

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
**«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»**

**Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева,
Г.В. Какурина**

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ: ПАТОХИМИЯ, ДИАГНОСТИКА

ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ

В 2-х частях. Часть 2

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2023

УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73
М422

Авторы:

Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева, Г.В. Какурина

Медицинская биохимия: патохимия, диагностика.
М 422 **Избранные лекции:** учебное пособие. В 2 ч. Ч. 2. / Л.В. Спирина
[и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – 138 с.

Учебное пособие состоит из двух частей, содержащих лекции по актуальным проблемам медицинской биохимии, нацеленной на изучение особенностей патологических биохимических процессов на клеточном уровне. На примере отдельных заболеваний показана значимость биохимических и молекулярных особенностей процессов программируемой, регулируемой клеточной гибели, активности ферментов лизосом, микросомального окисления, особенностей синтеза и созревания белков. Представлены методические подходы, используемые в экспериментальной биохимии.

Материал пособия способствует формированию профессиональных компетенций: проведению и оценке результатов лабораторных исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания.

Пособие подготовлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия: Биохимия злокачественного роста.

Издание предназначено для контроля знаний и самостоятельной подготовки к практическим занятиям по Медицинской биохимии студентов медико-биологического факультета, для дополнительного контроля полученных знаний по биохимии студентов врачебных факультетов, а также для подготовки к процедуре аккредитации специалистов.

УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73

Рецензент:

Иванов Владимир Владимирович – руководитель центра доклинических исследований, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Методической комиссией по группе специальностей в области лабораторной медицины МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол №3 от 27.10.2022 г.).

© Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева, Г.В. Какурина, 2023
© Издательство СибГМУ, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Лекция 1. ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ. ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СОПРЯЖЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ П. МИТЧЕЛА. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ (Д.И. Кузьменко).....	6
Лекция 2. СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬ- НЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА (Д.И. Кузьменко)	60
Лекция 3. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС. ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА (Д.И. Кузьменко)	88
Лекция 4. ПАТОХИМИЯ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНО- МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДА (М.Н. Стахеева)	122
Рекомендуемая литература	136

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1,2-ДАГ	– 1,2-диацилглицерол
АО	– антиоксидант
АНТ	– адениннуклеотидтранслоказа
АОЗ	– система антиоксидантной защиты
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФК	– активные формы кислорода
АФОА	– активные формы оксида азота
ВМ	– внутренняя мембрана митохондрий
ГР	– глутатионредуктаза
ГЛЮТ	– глюкозный транспортер
ГПО	– глутатионпероксидаза
ДЦ	– дыхательная цепь митохондрий
КР	– контрольный район
КПГ	– конечные продукты гликирования
РКПГ	– рецепторы конечных продуктов гликирования
КСС	– синдром Кернса–Сейра
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МДА	– малоновый диальдегид
мтДНК	– митохондриальная ДНК
НАДФ+	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НМ	– наружная мембрана митохондрий
окси-ЛПВП	– частицы ЛПВП, подвергшиеся окислительной модификации
окси-ЛПНП	– частицы ЛПНП, подвергшиеся окислительной модификации
окси-ЛПОНП	– частицы ЛПОНП, подвергшиеся окислительной модификации
ПК	– протеинкиназа
ПКС	– протеинкиназа С
ПНК	– пептидо-нуклеиновые кислоты

ПЦР	– полимеразная цепная реакция
САПК	– стресс-активируемая протеинкиназа
СД	– сахарный диабет
СДГ	– сукцинатдегидрогеназа
СОД	– супероксиддисмутаза
СПР	– саркоплазматический ретикулум
СР	– свободные радикалы
СРО	– свободнорадикальное окисление
Фн	– фосфат неорганический
ФМН	– флавинмоноклеотид
ФПФ	– фосфопротеинфосфатаза
ЦНС	– центральная нервная система
яДНК	– ядерная ДНК
AP-1	– activator protein-1
Araf-1	– apoptotic protease activating factor-1
Cys	– цистеин
DISC	– death-inducing signaling complex
ETF	– electron-transferring flavoprotein (электронпереносящий флавопротеин)
FCCP	– карбонил цианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон
ISCU	– iron-sulfur cluster assembly enzyme
K _m	– констант Михаэлиса
LS	– синдром Ли
JNK	– c-Jun N-terminal kinase (киназа, фосфорилирующая N-конец белка c-Jun)
MELAS	– митохондриальная энцефаломиопатия с лактоацидозом и инсультоподобными эпизодами
MERRF	– миоклоническая эпилепсия с рваными красными волокнами
NARP	– нейрогенная слабость с атаксией и пигментным ретинитом
NOX-1	– НДФН-оксидаза-1
SAPK	– stress-activated protein kinase
Trx	– тиоредоксин
UCP-1	– uncoupling protein-1
VDAC	– voltage dependent anionic channels
V _{max}	– максимальная скорость фермента

Лекция 1

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ. ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СОПРЯЖЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ П. МИТЧЕЛА. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

К важнейшим функциям, присущим всем живым существам, относят:

1. Самовоспроизведение – запись, хранение и использование генетической информации.
2. Энергообеспечение – получение энергии за счёт внешних энергетических ресурсов.
3. Превращение веществ – использование химических соединений окружающей среды для образования компонентов своего тела.
4. Раздражимость – способность принимать и обрабатывать сигналы, поступающие из внешней и внутренней сред организма, и адекватно отвечать на эти сигналы.

Наука, изучающая функцию энергообеспечения, называется биоэнергетика. По мнению академика РАН Владимира Петровича Скулачёва (МГУ), биоэнергетику можно определить, как отрасль функциональной биологии, изучающую механизмы улавливания и преобразования энергии внешних ресурсов и её аккумуляирования в форме, доступной для использования, то есть для совершения биосистемой различных видов работы. Жизнедеятельность любого организма неразрывно связана с работой. Так, живой организм и его составные элементы движутся, преодолевая сопротивление среды. При этом выполняется **механическая работа**. Менее заметна, но ещё более значима, внутренняя работа. При синтезе биомолекул выполняется **химическая работа**. Для установления и поддержания разности концентраций молекул и / или ионов по разные стороны различных биомембран требуется выполнение **осмотической работы**, для разности электрических потенциалов – **электрической работы**.

Современные основы биоэнергетики были заложены более 60-ти лет назад. Однако настоящий прорыв в развитии этой науки произошел благодаря появлению хемиосмотической теории (гипотезы) сопряжения окисления и фосфорилирования, сформулированной Питером Митчеллом в 1961 г.

В.П. Скулачев предлагает разделить биоэнергетические процессы в клетке эукариот на основе их компартментализации: на процессы, протекающие во внутренней мембране митохондрий, и в цитоплазме клетки. В каждом из этих компартментов используется своя «валюта» для оплаты энергозатрат. В мембране митохондрий это энергия электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$). Термин «электрохимический» происходит из того, что водород одновременно является и ионом, несущим электрический заряд, и химическим элементом. Энергия $\Delta\mu\text{H}^+$ способна обратимо превращаться в энергию АТФ. В цитоплазме (вне мембраны митохондрий) это энергия, аккумулированная в макроэргических связях молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) и, в гораздо меньшей степени, в некоторых других высокоэнергетических соединений – фосфагенов: креатинфосфата, фосфоенолпирувата и 1,3-дифосфоглицерата. Установлено, что именно мембранные биоэнергетические системы занимают центральное положение в процессах получения конвертируемой энергии, которая потребляется клеткой.

Энергетика любого организма, вне зависимости от степени сложности его структурно-функциональной организации, чрезвычайно чутко реагирует на любые изменения, происходящие как в окружающей организм среде, так и внутри самого организма. Компенсаторно-адаптивные реакции клеточной биоэнергетики обеспечивают выживание организма благодаря тому, что эти реакции своевременно и адекватно изменяют (адаптируют) энергообеспечение процессов жизнедеятельности, приводя их в соответствие с изменившимися темпами энергозатрат.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

В настоящее время наиболее аргументирована и признана **эндосимбиотическая теория** происхождения митохондрий. Теория начала развиваться в 1920-е годы, когда Б.М. Козо-Полянским было высказано предположение о том, что митохондрии являются симбионтами. Для дальнейшего расширения и конкретизации эндосимбиотической теории важную роль сыграли работы Л. Маргулис, осуществленные в 60-е годы прошлого столетия.

В соответствии с теорией симбиогенеза, митохондрии появились в результате захвата бактерий примитивными клетками-прокариотами – предками современных эукариот. Эти клетки не обладали способностью использовать кислород для выработки энергии, вследствие чего

имели серьёзные ограничения в возможностях эволюции. Бактерии такую способность уже сформировали. В процессе появления и развития симбиотических взаимоотношений между бактериями и клетками-прокариотами, последние получили возможность существенно повысить эффективность производства и потребления энергии. Одновременно бактерии передали множество своих генов в сформировавшееся ядро: появились первые клетки-эукариоты. «Ассимилированные» бактерии превратились в митохондрии. Эти явления стали причиной существования в эукариотических клетках двух геномов: основного – ядерного генома и митохондриального генома. Митохондриальная ДНК (мтДНК) была открыта в 1963 и 1964 годах двумя независимо работавшими группами исследователей: М. и С. Насс, и Э. Хаслбруннер, Х. Таппи и Г. Шац.

