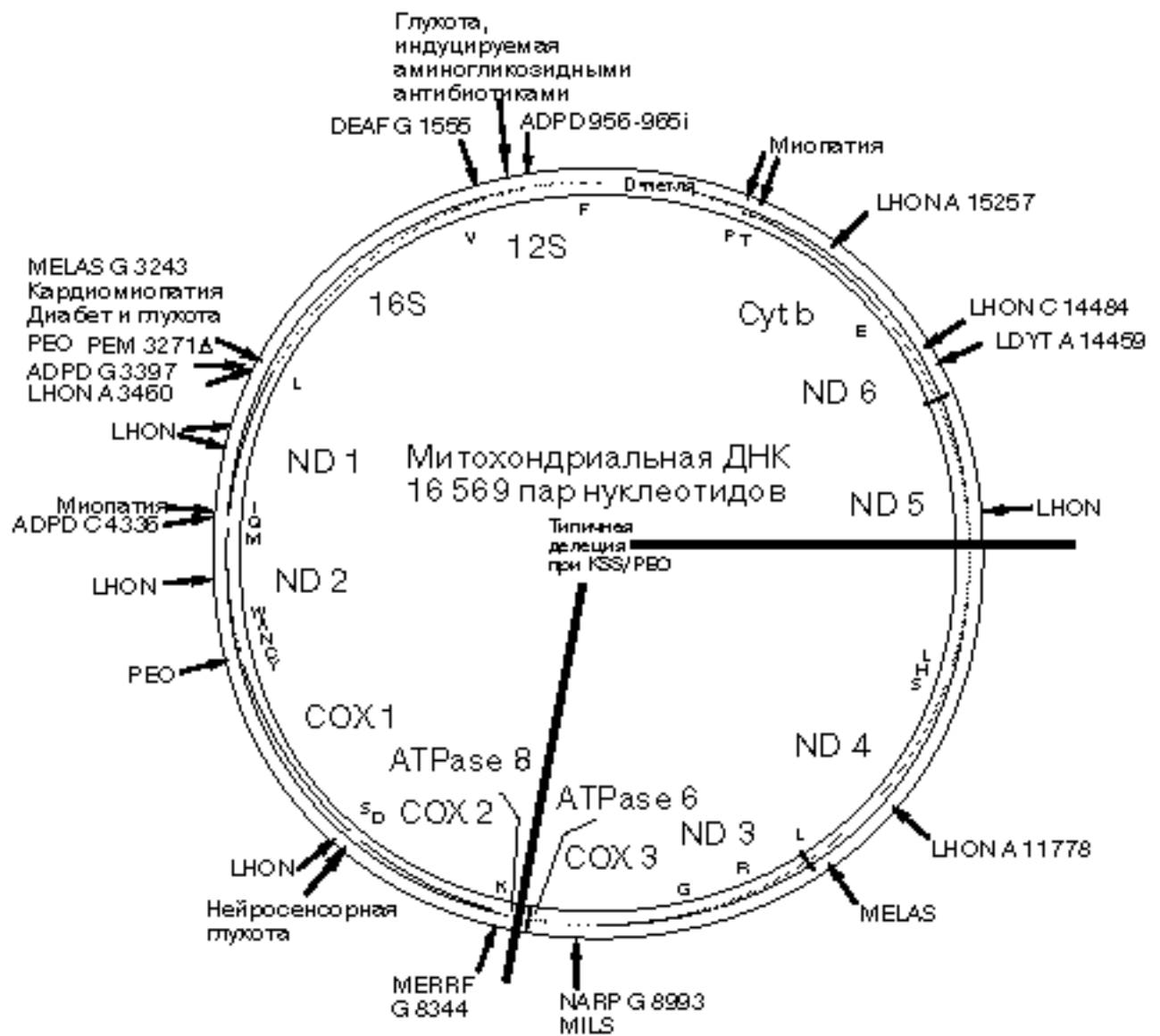


Рис. 16. Митохондриальный геном человека

Условные обозначения генов и кодируемые ими элементы:
 ND1-6 - субъединицы комплекса I дыхательной цепи;
 Cyt b - субъединицы комплекса III дыхательной цепи;
 COX 1-3 - субъединицы комплекса IV дыхательной цепи;
 ATPase 8, 6 - субъединицы комплекса V дыхательной цепи;
 12S, 16S - рибосомальные РНК.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

К митохондриальным болезням относятся биохимические нарушения, связанные с генетическими дефектами митохондриальных функций и приводящие к развитию особых клинически особых патологий.

В 1960 году Rolf Luft и Lars Ernster описали пациентку, которая была очень худой, чрезвычайно много ела и, кроме того профузно потела даже в холодную погоду. Процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях этой больной были "разобщены". При этом непревращенная в АТФ энергия рассеивалась в виде тепла. Заболевание было причислено к патологии митохондриальной мембраны и названо синдромом Люфта.

После открытия синдрома Luft было установлено значительное количество патологий функционирования митохондрий. Все митохондриальные болезни можно разделить на 5 типов (табл. 10).

ПОСЛЕДСТВИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ МИТОХОНДРИЙ. Douglas Wallace и его сотрудники в 1988 году описали матерински наследуемые точечные мутации у пациентов, страдающих редким офтальмологическим нарушением – наследственной нейропатией зрительных нервов Leber ("Leber's hereditary optic neuropathy" LHON). Эта точечная мутация в генах ND4, ND1 или ND5, кодирующих субъединицы комплекса I или в гене цитохрома b (комплекс III), сопровождается билатеральной потерей зрения в молодом возрасте.

После этого были обнаружены почти три десятка других мутаций, связанных с проявлением симптомов болезни LHON. Интересно, что все исследованные мутации, вызывающие LHON, находятся у пациентов в полипептид-кодирующих генах для субъединиц комплексов I, III или IV дыхательной цепи. Клинические признаки при точечных мутациях различной локализации существенно не различаются. Считают, что развитие болезни Leber обусловлено общим изменением обмена энергии в митохондриях.