Ядерный геном человека содержит основной объем генетической информации, в том числе, кодирует около 1500 митохондриальных белков. Митохондриальный геном (митогеном) содержит примерно в 200 тыс. раз меньше пар нуклеотидов, чем ядерный, и кодирует все митохондриальные рибосомальные и транспортные РНК, а также небольшую часть белков, обеспечивающих функционирование митохондрий. Более подробно строение мтДНК будет представлено в Лекции 2 **«Строение митохондриального генома. Метаболические последствия митохондриальных болезней человека»** (С. 60). Таким образом, большинство митохондриальных ферментов и белков кодируются ядерным геномом, синтезируются в цитоплазме клетки и только потом транспортируются в митохондрии.

СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии – внутриклеточные органеллы, содержащиеся во всех клетках эукариотов, за исключением зрелых (безъядерных) эритроцитов. Митохондрии участвуют во множестве процессов жизнедеятельности клетки, но играют главную роль в производстве энергии. Для эритроцитов, где митохондрии отсутствуют, единственным источником энергии является гликолиз, который снабжается глюкозой, поступающей из крови внутрь эритроцита путём облегченной диффузии.

Митохондрии были открыты в 1850 г. гистологом Альбертом фон Кёлликером в ходе изучения им мышечных клеток насекомых. Первоначально органеллы были названы «саркосомами». Термин «митохондрии» появился в 1898 г. Часто митохондрии называют «электростан-

циями клетки». Это сравнение ввёл в обиход один из пионеров клеточной биологии Филипп Сейкевиц в 1957 г., стремясь подчеркнуть ключевую роль митохондрий в снабжении клетки энергией.

Количество митохондрий в клетке определяется интенсивностью энергозатрат данным типом клеток и может составлять более двух тысяч органелл на клетку. В зависимости от функционального состояния конкретного типа клетки, количество митохондрий в ней может обратимо изменяться. Кроме этого, показано, что митохондрии способны перемещаться внутри клетки, используя для этого филаменты и микротрубочки цитоскелета. Это позволяет клетке перераспределять митохондрии: увеличить количество органелл в том внутриклеточном компартменте, где возросла потребность в АТФ. Такая способность особенно важна для нейронов, в которых митохондриям приходится перемещаться на сравнительно большие расстояния вдоль аксона, от тела клетки к пресинаптическому окончанию.

Митохондрии представляют собой субклеточные органеллы бобовидной, сферической или нитевидной формы, имеющие двойную мембрану. Размеры митохондрий варьируют в широком диапазоне. Их диаметр обычно составляет около 1 мкм, длина – до 10 мкм. Внутреннее пространство митохондрий, ограниченное внутренней мембраной (ВМ), называется матриксом. В матриксе митохондрии находятся ферментные системы окисления пирувата, жирных кислот, а также ферменты цикла Кребса и ряд других. Кроме того, здесь же находится мтДНК, мтРНК и собственный белоксинтезирующий аппарат митохондрий. Толщина межмембранного пространства, заключенного между наружной мембраной (НМ) и ВМ, составляет 10–20 нм (рис. 1).

В отличие от НМ, ВМ митохондрий имеет многочисленные складки – кристы (рис. 1). Это в разы увеличивает площадь ВМ по сравнению с таковой для НМ. Во ВМ встроены белковые комплексы дыхательной цепи, которая обеспечивает процесс окислительного фосфорилирования, сопряженного с синтезом АТФ. В специальных ультраморфометрических исследованиях было показано, что суммарная площадь ВМ всех митохондрий одной печени взрослой крысы составляет около 40 м² в пересчёте на 1 г белка органелл. В миокарде крысы – ткани с чрезвычайно высоким энергопотреблением, эта величина равна 200–250 м².

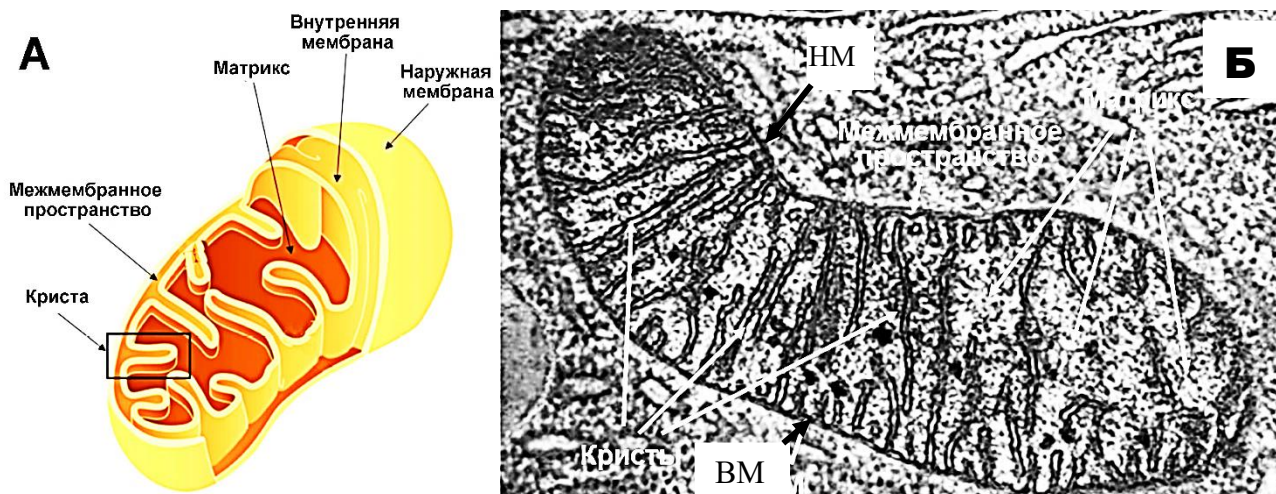


Рис. 1. Строение митохондрий

А – схема митохондрий, Б – электронно-микроскопическое изображение (НМ – наружная мембрана, ВМ – внутренняя мембрана)

МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ

Наружная мембрана (НМ) и внутренняя мембрана (ВМ), образующие митохондрию, делят органеллу на два компартмента: матрикс и межмембранное пространство. Две мембраны значительно различаются по липидному составу, по ролям трансмембранных белков, а также по проницаемости для молекул и ионов. Полагают, что эти отличия отражают эндосимбиотическое происхождение митохондрий. Так НМ митохондрий по липидному составу больше напоминает мембраны эукариотических клеток. В то же время, ВМ близка по этой характеристике мембранам бактерий и богата фосфолипидом кардиолипином. Кардиолипид или 1,3-бис(sn-3'-фосфатидил)-sn-глицерол – особый фосфолипид в составе ВМ митохондрий. В ней содержится около 20% от всего кардиолипина клетки. Кардиолипид был открыт в 1940 г. в составе мембран кардиомиоцитов быка, что и стало основанием для названия «кардиолипид». Молекула кардиолипина представляет собой дифосфатидилглицерол, в котором два фосфатидилглицерола соединены с глицеролом, формируя димерную структуру. Молекула содержит четыре «хвоста» жирных кислот (чаще всего $C_{18:2}$) и два остатка ортофосфорной кислоты (рис. 2).

Кардиолипид входит в состав III, IV и V ферментных комплексов дыхательной цепи митохондрий. Строение и функции комплексов будет подробно представлено ниже. Назначение кардиолипина – поддерживать нативную четвертичную структуру этих белковых комплексов. Показано, что избирательное удаление кардиолипина из состава комплексов приводит к потере ими функциональной активности. Помимо

этого, кардиолипин играет решающую роль в обеспечении непроницаемости ВМ митохондрий для H^+ .