К этой же группе заболеваний может быть отнесено развитие пигментного ретинита NARP ("neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa" – нейропатия, атаксия и пигментный ретинит), при котором происходит нарушение метаболизма в сетчатке глазного дна. У пациентов также наблюдается задержка общего развития, умственная отсталость, нейрогенная мышечная слабость с отсутствием типичной митохондриальной миопатии.

Развитие пигментного ретинита NARP вызвано наличием точечной мутации гена шестой субъединицы H^+ -АТФ-азы, что приводит к замене гидрофобной аминокислоты лейцина на гидрофильную – аргинин. Выраженность клинических признаков при этом заболевании коррелирует с количеством мутантной мхДНК.

Таблица 10

Митохондриальные болезни человека

1. Миссенс–мутации (аминокислотные замены в комплексах дыхательной цепи):	
LHON	– нейроофтальмопатия Leber (Лебера)
LDYT	– нейроофтальмопатия Leber (Лебера) с дистонией
RP	– пигментный ретинит
PEM	– синдром Leigh (Лейха) прогрессирующей разрушительной митохондриальной энцефалопатии
NARP	– нейропатия, атаксия и пигментный ретинит
2. Мутации в генах тРНК:	
MERRF	– синдром MERRF (миоклональная эпилепсия с особыми гистохимическими проявлениями в скелетных мышцах, RRF)
MELAS	– синдром MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия с лактатацидозом и паралич-подобными эпизодами)
3. Делеции или дупликации участков митохондриальной ДНК:	
PEO	– наружная офтальмоплегия
KSS	– синдром Kearns–Sayre (Кернса–Сайера)
	– синдром Pearson (Пирсона)
	– изолированный двусторонний асимметричный птоз
	– двусторонний птоз, сочетающийся с офтальмопарезом и слабостью мышц нижних конечностей
	– дилатационная кардиопатия
4. Мутации, уменьшающие число копий митохондриальной ДНК:	
MILS	– летальная инфантильная дыхательная недостаточность
MLAS	– синдром молочнокислого ацидоза
5. Мутации в генах рРНК:	
DEAF	– нейросенсорная глухота
ADPD	– болезнь Альцгеймера/болезнь Паркинсона
	– развитие глухоты в ответ на употребление аминогликозидных антибиотиков (каномидин и гентамицин)
	– развитие резистентности к токсическому влиянию хлорамфеникола

ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕЛЕЦИЙ В ГЕНОМЕ МИТОХОНДРИЙ. Крупные делеции (выпадения) мхДНК обычно блокируют транскрипцию всех митохондриальных генов дыхательной цепи, а также тРНК. Заболевания, вызванные делециями, прогрессируют с возрастом. Ian Holt и его коллеги идентифицировали пациентов с клиническими биохимическими и морфологическими особенностями митохондриальной болезни, генетические проявления которой заключались в гигантских делециях мхДНК. Делеции возникают спонтанно и обнаруживаются у пациентов с прогрессирующей экстраофтальмоплегией РЕО ("progressive external ophthalmoplegia"), сопровождаемой параличом экстраокулярных мышц, включая птоз. Одиночные либо мультисистемные нарушения при синдроме Kearns–Sayre ("Kearns–Sayre syndrome" – KSS) проявляются в хронической офтальмоплегии РЕО в сочетании с нарушением сердечного ритма, пигментной дегенерацией сетчатки.

Помимо делеций в мхДНК обнаруживаются крупные перестройки, связанные с дупликацией митохондриального генома. При митохондриальных миопатиях и множественных поражениях других органов и систем (повреждение кожи, диарея, инсулинзависимый сахарный диабет, атаксия, глухота, слепота, психомоторная задержка развития) выявлены две формы мхДНК – полноразмерная и делетированная, соединенные с различными областями генов. Было обнаружено, что дупликация мхДНК также может приводить к появлению KSS и РЕО.

МУТАЦИИ В ГЕНАХ ТРАНСПОРТНЫХ РНК МИТОХОНДРИЙ. К этому типу нарушений относятся болезни MERRF и MELAS. Клинические проявления MERRF и MELAS почти всегда связаны со специфическими точечными мутациями в генах тРНК. Болезнь MERRF ("myoclonus epilepsy with RRF" – миоклональная эпилепсия с RRF) – энцефаломиопатия, наследуемая по материнской линии, характеризуемая в основном припадками, миопатией и мозжечковой атаксией, потерей слуха, поражением печени и почек. MERRF связана с точечной мутацией в гене лизиновой тРНК мхДНК. Мутация приводит к глубоким расстройствам синтеза митохондриальных белков дыхательных комплексов I и II и проявляется в серьезных нарушениях функции мышечного аппарата. При этой патологии повышена активность сукцинатдегидрогеназы и резко снижена активность цитохром–С–оксидазы. Обнаруживаются многочисленные RRF (неровные красные нити), дефицитные по цитохромоксидазе.

Риск наследования MERRF зависит от доли мутантной ДНК в лимфоцитах матери. Тяжесть заболевания и степень выраженности биохимических нарушений

также определяется соотношением нормальной и мутантной мхДНК. При наличии 94–96% мутантной формы мхДНК наблюдается снижение активности ферментов дыхательной цепи, а при 61–92% процесс окислительного фосфорилирования протекает нормально.

Мутация генов тРНК может также приводить к специфическому заболеванию MELAS ("mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes") – митохондриальная энцефаломиопатия с лактатацидозом и наличием паралича. MELAS наследуется по материнской линии, характеризуется также RRF, слепотой, апоплексическими ударами, деменцией, рецидивирующими головными болями, рвотой. Оно связано с точечной мутацией в гене ND4, специфичном для лейциновой тРНК. Эта мутация приводит к нарушению функционирования дыхательного комплекса I, однако, дефект отличается от MERRF. С точечными мутациями в гене тРНК лейцина связывают еще одно заболевание, при котором наблюдается сочетание кардиомиопатии и миопатии скелетных мышц, развивающиеся в среднем и старшем возрасте.

МУТАЦИИ В ГЕНАХ РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК МИТОХОНДРИЙ.

Патогенные мутации мхДНК обнаружены также в генах рРНК. Мутация в одном из двух генов рРНК, закодированных в мхДНК, наследуется по материнской линии, приводит развитию глухоты в ответ на употребление аминогликозидных антибиотиков, таких как каномидин и гентамицин. Было установлено, что эти антибиотики связываются со специфической областью 12S мхДНК, где локализована мутация, и, таким образом, повреждают митохондриальный белковый синтез. Без присутствия этих антибиотиков мутация фенотипически не проявляется.

Мутация в гене 16S рРНК, напротив, приводит к развитию резистентности к токсическому влиянию хлорамфеникола, который обычно связывается с нормальной субъединицей 16S рРНК. В результате этого наблюдается ингибирование процесса митохондриальной трансляции.

МУТАЦИИ, УМЕНЬШАЮЩИЕ ЧИСЛО КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК. Снижение количеств копий мхДНК при репликации, называют истощением (диплецией) мхДНК. К данной группе относятся летальная инфантильная дыхательная недостаточность и синдром молочнокислого ацидоза. Как правило, эти заболевания (миопатия, нефропатия, печеночная недостаточность) характеризуются резким снижением содержания митохондриальной ДНК в различных тканях организма (до 1–2 % от нормы).

Диплеция наблюдается под влиянием азидотимидина (AZT) – аналога нуклеозида, используемого в лечении СПИДа. Препарат является причиной "азидиновой миопатии", характеризуемой мышечной слабостью и наличием RRF, выявляемых при биопсии мышц. AZT специфически ингибирует полимеразу, участвующую в репликации мхДНК, что приводит к сильной диплеции мышечной мхДНК у пациентов, леченых AZT. Другие нуклеотидные аналоги используемые в лечение СПИДа, такие как ddC (модифицированный цитозин) и ddI (модифицированный инозит), могут оказывать аналогичный эффект на репликацию мхДНК.

НАСЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПО МЕНДЕЛЮ. Кроме наследования по материнской линии и спорадических мутаций в мхДНК существуют также ошибки, наследуемые по законам Менделя. Наследование по аутосомно-доминантному признаку обнаружено при болезни РЕО (прогрессирующая наружная офтальмоплегия), сопровождаемой множественными делециями мхДНК, количество которых увеличивается на протяжении всей жизни пациента. Второй дефект, вероятно, аутосомно-рецессивный связан с диплецией. Пораженные дети имеют количественные ошибки в копиях мхДНК только в мышцах, либо печени, или в мышцах и почке. Как в случае с РЕО, дефект в гене остается до сих пор не идентифицированным.

Существует предположение, что некоторые заболевания могут быть обусловлены воздействием двух локусов, один из которых является ядерным, а другой – митохондриальным. Двухлокусовая модель не исключается для LHON и DEAF (нейросенсорная потеря слуха). В свою очередь нарушения мхДНК оказывают влияние на экспрессию ядерных генов. Так, делеция в мхДНК при синдроме KSS приводит к снижению синтеза β -субъединицы АТФ-азы, кодируемой ядерным геномом.

МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КАЖДОМ ИЗ НАС. Наследуемые митохондриальные болезни человека, встречаются относительно редко. А существуют ли клинические случаи более общего порядка, связанные с мутациями в мхДНК? В этом плане необходимо выделить три важных момента.

Первый затрагивает наследственный аспект поражений миокарда. Кардиомиопатии различного генеза нередко встречаются в клинической практике.

Когда миокардиопатия является ведущим клиническим проявлением, необходимо дифференцировать митохондриальные и немитохондриальные формы этого патологического состояния с помощью генетического анализа

Второй момент касается диабета – заболевания, которое с необычайной частотой обнаруживается при митохондриальных болезнях. Около одной трети всех пациентов с PEO, KSS, MELAS имеют диабет второго типа, наблюдаемый в молодом возрасте. Диабет, наследуемый по материнской линии и сопровождаемый глухотой, обусловлен точечными мутациями в ND1 мхДНК.

Третий момент связан со старением. Делеции в геноме мхДНК у пациентов среднего и пожилого возраста с синдромом MERRF, PEO и KSS встречаются чаще, чем у молодых людей. Кроме того, количество делеций в мхДНК долгоживущих тканей, таких как мышцы и мозг, увеличивается по экспоненте, а в быстро обновляющихся тканях (кровь, печень) – их накопление незначительно.

Биологическая сущность этого факта пока неясна. Тем не менее, симптомы митохондриальных болезней – как отличительные признаки возраста – обнаруживаются при диабете, потере слуха, деменции и мышечной слабости. Более того, мутации мхДНК могут иметь существенное значение в прогрессирующих симптомах поздно начинающихся нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Alzheimer, болезнь Parkinson (ADPD) и даже болезнь Huntington.

Понятие митохондриальной болезни старения впервые предложено James Fleming и поддержано Bruce Amers и Anthony Linnane. «Митохондриальная теория старения» основана на том, что митохондрии являются источником большинства свободных радикалов, продуцируемых клеткой. Denham Harmon объединяет ее в одну унитарную гипотезу со «свободно-радикальной теорией старения».

Глава 7. ЛИЗОСОМЫ

В организме синтезируется большое количество высокомолекулярных соединений. Какой-то определенный период времени все они выполняют свои специфические функции в организме, затем распадаются. Распад эндогенно синтезированных веществ осуществляется в специализированных органеллах клетки – лизосомах. *Лизосомы* – гетерогенная вакуольная система цитоплазматических мембран клетки с диаметром 0,5 мкм. Они идентифицированы в 1949 г. де Дювом. За их открытие Кристиан де Дюв в 1974 г. удостоен Нобелевской премии.