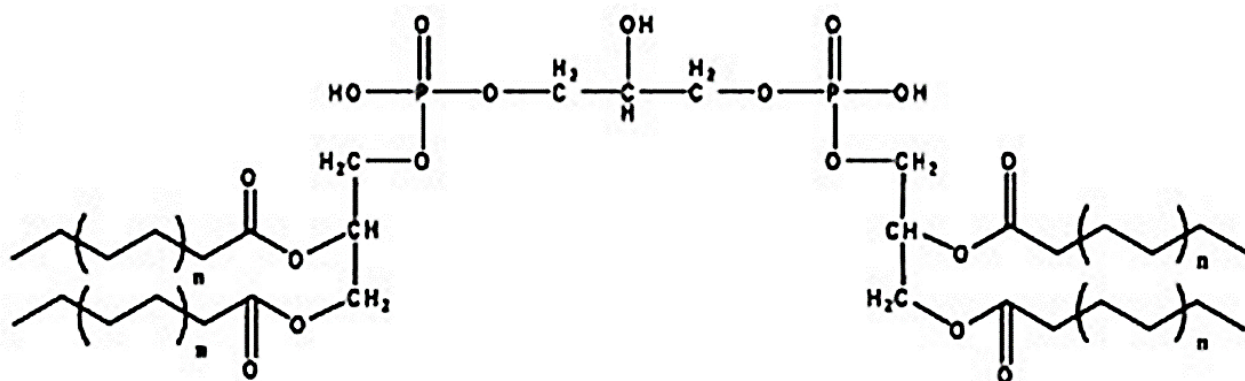


Рис. 2. Структура молекулы кардиолипина или 1,3-бис(sn-3'-фосфатидил)-sn-глицерола

ВМ характеризуется также более высоким соотношением белок / липид и образует кристы – плотно упакованные складки или инвагинации, обращённые в матрикс. Вместе со многими другими белками в кристы встроены белковые комплексы дыхательной цепи митохондрий, с помощью которой реализуются процессы окислительного фосфорилирования. Наличие крист позволяет «упаковать» возможно бóльшую площадь ВМ в минимальном объёме и, следовательно, разместить во ВМ максимально больше количество ферментных комплексов дыхательной цепи.

Конформация ВМ митохондрий и их объём обратимо изменяется в зависимости от активности процессов синтеза АТФ. Эти явления были зарегистрированы в исследованиях на изолированных митохондриях *in vivo*, осуществленных С. Хакенброк и Д. Грин в 60-е годы прошлого века. Изменения объёма органелл, находящихся в различных функциональных состояниях, были показаны с помощью электронной микроскопии, а также охарактеризованы по изменению рассеивания суспензий органелл светового потока с длиной волны 520 нм (рис. 3). Доказательством того, что ультраструктурные перестройки ВМ митохондрий и матрикса обусловлены транспортом электронов вдоль дыхательной цепи, являются данные, согласно которым эти перестройки отменяются при добавлении к суспензии органелл специфических ингибиторов окислительного фосфорилирования. Полагают, что часть энергии, выделяющейся в дыхательной цепи при транспорте

электронов, может конвертироваться в механическую работу, результатом которой и становятся изменения конформации ВМ митохондрий.

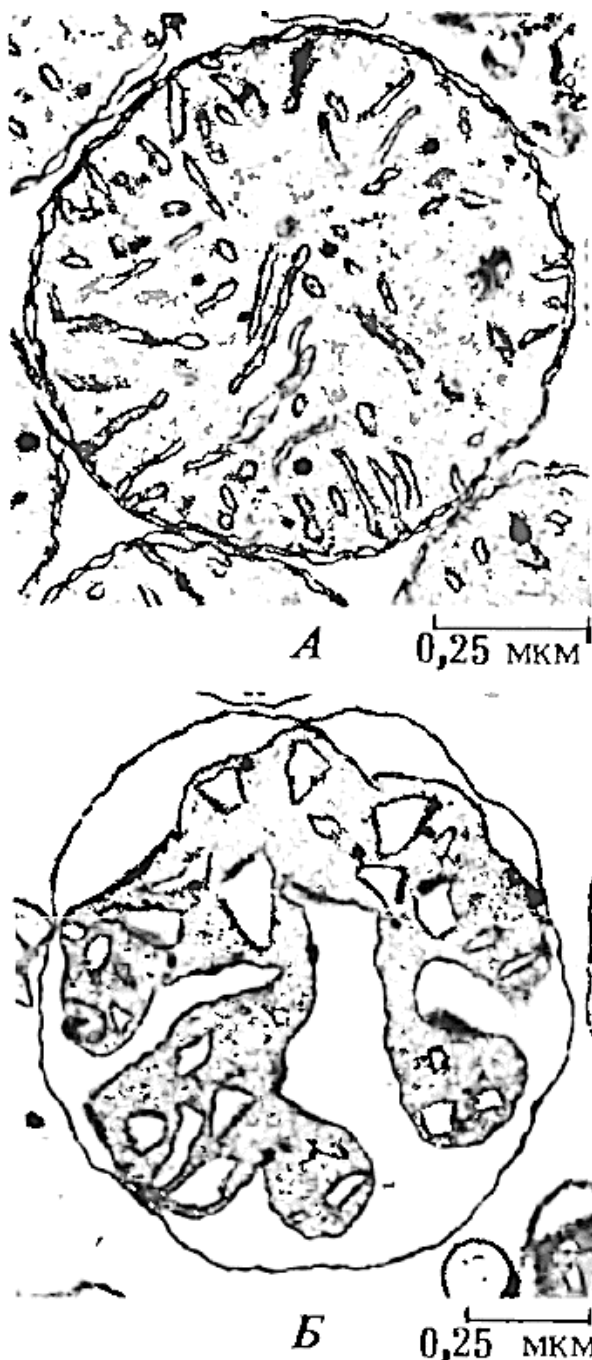


Рис. 3. Электронные микрофотографии митохондрий печени мыши в различных функциональных состояниях (Ленинджер А., 1985):

А – митохондрии в состоянии покоя. Их конформация не отличается от той, которая наблюдается на тонких срезах интактной ткани. Такая конформация называется ортодоксальной;

Б – активно дышащие митохондрии, синтезирующие АТФ с максимальной скоростью, имеют другую конформацию – конденсированную

Различая НМ и ВМ митохондрий по их проницаемости состоит в том, что НМ проницаема для многих ионов (в том числе для Ca^{2+}) и небольших молекул благодаря существованию потенциалзависимых анионных каналов (voltage dependent anionic channels – VDAC). В то же время ВМ митохондрий в норме проницаема только для воды, кислорода (O_2) и углекислого газа (CO_2). Такая селективность позволяет,

в частности, формировать на ВМ электрохимический градиент (потенциал) ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$), энергия которого используется для синтеза АТФ. Кроме того, избирательная проницаемость ВМ позволяет тонко регулировать концентрации других ионов, прежде всего, ионов Ca^{2+} , который выполняет в клетке функции вторичного мессенджера.

Помимо контроля проницаемости ВМ митохондрий для ионов, не менее важным является контроль проницаемости этой мембраны для метаболитов. Он осуществляется благодаря встроенным во ВМ специфическим белкам-переносчикам (транспортёрам). Для ВМ митохондрий человека известно более 30 транспортёров, из которых только для 21 транспортного белка идентифицированы выполняемые ими функции. Важнейшие транспортные системы ВМ митохондрий охарактеризованы ниже и представлены на схеме (рис. 4).

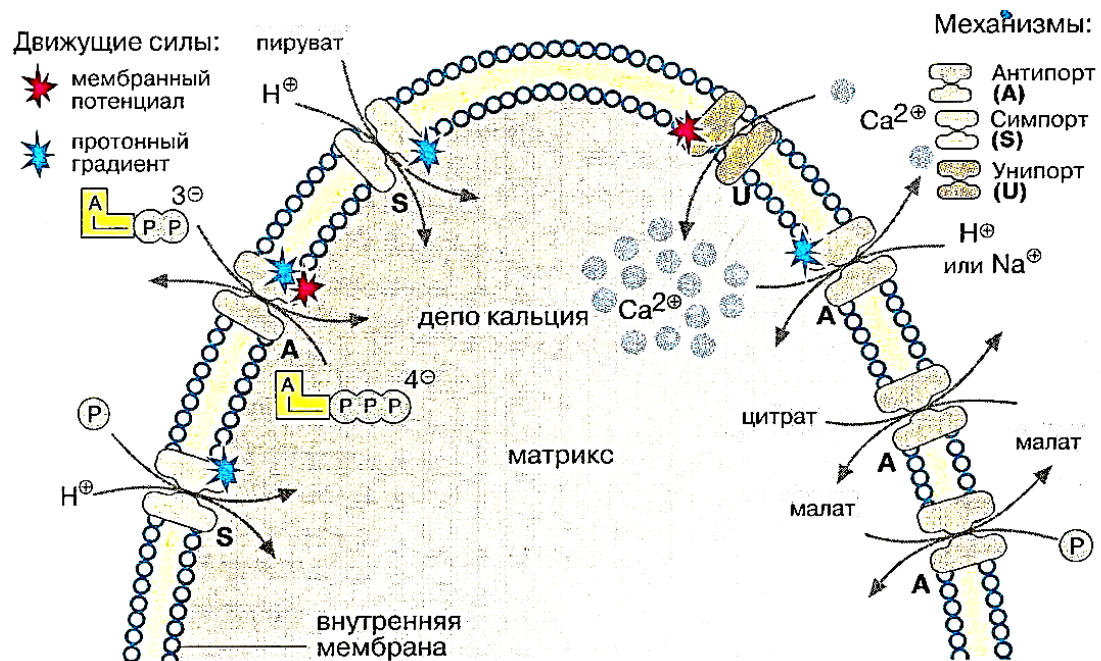
1. Адениннуклеотидтранслоказа (АНТ). Осуществляет антипорт АДФ из цитоплазмы в матрикс и АТФ из матрикса в цитоплазму. Специфическим ингибитором АНТ является атрактилозид. Это природный токсичный гликозид, присутствующий во многих видах растений из семейства маргариток.