Открытие лизосом было сделано биохимиками при изучении локализации ферментов в гепатоцитах. В экспериментах было замечено несколько необычное поведение *кислой фосфатазы*. При выделении фракций из гомогената тканей используется раствор сахарозы, позволяющий сохранить структуру субклеточных органелл. В выделенных из гомогената фракциях, также как и в целых гомогенатах, активность кислой фосфатазы была почти в 10 раз выше, чем в водных растворах. В старых препаратах, через 5 дней хранения активность фермента в этих фракциях возросла в 10 раз, причем наиболее резко в гомогенате и митохондриях. На основании этого было высказано предположение, что кислая фосфатаза в гепатоцитах локализована в специфических гранулах и находится в латентном состоянии. Вскоре появились такие же сообщения, касающиеся других гидролитических ферментов. Активность ферментов проявляется лишь после разрушения этих гранул с помощью какого-либо повреждающего воздействия (гипотоническая среда, замораживание и оттаивание, обработка детергентами, гомогенизация в жестких условиях) и выхода фермента в раствор.

Основные характеристики лизосом: 1) лизосомы ограничены одинарной липопротеиновой мембраной, которая придает заключенным в лизосомах ферментам свойство латентности; 2) лизосомы содержат кислые гидролазы; 3) лизосомы морфологически крайне неоднородны и обладают необычайной ферментной гетерогенностью.

Мембрана лизосом выполняет особую роль. Она ограничивает сферу действия гидролаз и, следовательно, предотвращает безудержный распад субстратов гидролаз, которыми являются белки, липиды, нуклеиновые кислоты и углеводы клетки. Повреждение мембраны, вызванное осмотическим лизисом или её старением, приводит к высвобождению этих ферментов из лизосом и дегградации клетки.

Неповрежденная мембрана лизосом представляет собой достаточно надежную преграду, препятствующую выходу ферментов в клетку. В силу малой проницаемости мембраны в лизосомах удерживаются не только ферменты, но и макромолекулярные субстраты, подвергающиеся деградации. Только низкомолекулярные продукты распада (свободные аминокислоты, сахара, нуклеотиды) способны проходить сквозь мембрану лизосом и далее могут быть использованы клеткой в качестве питательных веществ. Таким образом, лизосомы способны участвовать в реутилизации макромолекул.

Мембрана лизосом способствует поддержанию условий среды внутри лизосом, которые оптимальны для проявления активности лизосомальных ферментов в области низких рН среды. Благодаря мембране, в лизосомах удерживается большое количество отрицательно заряженных высокомолекулярных соединений, таких как гликопротеины, с отрицательно заряженными остатками нейраминной кислоты и отрицательно заряженными фосфолипидами. С этим сопряжено накопление внутри лизосом одновалентных катионов и, в первую очередь, протонов. Кислые гидролазы обладают наибольшей активностью при значении рН 3–5. Именно такое значение рН среды поддерживается внутри лизосом. Некоторые молекулы малых размеров проходят сквозь мембрану лизосом в незаряженном виде, а затем заряжаются, присоединив протон в кислой среде матрикса. В результате такие молекулы становятся более гидрофильными и не могут проникнуть обратно через липидный бислой. Следовательно, они входят в лизосомы быстрее, чем выходят из неё, и таким образом накапливаются внутри. Примером вещества подобного рода служит антималярийный препарат *хлорокин*, добавление которого к интактным клеткам приводит к повышению рН в лизосомах, что дает возможность использовать хлорокин в качестве ингибитора лизосомальных ферментов.

ТИПЫ ЛИЗОСОМ

По сравнению со всеми другими клеточными органеллами лизосомы представляют морфологически гетерогенную фракцию. Гетерогенность связана с разнообразными функциями лизосом, участвующих в деградации внутриклеточных структур, а также поступающих путем эндоцитоза внеклеточных веществ. В связи с этим различают два основных типа лизосом;

- первичные, которые содержат лизосомальные ферменты, но лишены субстратов;
- вторичные, содержащие субстраты и гидролитические ферменты.

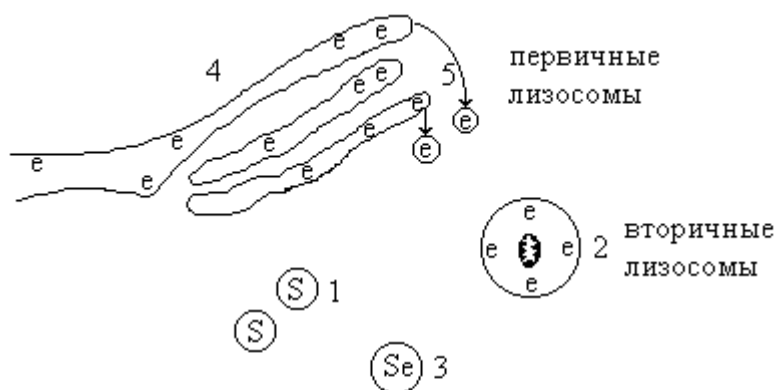
Кроме того, выделяют *прелизосомы*, к которым относятся пиноцитарные пузырьки, фагоцитарные вакуоли, аутофагосомы, внутри которых содержатся субстраты, но нет лизосомальных ферментов. Общим для клеток является постоянный обмен лизосомальной системы.

Синтез гидролитических ферментов лизосом осуществляется рибосомами шероховатого ЭПР. Далее ферменты транспортируются в цистерны ЭПР, где к ним присоединяются углеводные компоненты с конечным звеном N-ацетилнейраминовой кислоты или фукозы. В аппарате Гольджи, куда транспортируются ферменты, происходит упаковка ферментов в липопротеиновую мембрану и отшнуровка первичных лизосом. Первичные лизосомы легко сливаются с другими, а иногда и с плазматической мембраной. Структуры, образующиеся при слиянии первичных лизосом с другими структурами, являются вторичными лизосомами. Они отличаются от первичных тем, что в них обязательно содержатся субстраты внелизосомного происхождения. Вторичные лизосомы обладают такой же способностью к слиянию с другими везикулами, как и первичные (рис. 17). Следовательно, все лизосомы; фактически связаны друг с другом посредством процесса слияния, и потому любые новые частицы, попавшие в лизосому, быстро распространяются по системе лизосом.

В нормальной спокойной клетке лизосом мало, в основном это первичные лизосомы. Однако в процессе аутофагии и эндоцитоза образуется большое количество вторичных лизосом. В результате образуются гетерофагосомы и аутофагосомы:

Гетерофагосомы – пузырьки с материалом, образуются при эндоцитозе, в результате слияния с первичной лизосомой. В момент слияния активируются ферменты лизосом.

Аутофагосомы – содержат эндогенный материал самой клетки.



- 1 - прелизосомы 4 - ЭПР
 2 - аутолизосомы 5 - аппарат Гольджи
 3 - гетерофагосома
 S - субстрат, подвергаемый гидролизу
 e - ферменты лизосом

Рис. 17. Типы лизосом.

ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ

Основная функция лизосом – катаболическая – связана с процессом кислого гидролиза. Она осуществляется путем эндоцитоза, аутофагии и экзоцитоза.

Эндоцитоз – процесс, посредством которого внеклеточные компоненты попадают внутрь клетки в виде включений в пузырьки, образованные плазматической мембраной. Эндоцитоз подразделяется на фагоцитоз и пиноцитоз. В случае фагоцитоза клетка поглощает в основном твердые частицы, например, бактерии, при этом образуются фагосомы. При пиноцитозе происходит поглощение мелких коллоидных частиц, а также веществ, связывающихся с рецепторами плазматической мембраны. Образуются пиноцитарные пузырьки.

Аутофагия – процесс распада внутриклеточных структур. В классическом случае остатки внутриклеточных органелл оказывается окруженными одной или двумя мембранами, отделившимися от ЭПР. Образовавшаяся вакуоль сливается с лизосомами, а содержащаяся в ней структура подвергается перевариванию. Возможна также аутофагия самих лизосом, протекающая следующим образом: сначала происходит инвагинация лизосомальной мембраны, в результате формируется лизосома, в которой содержится внутренняя мембрана, окруженная наружной.

Экзоцитоз. Клетки некоторых типов способны выделять лизосомальные ферменты, при этом лизосомная система теряет часть своих мембран вследствие их слияния с плазматической мембраной клетки. В экзоцитозе участвуют

фагоцитирующие лейкоциты, скапливающиеся в участках инфицирования. Нейтрофильные лейкоциты реагируют на присутствие инородных частиц или на иммунологические стимулы очень быстрым выделением значительной части содержащихся в них лизосомальных ферментов. В отличие от нейтрофилов моноциты, которые скапливаясь в участках инфицирования, превращаются в макрофаги, могут секретировать лизосомальные ферменты в течение очень длительного времени. Из ферментов, секретируемых макрофагами, значительный процент составляют нейтральные протеиназы, гликозидазы, фосфомоноэстеразы.

Следует также рассмотреть физиологическую роль лизосом в организме. В этом плане необходимо подчеркнуть следующие процессы с участием лизосом.

1. *ПОГЛОЩЕНИЕ И ПЕРЕВАРИВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ.* Основной процесс, происходящий в лизосомах, состоит в гидролитическом превращении высокомолекулярных соединений, поступающих в клетку извне и формирующих внутриклеточные структуры. Лизосомы, следовательно, выполняют функции внутриклеточного пищеварения. В норме обычно количество экзогенных и эндогенных веществ, подвергаемых перевариванию невелико, но оно резко увеличивается, когда клетка нуждается в пластическом и энергетическом материале. Процессы эндогенного питания усиливаются при репарации и регенерации тканей, действии экстремальных физических нагрузок, при беременности. Путь эндогенного питания включается клеткой при голодании, когда происходит резкое угнетение биосинтетических процессов и активация катаболизма. При голодании происходит активация процессов аутофагии, резко увеличивается активность катепсинов, арилсульфатаз А и В, и группы гликозидаз, как в первичных, так и во вторичных лизосомах.

Заслуживает внимания *реконструктивная* функция лизосом, связанная с процессом молекулярного обновления клетки. Каждая составная часть клетки имеет свою собственную продолжительность жизни. Молекулы белка, например, в зависимости от их структуры живут от нескольких часов до нескольких дней. То же характерно для большинства других клеточных компонентов, за исключением ДНК, которая полностью не заменяется. Возможность замены молекул необходима для того, чтобы клетка оставалась неповрежденной. Лизосомы участвуют в переваривании не только отдельных молекул, подвергаемых замене, но и целых участков цитоплазмы, митохондрий, фрагментов мембран, отделившихся от эндоплазматического ретикулума.

Лизосомы участвуют в регуляции уровня секреции гормонов гипофиза и щитовидной железы. В аденогипофизе осуществляется синтез пептидных гормонов: кортикотропного, тиреотропного, фолликулостимулирующего, лютеинизирующего, соматотропного гормонов, пролактина. Основной функцией лизосом клеток аденогипофиза является удаление излишних количеств синтезированных гормонов. Процесс переваривания секреторных гранул называется *кринофагией*, который заключается в поглощении части секреторных гранул при их избытке или в отсутствие стимула.

В фолликулах щитовидной железы накапливается тиреоглобулин, предшественник тироксина и трийодтиронина. Образование этих гормонов щитовидной железы происходит при участии лизосом эпителиальных клеток фолликулов. Тиреоглобулин поступает в эпителиальные клетки путем эндоцитоза, связываются с первичными лизосомами, в них тиреоглобулин подвергается гидролизу, при этом образуются тироксин и трийодтиронин, они диффундируют через мембрану эпителиальных клеток фолликула и поступают в кровоток. Белковая часть тиреоглобулина под действием лизосомальных протеиназ подвергается гидролизу до аминокислот.

2. *ЗАЩИТНАЯ ФУНКЦИЯ ЛИЗОСОМ* заключается прежде всего в лизисе микроорганизмов и вирусов. Наиболее активны в обезвреживании бактерий макрофаги, активность лизосомальных ферментов которых в несколько раз выше, чем у паренхиматозных клеток. В экскреции лизосомальных ферментов решающая роль принадлежит триггерной функции мембранных рецепторов. Стимулами для выделения лизосомальных гидролаз макрофагами являются как бактерии, так и полисахарид зимозан, иммунные комплексы, продукты активации лимфоцитов. Если фагоцитируются микроорганизмы, то в макрофагах резко активируются процессы окисления, приводящие к появлению H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ и O_2 , которые разрушают микробные тельца. В других случаях макромолекулы фагоцитированной частицы распадаются на более простые компоненты (аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты), которые после их резорбции клеткой используются в процессе метаболизма.