2. Белок-транспортёр неорганического фосфата (Фн). Осуществляет симпорт Фн и H^+ .

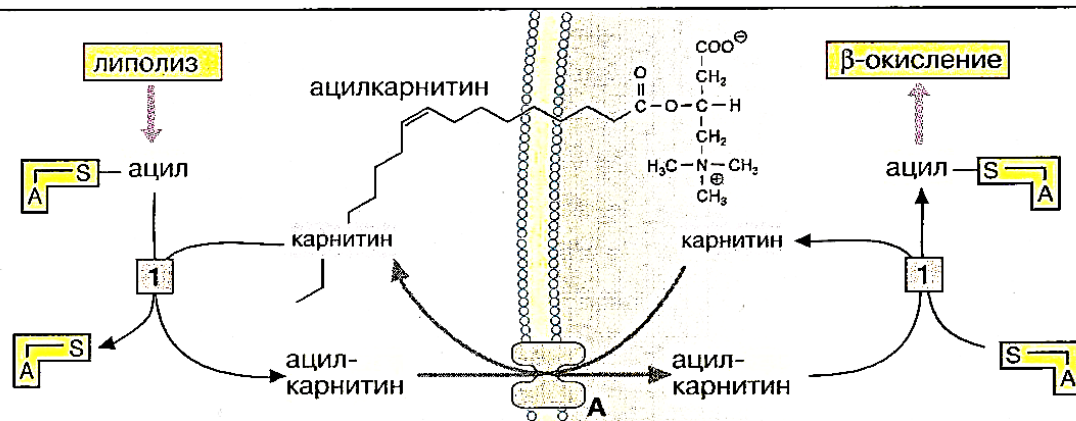
3. Переносчик пирувата. Осуществляет симпорт пирувата и H^+ .

4. Транспортёр для цитрата (переносчик трикарбоксилатов). Осуществляет облегченную диффузию цитрата из матрикса в цитоплазму. В условиях высокоуглеводной диеты в цикле Кребса образуется избыточное количество цитрата, который таким путём выходит из матрикса в цитоплазму. Здесь цитрат конвертируется в ацетил-СоА в реакции, катализируемой *АТФ-цитратлиазой*, и включается далее в синтез жирных кислот.

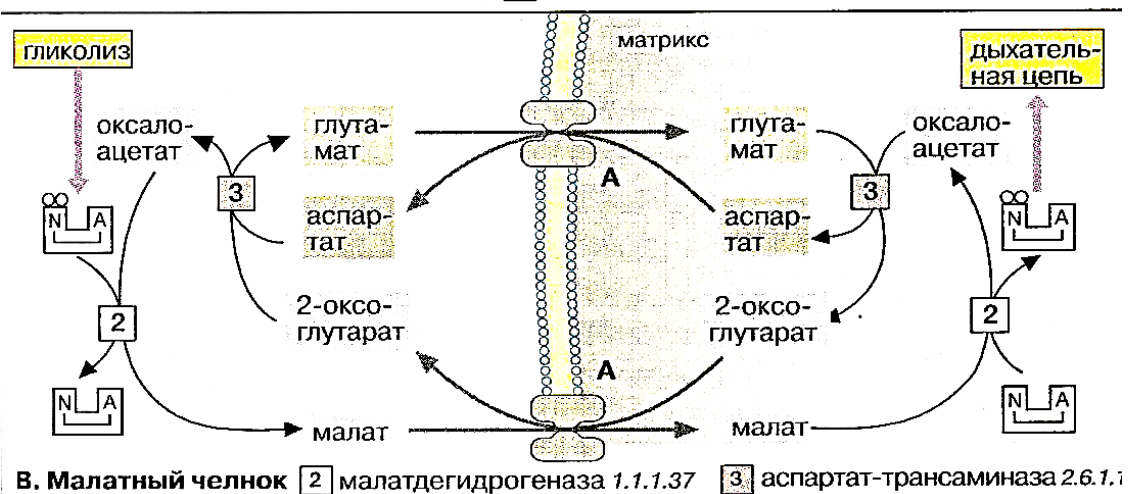
5. Карнитин-ацилкарнитинтранслоказа (карнитиновый челнок). Осуществляет антипорт карнитинового эфира длинноцепочечных жирных кислот из межмембранного пространства в матрикс и освобождаемого карнитина из матрикса в межмембранное пространство. В матриксе с участием *карнитинацилтрансферазы II* происходит перенос ацильной группы жирной кислоты с длинной цепью от ацилкарнитина на молекулу кофермента А (СоА). Продуктами реакции являются длинноцепочечный ацил-СоА (направляется в путь β -окисления) и карнитин (возвращается из матрикса в межмембранное пространство).



А. Транспортные системы



Б. Транспорт жирных кислот



В. Малатный челнок

Рис. 4. Транспортные системы внутренней мембраны митохондрий
(Кольман Я., Рём К.-Г., 2011)

6. Белок-транспортер орнитина. Осуществляет облегченную диффузию орнитина из цитоплазмы в матрикс митохондрий печени,

что необходимо для запуска очередного витка цикла синтеза мочевины (орнитинового цикла).

7. Малат-аспартатный челнок. Позволяет переносить через ВМ восстановительные эквиваленты (кофермент-связанные водороды) от НАДН⁺Н⁺, образовавшегося в цитоплазме в гликолизе, в матрикс. ВМ митохондрий непроницаема для цитоплазматических пиридиновых нуклеотидов. Работа челнока позволяет непосредственно в цитоплазме окислить НАДН⁺Н⁺ в реакции, катализируемой цитоплазматической малатдегидрогеназой. Водороды от НАДН⁺Н⁺ восстанавливают оксалоацетат до малата, который проникает в матрикс с помощью транспортера, осуществляющего антипорт малата из цитоплазмы и α -кетоглутарта из матрикса. Благодаря этому механизму осуществляется перенос восстановительных эквивалентов в матрикс в составе малата.

8. Транспортёр предшественника биосинтеза митохондриальной ДНК (дезоксинуклеотидов).

9. Транспортные системы для ионов Ca^{2+} . Кальций преодолевает барьер НМ митохондрий посредством VDAC, который характеризуется высокой проводимостью и низкой избирательностью. Во ВМ митохондрий имеется две транспортные системы для переноса Ca^{2+} , работа которых требует затрат энергии. Первая из этих систем, переносящая Ca^{2+} из межмембранного пространства в матрикс, питается энергией трансмембранного электрохимического градиента ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$). Вторая транспортная система осуществляет энергозависимый антипорт Ca^{2+} из матрикса и H^+ или Na^+ из межмембранного пространства (на рис. 4 не показана). Этот отток Ca^{2+} из матрикса в обмен на цитоплазматические H^+ или Na^+ уравнивает приток Ca^{2+} в матрикс, происходящий благодаря работе первой транспортной системы. Данные процессы важны для поддержания концентрации Ca^{2+} в цитоплазме на низком уровне 10^{-7} М.

ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Главная функция митохондрий – биоэнергетическая. Благодаря реакциям окислительного фосфорилирования, которые протекают в дыхательной цепи митохондрий, происходит образование более 95% молекул АТФ, синтезируемой в клетке. Согласно расчетам, в организме здорового взрослого человека, процесс окислительного фосфорилирования позволяет в течение одних суток синтезировать около 70 кг АТФ.

Помимо производства энергии, митохондрии также являются активными участниками широкого круга биохимических процессов, чрезвычайно важных для жизнедеятельности клетки. Среди этих процессов можно выделить участие митохондрий в апоптозе, в регулировании Ca^{2+} -гомеостаза на уровне клетки, в процессах биосинтеза гема и железосерных кластеров, а также в процессе теплопродукции.

Биоэнергетическая функция (производство энергии)

Жизнедеятельность любых живых существ реализуется в форме выполнения нескольких видов работ, важнейшими из которых являются:

- а) преобразование механической работы в мышечное сокращение и другие формы клеточных движений;
- б) активный транспорт молекул и ионов;
- в) синтез сложных биомакромолекул из относительно простых предшественников.

Выполнение любого вида работ требует постоянного притока свободной энергии. Под свободной энергией подразумевают часть общей энергии системы, которая доступна для совершения любых видов работ, лежащих в основе жизнедеятельности клетки, органа и организма в целом. Свободная энергия поступает в гетеротрофные организмы из окружающей среды в виде различных питательных веществ – «энергетических субстратов», которые являются для них также единственными источниками углерода и азота.

К гетеротрофным организмам относится человек и все высшие животные, а также многие микроорганизмы. В ходе окисления питательных веществ в организме из них поэтапно извлекается свободная энергия, которая сразу же аккумулируется в форме макроэргических связей молекулы АТФ (рис. 5).