Активация внутриклеточных процессов, происходящая под действием гидролитических ферментов, может приводить к изменению функционального состояния иммунокомпетентных клеток. Протеолитические ферменты (катепсин D, трипсин, проназа) способны индуцировать бласттрансформацию, синтез ДНК,

вызывать экспрессию некоторых аллоантигенов, увеличивая их антигенность. Активация лимфоцитов под действием протеиназ может осуществляться несколькими путями: 1) с помощью ограниченного протеолиза рецепторных молекул иммунокомпетентных клеток и "раскрытия" рецепторов, находящихся в скрытом состоянии; 2) через активацию протеинкиназ (например, Ca^{2+} -зависимая протеиназа активирует протеинкиназу C) и воздействия на клеточный метаболизм; 3) через продукты протеолиза (например, брадикинин, являясь продуктом активации кининовой системы стимулирует деление лимфоцитов путем увеличения активности мембранных ферментов и образования внутриклеточных эффекторов, таких как цАМФ, ионы Ca^{2+} , аденозин).

Участие лизосом в иммунном ответе может проявляться в расщеплении антигенов при участии гидролитических ферментов. После образования комплекса антиген-антитело лизосомы могут участвовать в расщеплении комплекса, защищая ткань от его патологического воздействия.

Таким образом, защитная функция лизосом многогранна. Они могут непосредственно участвовать в лизисе чужеродного материала путем секреции гидролитических ферментов, а также стимулировать различные механизмы иммунитета.

РЕАКЦИИ ЛИЗОСОМ ПРИ АДАПТАЦИИ

Переход организма в состояние повышенного функционального перенапряжения приводит к активации лизосомального аппарата. При стрессе увеличивается количество вторичных лизосом, происходит активация гидролитических ферментов, усиливаются процессы гетеро- и аутофагоцитоза. При действии на организм стрессорных факторов умеренной интенсивности происходит активация лизосомальных ферментов без повреждения структуры лизосом. До определенного момента эти изменения носят адаптивный характер и не приводят к повреждению клетки. Однако с увеличением силы или длительности воздействия отмечаются нарушения структуры лизосомальных мембран и выход кислых гидролаз в цитоплазму с последующим развитием цитолитических процессов и повреждением тканей.

Увеличение продукции глюкокортикоидов при стрессе сопровождается усилением катаболических процессов в мышечной, лимфоидной, жировой тканях. В печени, напротив, происходит активация метаболических процессов, наблюдается

увеличение активности ферментов, таких как тирозинаминотрансфераза и триптофанпирролаза. Индукция этих ферментов под влиянием глюкокортикоидов обусловлена усилением их синтеза и увеличением количества. С прекращением действия глюкокортикоидов эти ферменты подвергаются деградации в лизосомах при участии катепсинов.

Известно, что в адаптивную реакцию включаются процессы пролиферации и внутриклеточной регенерации. Важный вклад в активацию пролиферативных процессов вносят лизосомы. На ранних стадиях стимуляции деления клеток количество лизосом увеличивается, они начинают группироваться вокруг ядра. Под влиянием лизосомальных протеиназ происходит разрыхление ядерной мембраны, вследствие чего лизосомальные ферменты попадают в ядро. В лизосомах были найдены протеиназы, активные при pH 7,0, которые способны расщеплять гистоны, вызывать дерепрессию хроматина, стимулировать синтез ДНК и белка.

ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ

Первоначально общий план строения лизосом представляли достаточно примитивно. Полагали, что лизосомы состоят из несодержащих ферменты фосфолипидных мембран, окружающих лизосомальный матрикс, представляющий раствор кислых гидролаз. Де Дюв сравнивал лизосомы с мешками, заполненными ферментами. Предназначение лизосом видели в осуществлении аутолиза поврежденных клеток и называли их "оружием самоубийства клеток". Более глубокие исследования, проведенные в последующий период, позволили получить ряд фактов, существенно изменяющих первоначальное представление о лизосомах. К их числу следует отнести:

- 1) открытие новых лизосомальных ферментов. На схеме де Дюва в 1955 году к числу лизосомальных были отнесены лишь 5 ферментов – кислая фосфатаза, ДНК-аза, РНК-аза, катепсины и β -глюкуронидаза. В настоящее время их известно около ста;
- 2) обнаружение ферментной гетерогенности лизосом;
- 3) выявление ферментов, связанных с лизосомальной мембраной;
- 4) обнаружение изоферментов (например, кислой фосфатазы).

Ферментный комплекс лизосом хорошо адаптирован к задачам расщепления большинства сложных веществ и биополимеров, встречающихся в организме, включая белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, пирофосфатные соединения,

полисахариды, олигосахариды, триглицериды, фосфатиды, сфингомиелины, эфиры холестерина. Общее свойство лизосомальных ферментов – достаточно низкое значение оптимальных рН, при которых они проявляют максимальную активность. Характерно, что большая часть ферментных белков в составе лизосом (около 80%) находится в растворенном неструктурированном состоянии и только 20% связаны с мембраной. К наиболее изученным ферментам относится кислая фосфатаза, которая считается типичным маркерным ферментом лизосом. Оптимум рН для кислой фосфатазы – 5,2.

В связи с определяющей ролью фосфолипидов в структуре мембран и их выраженным влиянием на активность мембранно-связанных ферментов особого внимания заслуживает рассмотрение лизосомальных фосфолипаз. Отличительной особенностью лизосомальных фосфолипаз является низкие значения оптимума рН (4,2–4,5), в связи с чем их активность в 40 раз превышает активность митохондриальной и микросомальной фосфолипаз. Имеются также липазы, расщепляющие триглицериды и лизосомальная гидролаза, расщепляющая эфиры холестерина (холестеролэстераза).