АТФ является непосредственно используемым донором свободной энергии для нуждающихся в ней метаболических процессов. АТФ называют «энергетической валютой», подчеркивая этим центральную роль АТФ в энергетическом обмене биосистем. Эта роль молекул АТФ была раскрыта благодаря исследованиям Ф. Липмана и Г. Калькара в 1941 г.

В клетках человека молекула АТФ расходуется в течение не более чем одной минуты после её синтеза, что свидетельствует об очень высоком обороте АТФ. По этой причине, внутриклеточная концентрация АТФ сравнительно невелика. В разных типах клеток она варьирует в

диапазон от 1 до 10 мкмоль на 1 г ткани. Исходя из этих представлений, некорректно рассматривать АТФ в качестве молекулы – хранителя свободной энергии, или молекулы, депонирующей энергию. По мнению академика В.П. Скулачева, термин, наиболее адекватно отражающим суть явления, это «аккумулирование».

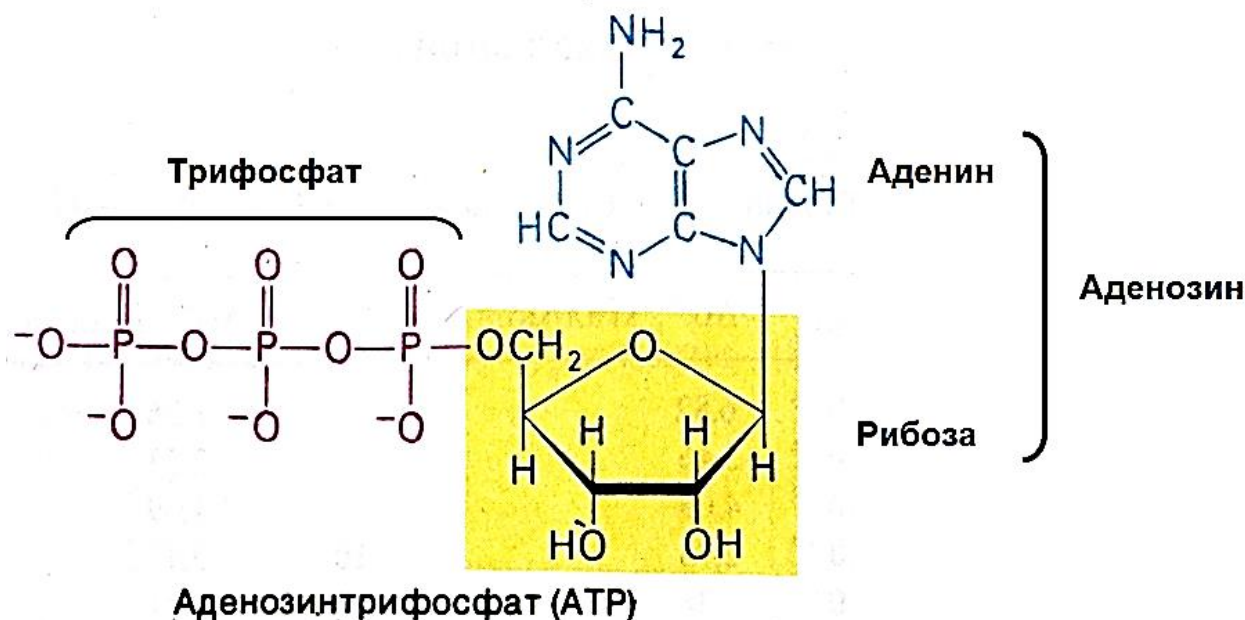


Рис. 5. Строение молекулы аденозинтрифосфата (АТФ)

Две фосфоангидридные связи (у 2-го и 3-го атомов фосфора) Ф. Липман предложил называть «высокоэнергетическими» или «макроэргическими фосфатными связями». В клетках различных типов гидролиз концевой фосфоангидридной связи АТФ ($\text{АТФ} \rightarrow \text{АДФ} + \text{Фн}$) сопровождается изменением свободной энергии (ΔG) от -12,4 до -16 ккал/моль. При этом изменение стандартной свободной энергии гидролиза связи АТФ (ΔG°) составляет всего -7,3 ккал/моль. Молекула АТФ впервые была выделена из мышц животных С. Фиске и Й. Суббароу. Строение молекулы АТФ было выяснено в 1947 г., благодаря работам А. Тодда

АТФ **аккумулирует** порцию свободной энергии, которая оперативно доставляется к метаболическим реакциям, которые в ней нуждаются. В то же время, в клетке действительно существует, хоть и незначительный по ёмкости, но реальный резерв, или депо свободной энергии в форме высокоэнергетических фосфорилированных соединений – фосфагенов. Например, один из представителей группы фосфагенов – креатинфосфат, образуется путем фосфорилирования креатина с участием фермента *креатинфосфокиназы*. Донором фосфатной группы является АТФ. Молекула креатинфосфата содержит одну макроэргическую связь. В определённых условиях креатинфосфат обменивается

этой фосфатной группой с молекулой АДФ, что сопровождается образованием новой молекулы АТФ. В этом случае синтез АТФ происходит быстро и без участия дыхательной цепи митохондрий.

Таким образом, полноценное существование клетки возможно только при условии непрерывного регенерирования АТФ из АДФ и Фн. Эти явления могут быть описаны в рамках функционирования **энергетического цикла** или **цикла АТФ-АДФ** (рис. 6). Схема показывает, что АТФ – главный химический посредник, который связывает в клетке процессы, идущие с выделением энергии (катаболизм) и процессы, происходящие с потреблением энергии (анаболизм).

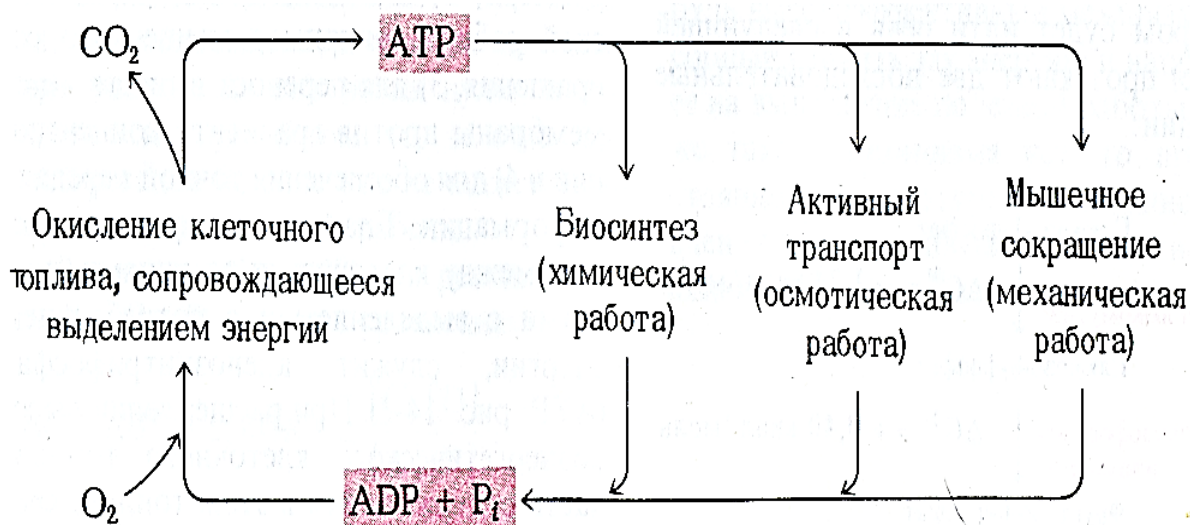


Рис. 6. Энергетический цикл или цикл АТФ–АДФ, как основной механизм обмена энергии в биологических системах

В организме человека существует два главных энергетических субстрата, полное окисление которых до H_2O и CO_2 позволяет синтезировать основное количество АТФ. Это поступающие с пищей глюкоза и длинноцепочечные жирные кислоты, среди которых наибольшее значение имеет пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$). Белки также могут включаться в производство энергии, благодаря способности аминокислот превращаться в пируват с помощью реакций переаминирования. В физиологических условиях вклад окисления аминокислот в синтез АТФ чрезвычайно мал. Биологическая целесообразность этого понятна, если учесть большое количество уникальных функций, выполняемых белками в организме. Заметное участие аминокислот в биоэнергетике организма наблюдают только в терминальной стадии голодания, когда организм реализует «аварийную» попытку выживания в условиях продолжающегося отсутствия пищи.

Ферментативное расщепление главных питательных веществ, которые служат клетке источником энергии: углеводов и липидов, совершается поэтапно, через ряд последовательных ферментативных реакций. Такая постепенность процессов позволит минимизировать потерю извлекаемой энергии в виде тепла. Это чрезвычайно важно, поскольку биосистемы неспособны при постоянном давлении и температуре использовать тепловую энергию для совершения какой-либо работы. В аэробном катаболизме различают три стадии (рис. 7).

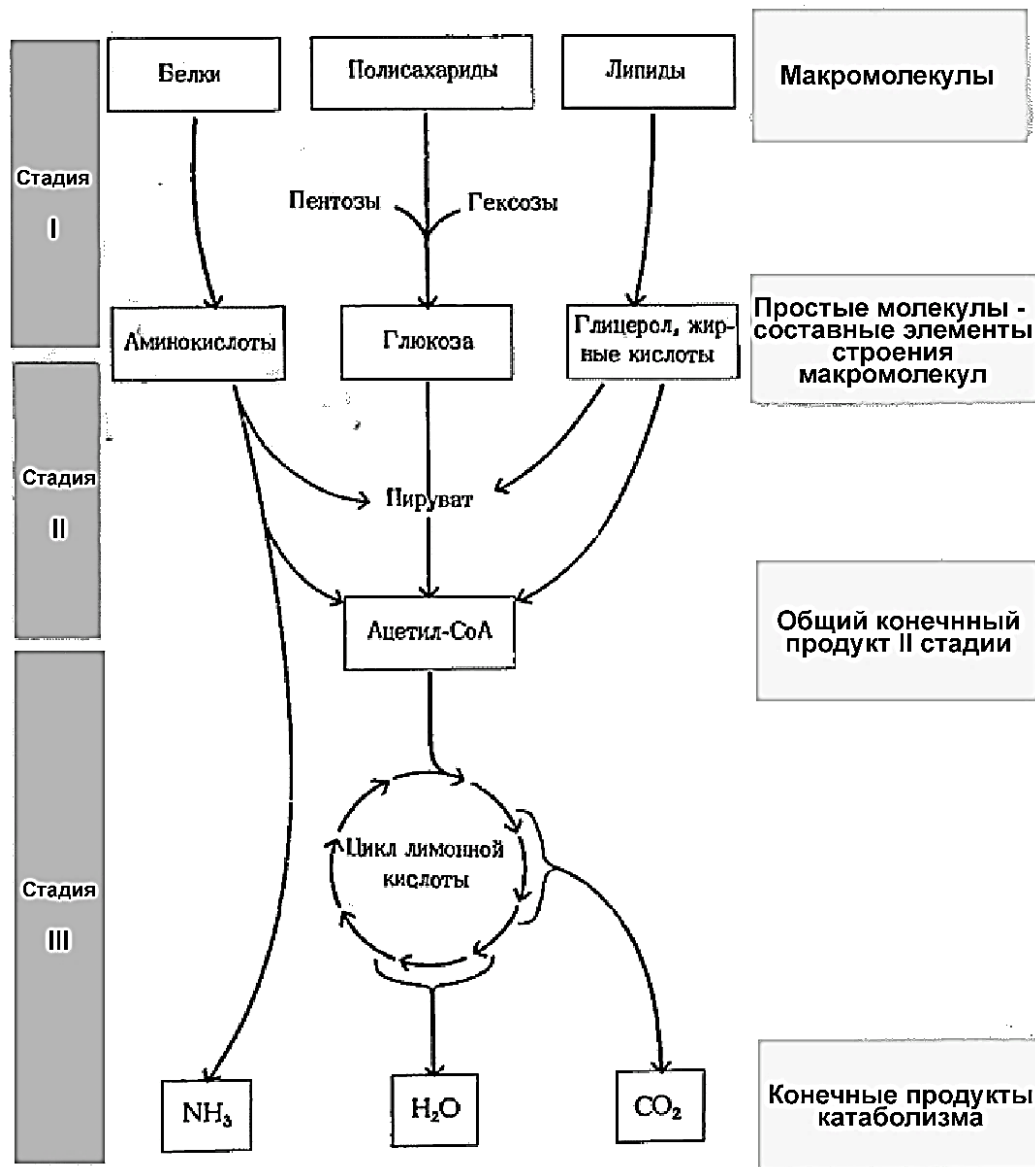


Рис. 7. Три стадии катаболических превращений основных питательных веществ в клетке (Ленинджер А., 1985)

На **стадии I** макромолекулы питательных веществ распадаются на свои основные составные элементы: полисахариды распадаются до гексоза или пентоз, липиды – до свободных (неэстерифицированных)

жирных кислот и глицерола, а белки – до аминокислот. Эти разнообразные соединения являются продуктами стадии I. На этой стадии извлекается около 1% от всей содержащейся в молекулах энергии, которая практически полностью рассеивается в виде тепла.

На **стадии II** продукты стадии I катаболизма, превращаются в ещё более простые соединения. Гексозы, пентозы и глицерол расщепляются до одного и того же трёхуглеродного промежуточного продукта – пирувата, а затем до единственной двухуглеродной формы – ацетильной группы ацетилкоэнзима А (ацетил-СоА). Аналогичное превращение претерпевают жирные кислоты и углеродные скелеты большей части аминокислот: их расщепление также завершается образованием ацетил-СоА. Таким образом, ацетил-СоА представляет собой **общий конечный продукт II** стадии катаболизма. На этой стадии извлекается и аккумулируется около 13% энергии, содержащейся в метаболитах.

На **стадии III** ацетильная группа ацетил-СоА включается в цикл Кребса – общий конечный путь, на котором почти все виды клеточного «топлива» окисляются в конце концов до CO_2 . Конечными продуктами катаболизма являются также вода, аммиак и другие азотсодержащие соединения. На стадии III извлекается и аккумулируется около 46% энергии, содержащейся в метаболитах цикла Кребса (рис. 7).

На **II стадии** катаболизма одна молекула глюкозы, окисляясь в гликолизе, на выходе образует всего 2 молекулы АТФ (субстратное фосфорилирование, без участия митохондрий) и 2 молекулы пирувата. Гликолиз протекает в цитоплазме клетки и формально не требует участия кислорода.

Молекулы пирувата проникают из цитоплазмы в матрикс митохондрий, преодолевая барьер ВМ с помощью специфического белка-переносчика (рис. 4). В матриксе митохондрий пируват декарбоксилируется с участием пирватдегидрогеназы и превращается в ацетил-СоА. Длинноцепочечные жирные кислоты в форме карнитиновых эфиров проникают через ВМ митохондрий в матрикс посредством переносчика *карнитин-ацилкарнитинтранслоказы* и включаются в метаболический циклический путь β -окисления. Каждый оборот цикла образует 1 молекулу ацетил-СоА и по одной молекуле НАДН- H^+ и ФАДН₂.

Таким образом, основными поставщиками ацетил-СоА являются процессы окисления глюкозы и жирных кислот. Относительный вклад каждого из этих процессов может варьировать, в зависимости от преобладания в рационе углеводов или жиров, а также в зависимости от функционального состояния организма. Так, в условиях голодания, в

рамках адаптивных реакций, организм обратимо переключается с «углеводной энергетики» на «липидную». Это обусловлено переходом на преимущественное окисление жирных кислот, мобилизуемых из жировой ткани, поскольку запас гликогена печени расходуется спустя 12 ч голодания у мелких грызунов и к концу первых (полутора) суток голодания у человека. Незначительный вклад белков в образование ацетил-СоА основывается на способности превращаться в него кетогенных и гликокетогенных аминокислот. К первым относятся лейцин и лизин, ко вторым – тирозин, триптофан, фениланин и изолейцин.

Метаболический путь, играющий ключевую роль в процессе производства АТФ в клетке – цикл Кребса (цикл лимонной кислоты, цикл трикарбоновых кислот). Цикл протекает в матриксе митохондрий (рис. 8).