Кислые нуклеазы (ДНК-азы и РНК-азы) обладают малой специфичностью. Однако по механизму действия ДНК-аза II локализованная в лизосомах, сильно отличается от ДНК-азы I панкреатического сока. Лизосомальный фермент был назван диплотомическим (расщепляет обе нити спирали ДНК), в отличие от гаплотомического действия панкреатической ДНК-азы, ведущей гидролиз одной нити.

Гиалуронидаза расщепляет β (1 → 4) – N-ацетилглюкозамидные связи в гиалуроновой кислоте (рН 3,5 – 4,1), нейраминидаза расщепляет α -гликозидные связи (1 → 2) сиаловой кислоты в составе гликолипидов. Эти ферменты имеются во многих тканях: печени, почках, селезенке, легких. В лизосомах представлена группа β -гликозидаз, гетерогенно распределенных между фракциями первичных и вторичных лизосом. Среди этих ферментов наиболее прочно связаны с лизосомальной мембраной: β -ксилозидаза, β -глюкозидаза, β -цетилглюкозаминидаза. Известно, что при взаимодействии с аутофагосомой в первую очередь активируются мембранные ферменты, а затем ферменты матрикса, которые гидролизуют субстрат.

К протеиназам лизосом относится группа ферментов со специфическим названием – катепсины (А, В, С, D, Е), отличающихся по субстратной специфичности. Наиболее хорошо изучен катепсин D, который является маркерным

ферментом деградации белков в лизосомах. Особенность катепсина D, по сравнению с другими, заключается в том, что он не взаимодействует с субстратами, имеющими низкую молекулярную массу и обладает специфичностью по отношению к гемоглобину. Катепсин D расщепляет белки до пептидов при рН 3,0–3,5. Для катепсина D не обнаружено внутриклеточных ингибиторов и активаторов.

РОЛЬ ЛИЗОСОМ В ПАТОЛОГИИ

Участие лизосом в развитии патологических процессов рассматривается в двух аспектах: 1) в плане развития общих патологических процессов, таких как воспаление, некроз, гипоксия, голод. Во всех этих процессах вовлечение лизосом носит вторичный характер; 2) в плане нарушения структуры самих лизосом, дефицита лизосомальных ферментов. В этих случаях повреждения лизосом бывают первичными и являются пусковыми механизмами в развитии патологических реакций.

Участие лизосом в воспалении связано с гиперфункцией лизосом. Существование этой функции лизосомального аппарата было предсказано задолго до их открытия великим русским ученым И.И. Мечниковым. Представления об участии в воспалении особых ферментных тел – цитаз, полностью подтвердились после открытия лизосом. Сейчас можно с уверенностью сказать, что явления воспаления, где бы они не возникали, сопровождаются защитной реакцией макрофагов, практически всегда связанной с активацией лизосомального аппарата и входящего в его состав комплекса кислых гидролаз. Лизосомы при воспалении поглощают попадающие во внутреннюю среду организма чужеродные белки, полисахариды, липиды и расщепляют их до составных компонентов. Кроме того, они активно участвуют в ликвидации аварийных состояний при травматических повреждениях, осуществляя процессы ферментной очистки ран от утративших свое значение некротизированных фрагментов тканей.

Из патологических состояний, связанных с повреждением лизосомальных мембран, наиболее изучены болезни суставов. Предполагают, что в патогенезе воспалительных реакций при таких заболеваниях суставов как острый артрит, ревматизм, подагра, важная роль принадлежит комплексу освобождающихся лизосомальных ферментов, участвующих в деградации гликозамингликанов и протеогликанов. В эксперименте было показано, что очищенная фракция лизосом лейкоцитов при инъекциях в область суставов и кожу, способна вызывать острые

воспалительные реакции. Основной воспалительный процесс при этом связан с активацией кислых протеаз, типа катепсина D, глюкоксидазы, коллагеназы, способных разрушать гликопротеиновые структуры хряща.

АПЛАСТИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК

Повреждение лизосомальных мембран и усиление процессов аутофагии являются основными процессами, характерными для апластического (лизосомального) типа повреждения клеток. Активация лизосом наблюдается при некрозе, гипоксических состояниях, воспалении, когда происходит снижение рН среды и выход гидролитических ферментов в клетку. Такой эффект ярко проявляется при действии афлатоксинов на клетку. Афлатоксины способны избирательно повреждать мембраны лизосом, вызывая резкое усиление активности лизосомальных ферментов. Предполагается, что активированные лизосомальные гидролазы нарушают структуру ядерной мембраны, вызывают дезорганизацию метаболических процессов, приводящую к повреждению генома клетки и, как следствие, к появлению канцерогенных эффектов.

Другие химические канцерогены и коканцерогены: пестициды, фосфорорганические соединения, нитрозометилмочевина, анилин, также вызывают высвобождение и активацию кислых гидролитических ферментов лизосом. В любом из этих случаев повреждение лизосом и высвобождение их ферментов приводит к дезорганизации метаболизма клеток.

ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ

Значение лизосомальных ферментов в расщеплении большого количества субстратов отчетливо проявляется при болезнях накопления, когда генетически обусловленная недостаточность всего лишь одного из этих ферментов вызывает тяжелые расстройства, обычно приводящие к смерти в раннем возрасте. При такой ферментной недостаточности лизосомы теряют способность расщеплять определенные субстраты, которые и накапливаются в них. Отличительный признак этих болезней – образование в клетках множество вакуолей, которые придают им пенистый вид. Большинство лизосомных болезней передаются по аутосомно-рецессивному типу наследования и поэтому у супругов с отягощенной наследственностью при каждой беременности риск рождения больного ребенка составляет 25%. Лизосомные болезни пока неизлечимы, в связи с этим важно предотвратить рождение больного ребенка, диагностировать болезнь у плода.

Характерные симптомы болезней накопления: задержка психического развития, неврологические нарушения, повышение сухожильных рефлексов, судороги, атаксия, а также дефекты зрения (помутнение роговины и катаракта, изменения глазного дна типа "вишневой косточки"), патология слуха, костей, миокарда, гепатоспленомегалии. Некоторые симптомы и их сочетания типичны для определенных болезней. Так, гепатоспленомегалия и характерные клетки в пунктате костного мозга обычны при болезни Гоше, "пенистые клетки" – при болезни Нимана-Пика, изменение черт лица и аномалии костной системы бывают при мукополисахаридозах, выделение с мочой маннозосодержащих олигосахаридов характерно для маннозидоза. Точный диагноз лизосомного заболевания может быть поставлен только при выявлении ферментного дефекта.

Лизосомные болезни стали известны с 60-х годов, хотя клиническое описание известно с 1981 года, когда Тей (англичанин) и Сакс (американец) описали детей с нарушением интеллекта, признаками изменения глазного дна типа "вишневой косточки". Впоследствии стало известно, что болезнь Тей-Сакса связана с отсутствием гексозаминидазы А и накоплением ганглиозидов. Симптомы болезни Тей-Сакса обычно проявляются у ребенка в возрасте до одного года. К характерным ранним симптомам относятся слабость, отставание в развитии, затруднения при кормлении. Через несколько месяцев наступает слепота, на сетчатке видны отчетливые вишнево-красные пятна. Летальный исход обычно наступает до 3 лет.

Бельгийский ученый Херс из Лувенского университета впервые ввел термин и описал характерные признаки болезней накопления в 1962 году. Он показал, что накопление гликогена при гликогенозе связано с отсутствием кислой α -гликозидазы в лизосомах печени.

Лизосомные болезни классифицируют по продуктам накопления: гликолипидозы; гликопротеинозы; мукополисахаридозы. Имеются также другие классификации, основанные на названиях продуктов накопления (гликогенозы), или на названиях отсутствующих ферментов (гликозидозы). До сих пор не известны болезни накопления, при которых наблюдалась бы недостаточность протеиназ и в лизосомах накапливались бы белки. Это объясняется, по-видимому тем, что такое состояние приводит к смерти плода, тогда как при других болезнях накопления смертельный исход наступает позже, в детском возрасте.

ГЛИКОЛИПИДОЗЫ. Чаще всего такие болезни связаны с дефектом гликозидаз, ферментов расщепляющих гетерополисахариды. Известно несколько

десятков гликозидаз, гидролизующих разные гликозидные связи в гетерополисахаридах.

ГЛИКОЗИДОЗЫ часто проявляются с первых недель жизни и обычно связаны с резким нарушением развития ребенка. Например, болезнь Гоше поражает прежде всего клетки костного мозга и селезенки, печени. При недостаточности фермента в клетках центральной нервной системы болезнь может иметь смертельный исход. Болезнь Краббе является нейродегенеративным заболеванием, при котором в детстве повреждаются клетки центральной нервной системы, что приводит к глухоте, слепоте и к смерти в течение двух лет.

ГЛИКОПРОТЕИНОЗЫ. К этим заболеваниям относятся фукозидоз, связанный с недостаточностью фукозидазы, и маннозидоз, зависящий от дефицита маннозидазы. Расстройства гликопротеинового обмена проявляются в повреждении фрагментов гликопротеинов. Известен случай, когда при α -фукозидозе отсутствовала терморегуляция и больной 15 лет жил в кондиционируемом помещении.

МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ связаны с повышением количества гликозамингликанов в моче, слюне (ранее гликозамингликаны назывались мукополисахаридами). Мукополисахаридозы – тяжелые заболевания, проявляющиеся в резком нарушении развития ребенка и уменьшении продолжительности жизни. Сюда относятся болезни Хюрлера, Хюнтера, связанные с дефицитом идуронидазы и идуронатсульфатазы, соответственно. Дети с синдромом Хюрлера рождаются без внешних изменений, иногда с большой массой тела. В первые месяцы жизни черты лица становятся грубыми, характерны: запавшая переносица, помутнение роговицы, гепатоспленомегалия. Позже появляются признаки поражения сердца, шум, кардиомегалия. Развиваются глухота, слепота.

При I-клеточной болезни наблюдается множественная ферментная недостаточность. Это нарушение функции лизосом характеризуется сильной задержкой психомоторного развития и деформацией скелета. Лизосомы в соединительной ткани больных содержат крупные включения (*inclusion* – включение) непереваренных гликозамингликанов и гликолипидов. Наличие этих включений обусловлено отсутствием в лизосомах больных по меньшей мере восьми ферментов, необходимых для их расщепления. В то же время огромные количества этих ферментов обнаруживаются в моче и крови больных. Следовательно, синтез

активных ферментов при болезни I-клеток происходит, но вместо того, чтобы находиться в лизосомах, они экспортируются из клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление.– М.: 1975.
2. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противooksидлительные вещества.– Л.: 1985.
3. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. В 3-х томах. 2-е изд.– М.: 1994.
4. Болдырев А.А. Введение в биохимию мембран.– М.: 1986.
5. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в главных системах // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биофизика.– 1991.
6. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: 1972.
7. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. 3-е изд.– Ростов: 1990.
8. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия.– Л.: 1986.
9. Дин Р. Процессы распада в клетке.– М.: 1981.
10. Лишко В.К., Шевченко М.И. Мембраны и жизнь.– Киев: 1987.
11. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов.– М.: 1981.
12. Мембраны и болезнь. / Л. Болис, Д.Ф. Хорман, А. Лиф. // М.: 1980.
13. Николаев А.Я. Биологическая химия.– М.: 1989.
14. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса.– Новосибирск: 1984.
15. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы.– М.: 1976.
16. Свенсон К., Уэбстер П. Клетка.– М.: 1980.
17. Хорст А. Молекулярные основы патогенеза болезней. М.: 1982.

СОКРАЩЕНИЯ

ГП	–	глутатионпероксидаза
ЛПНП	–	липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	–	липопротеиды очень низкой плотности
ЛПВП	–	липопротеиды высокой плотности
ПГ	–	простагландины
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
СФ	–	супероксиддисмутаза
ФЕП	–	фосфоенолпируват
ФГА	–	фитогемагглютинин
цАМФ	–	циклический аденозинмонофосфат
ЭПР	–	эндоплазматический ретикулум