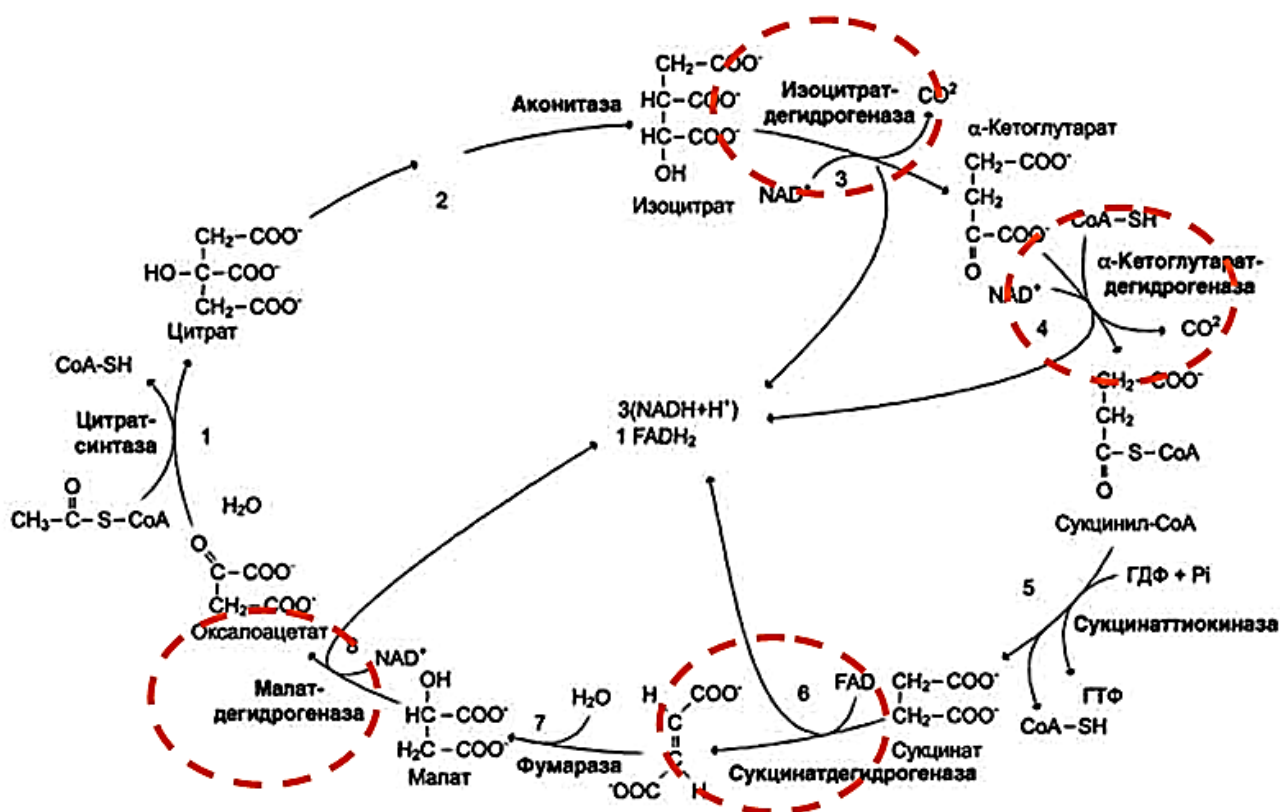


Рис. 8. Цикл Кребса

В составе цикла функционируют 4 дегидрогеназы. Три из них – NADH+H^+ -зависимые: изоцитрат-, α-кетоглутарат- и малатдегидрогеназы. На схеме обозначены цифрами: 3, 4 и 8. Одна дегидрогеназа FADH_2 -зависимая – сукцинатдегидрогеназа. На схеме обозначена цифрой 6.

Первой реакцией цикла Кребса, лимитирующей его скорость, является реакция конденсации ацетил-СоА и оксалоацетата. Реакцию катализирует **цитратсинтаза** (на рис. 8 обозначена цифрой 1). Как было

сказано выше, молекулы ацетил-СоА поступают, в основном, из путей окисления глюкозы и жирных кислот. Осалоацетат образуется в последней реакции цикла катализируемой *малатдегидрогеназой* (реакция 8).

Так, по завершении каждого оборота цикла, происходит «регенерация» молекулы оксалоацетата, без которого была бы невозможной инициация первой реакции очередного оборота цикла. Один оборот цикла Кребса продуцирует: 2 молекулы CO_2 (реакции 3 и 4), 1 молекулу гуанозинтрифосфата (ГТФ) (реакция 5), 3 молекулы НАДН- H^+ (реакции 3, 4 и 8) и 1 молекулу ФАДН₂ (реакция 6).

Четыре дегидрогеназы цикла Кребса и две дегидрогеназы β -окисления (по вовлечённости в один оборот каждого из циклов) направляют в дыхательную цепь митохондрий 12 пар атомов водорода. В дыхательной цепи ВМ митохондрий происходит разделение зарядов. Электроны транспортируются вдоль переносчиков дыхательной цепи к *цитохромоксидазе*, где происходит восстановление молекулы кислорода, и образуется вода. Энергия, выделяющаяся при транспорте электронов, используется для переноса H^+ через ВМ в межмембранное пространство и формирования трансмембранного электрохимического потенциала ($\Delta\mu\text{H}^+$). Энергия $\Delta\mu\text{H}^+$ используется АТФ-синтазой для образования АТФ из АДФ и Фн. Таким образом, цикл Кребса, β -окисление жирных кислот и дыхательная цепь митохондрий имеют теснейшую функциональную взаимосвязь.

Строение дыхательной цепи и процесс синтеза АТФ митохондриями будут подробно рассмотрены ниже.

АПОПТОЗ

Митохондрии играют ключевую роль в реализации и в регуляции запрограммированной гибели клеток – апоптозе. Апоптоз может быть запущен ответ на повреждающие клетку воздействия, такие как повреждение ДНК, окислительный стресс, иммунные реакции и отсутствие определенных факторов роста, гормонов и цитокинов. Кроме этого, апоптоз рассматривают в качестве естественного участника эмбрионального и постнатального развития, а также процесса старения организма.

Принято рассматривать два пути апоптоза: внешний и внутренний. Они иницируются различными факторами, но имеют общую стадию исполнения. На стадии исполнения апоптоза сначала активируются иницирующие апоптоз *каспазы* (*каспазы 8 и 9*), а затем активируются

исполнительные *каспазы* (*каспазы 3 и 7*). Внешний путь или рецепторный путь апоптоза, не задействующий митохондрии, активируется внеклеточными лигандами, связывающимися с «рецепторами клеточной смерти» на цитоплазматической мембране. В результате формируется сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную смерть (death-inducing signaling complex – DISC). Далее этот комплекс активирует иницирующую *каспазу 8*, а затем исполнительную *каспазу 3*.

Митохондриальный или внутренний путь апоптоза иницируется внутриклеточными повреждающими факторами, которые приводят к нарушению биоэнергетической функции митохондрий. В этом явлении активная роль принадлежит проапоптотическим белкам BAX и BAK из семейства Bcl-2, объединяющего белки – регуляторы апоптоза. Белки BAX и BAK ассоциированы с НМ митохондрий. Под влиянием эндогенных повреждающих факторов белки BAX и BAK взаимодействуют с каналом VDAC и открывают его. В результате этого в НМ митохондрий быстро формируется высокопроницаемая «гигантская пора», благодаря которой из межмембранного пространства в цитоплазму выходит цитохром с. Оказавшись таким путём в цитоплазме, цитохром с связывает с апоптотическим фактором активации протеазы-1 (apoptotic protease activating factor-1 – Araf-1). В результате формируется сложный комплекс, известный как «апоптосома», которая состоит из семи молекул цитохрома с и из семи молекул Araf-1. В состав апоптосомы включается иницирующая *прокаспаза-9*, которая переходит в активную форму. Активная *каспаза 9*, в свою очередь, активирует исполнительную *каспазу 3*. В итоге иницируется общая для обоих путей апоптоза стадия исполнения апоптоза. На этой стадии процесса происходит фрагментация ДНК, деградация цитоскелетных и ядерных белков, сшивание белков и образование апоптотических телец.

Таким образом, дисфункции митохондриальной биоэнергетики являются частой причиной запуска митохондриального пути апоптоза. В этих условиях можно наблюдать также аутофагию отдельных нежизнеспособных митохондрий.

ГОМЕОСТАЗ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток регулирует широкий круг метаболических реакций, а сам Ca^{2+} является вторичным мессенджером. Эндоплазматический ретикулум является

самым главным внутриклеточным депо кальция. В то же время, известно, что митохондрии также способны быстро поглощать значительные количества кальция, и возвращать его в цитоплазму. Эти факты указывают на то, что митохондрии способны вносить существенный вклад в стабилизацию клеточного гомеостаза Ca^{2+} .

Уровни кальция в матриксе митохондрий могут достигать десятков микромолей, что достаточно для активации *изоцитратдегидрогеназы*, одного из ключевых ферментов цикла Кребса. Показано, что Ca^{2+} в матриксе участвует в регуляции активности других ферментов, таких как: *пируват-*, *изоцитрат-* и *α -кетоглутаратдегидрогеназы*, тем самым модулируя интенсивность митохондриального дыхания. Приток Ca^{2+} в митохондриальный матрикс с недавних пор рассматривают также и как ещё один механизм регуляции активности клеточного дыхания. Поступление в матрикс ионы Ca^{2+} оказывает влияние на величину $\Delta\Psi$ – электрической составляющей $\Delta\mu\text{H}^+$, которая обычно доминирует над другой составляющей $\Delta\mu\text{H}^+ - \Delta p\text{H}$. Изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки с участием митохондрий может координировать такие процессы, как высвобождение нейромедиаторов в нейронах и секреции гормонов из эндокринных клеток.

СИНТЕЗ ГЕМА

Гем представляет собой комплексное соединение порфирина с атомом двухвалентного железа. Гем, точнее протопорфирин IX, является простетической группой белков – гемопroteинов: гемоглобина, миоглобина, цитохромов и коферментом различных оксидоредуктаз. Цитохромы в составе дыхательной цепи митохондрий, транспортируют электроны к *цитохромоксидазе*, опосредуя важнейшие этапы клеточного дыхания. Синтез гема протекает в двух компартментах клетки: в митохондриях и в цитоплазме. Путь биосинтеза начинается в митохондриях с реакции конденсации сукцинил-СоА и глицина. Превращение катализирует *5-аминолевулинатсинтаза* – ключевой фермент этого биосинтетического пути. Продукт реакции 5-аминолевулинат выходит в цитоплазму, где протекают следующие четыре реакции синтеза. Они завершаются образованием копропорфириногена III, который возвращается в митохондрии для финальных реакций синтеза гема. С участием локализованной в матриксе *феррохелатазы*, в молекулу гема вводится атом двухвалентного железа. Готовый гем (протопорфирин IX) далее включается в состав гемоглобина, миоглобина или цитохромов.

СИНТЕЗ Fe/S-КЛАСТЕРОВ

Железосерные кластеры функционируют в качестве простетических групп ряда ферментов, таких, как гликозилазы, хеликазы, праймазы, а также входят в состав большинства белковых комплексов дыхательной цепи митохондрий, обеспечивая их активность. Большинство соответствующих белков содержат три типа Fe/S-кластеров: ромбовидный (Fe_2/S_2), прямоугольный (Fe_3/S_4) и кубический (Fe_4/S_4). В образовании связей кластеров с белками участвуют, чаще всего, цистеин, а также гистидин, серин и аргинин. Структура кластера представлена ниже в разделе «**Комплекс I: НАДН-СоQ-оксидоредуктаза (НАДН: убихинон-оксидоредуктаза)**» (С. 34).

Центральный участник биосинтеза Fe/S-кластеров называется: *фермент сборки железосерного кластера* (iron-sulfur cluster assembly enzyme – ISCU), который действует как каркас в ходе начальной стадии синтеза кластера ($2\text{Fe}-2\text{S}$). Донорами сульфид-ионов, используемых в этом процессе, является цистеин. Реакцию катализирует *цистеиндесульфураза*. Механизм доставки атома железа к ISCU не выяснен.

ТЕПЛОПРОДУКЦИЯ

В организме большинства теплокровных животных существует несколько типов теплопродукции – термогенеза. Один из этих типов – несократительный термогенез. При этом усиление выработки тепла в ответ на переохлаждение организма, происходит не за счет рефлекторной холодовой мышечной дрожи, а благодаря бурой жировой ткани. Адипоциты этой ткани (бурые адипоциты) существенно отличаются по морфологии и функциям от таковых из белой жировой ткани – белых адипоцитов. Бурые адипоциты меньше белых адипоцитов, имеют форму, напоминающую многоугольник, содержат несколько мелких жировых капель и большое количество митохондрий, которые, как оказалось, и придают характерный цвет этой разновидности жира. Охлаждение организма повышает в крови концентрацию норадреналина, который связывается с β -адренергическими рецепторами мембран бурых адипоцитов. Активация рецепторов приводит к стимулированию аденилатциклазы и быстрому повышению внутриклеточной концентрации цАМФ, который запускает липолитический каскад гормончувствительной липазы. Ферменты каскада мобилизуют неэстерифицированные жирные кислоты из депо – молекул триацилглицерола, хранящегося в жировых каплях. Жирные кислоты становятся основ-

ным субстратом окисления в митохондриях бурого жира. Однако большая часть энергии образующегося $\Delta\mu\text{H}^+$ на ВМ митохондрий бурых адипоцитов расходуется не на синтез АТФ, а рассеивается в виде тепла, обогревающего окружающие ткани. Это происходит благодаря уникальному белку – термогенину или разобщающему белку-1 (uncoupling protein-1 – UCP-1). UCP-1 встраивается во ВМ митохондрий и образует поры, через которые H^+ возвращаются в матрикс из межмембранного пространства вдоль градиента своей концентрации, минуя H^+ -канал АТФ-синтазы.

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Окислительное фосфорилирование – процесс образования АТФ, сопряженный с переносом электронов от окисляемого субстрата вдоль дыхательной цепи (электрон-транспортной цепи) ВМ митохондрий на кислород. Транспорт электронов сопровождается окислительно-восстановительными реакциями, в ходе которых выделяется энергия, аккумулируемая в макроэргических связях молекул АТФ. Термин «окислительное фосфорилирование» был введен В. Белицером в 1939 г.

Начало изучения процессов окислительного фосфорилирования было положено в 1906 г. работами А. Хардена, который, в частности, показал важную роль фосфата в процессах брожения. Однако только в 40-е годы Г. Калькаром была доказана связь между окислением сахара и образованием АТФ. Результаты исследований Калькара подтвердили предположение Ф. Липмана (1941 г.) о центральной роли молекулы АТФ в энергетическом обмене. В 1949 г. М. Фридкин и А. Ленинджер доказали, что кофермент НАДН является активным участником цикла Кребса и процесса синтеза АТФ.

В течение двух последующих десятилетий были получены важнейшие для биоэнергетики факты, сыгравшие ключевые роли в выяснении механизмов образования АТФ:

- Были выделены и охарактеризованы ферментные комплексы дыхательной цепи (электрон-транспортной цепи), встроенной во ВМ митохондрий. Наибольший вклад в эти исследования внёс Д. Грин.
- В 1960 г. Э. Рэкером была открыта *АТФ-синтаза* митохондрий.
- В 1973–1982 годах П. Бойер изучил механизм работы АТФ-синтазы.

Помимо вышеперечисленных открытий, на рубеже 50–60-х годов прошлого столетия были сформулированы гипотезы механизмов сопряжения дыхания и фосфорилирования.

ГИПОТЕЗЫ МЕХАНИЗМОВ СОПРЯЖЕНИЯ ДЫХАНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Гипотеза конформационного или механохимического сопряжения (Д. Грин и П. Бойер)

Главный постулат гипотезы состоит в том, что при переносе электронов и протонов по дыхательной цепи митохондрий, ферментные комплексы, участвующие в этих явлениях, приобретают новую (напряженную), богатую энергией конформацию. Эти конформационные изменения передаются на *АТФ-синтазу* митохондрий и активируют её. Последующий возврат *АТФ-синтазы* в исходное (релаксированное) конформационное состояние сопровождается высвобождением энергии, которая используется для синтеза АТФ и для освобождения образовавшейся молекулы АТФ из активного центра фермента. Имеются данные, подтверждают различные конформационные состояния ультраструктуры крист ВМ митохондрий при разных уровнях дыхательной активности. Однако, объяснить активацию *АТФ-синтазы* исключительно конформационными переходами, так и не представилось возможным. Не обнаружено также удовлетворительного совпадения времени окислительного фосфорилирования и времени конформационных изменений крист ВМ митохондрий.

Гипотеза химического сопряжения (Ф. Липман и Э. Слейтер)

В основе гипотезы лежит предположение о том, что в мембране митохондрий происходит прямое преобразование химической энергии, освобождаемой в результате окислительно-восстановительных реакций транспорта электронов по дыхательной цепи. Сначала образуется некий гипотетический макроэргический интермедиат. Его последующее расщепление сопровождается высвобождением энергии, которая обеспечивает фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом. Таким образом, предполагаемый механизм синтеза АТФ имел общие черты с субстратным фосфорилированием. В настоящее время гипотеза химического сопряжения также перестала быть актуальной, поскольку многолетние поиски «гипотетического макроэргического интермедиата» так и не увенчались успехом.

Гипотеза хемиосмотического сопряжения (П. Митчелл)

В период 1961–1966 годы Питер Митчелл (Великобритания) опубликовал основные положения своей гипотезы (теории) окислительного фосфорилирования. Автор назвал её хемиосмотической на основе того, что в рамках гипотезы он связал синтез АТФ в митохондриях с трансмембранным электрохимическим потенциалом ионов водорода

на ВМ митохондрий, создаваемым благодаря транспорту электронов по дыхательной цепи. П. Митчелл был удостоен Нобелевской премии по химии (1978 г.) «За вклад в понимание процесса переноса биологической энергии, сделанный благодаря созданию хемиосмотической теории». Существенный вклад в развитие и подтверждение правильности гипотезы П. Митчелла внесли отечественные биохимики В. Скулачёв и Е. Либерман.



Питер Митчелл
Peter Dennis Mitchell

1920 - 1992

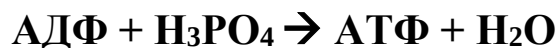


Владимир Петрович
Скулачёв

1935

Основные постулаты теории:

1. ВМ митохондрий непроницаема для ионов H^+ , OH^- , K^+ и Cl^- . Мембрана должна быть замкнута в виде пузырька.
2. За счет энергии транспорта электронов вдоль ферментных комплексов дыхательной цепи, встроенной во ВМ митохондрий, из матрикса выкачиваются H^+ в межмембранное пространство.
3. Возникающий на ВМ митохондрий электрохимический потенциал H^+ ($\Delta\mu H^+$) является промежуточной формой аккумуляции энергии, которая далее расходуется на синтез АТФ.
4. Возвращение H^+ в матрикс митохондрии возможно только через специальный протонный канал АТФ-синтазы. Этот процесс является поставщиком энергии для синтеза АТФ по схеме:



В качестве важных доказательств адекватности хемиосмотической гипотезы (теории) сопряжения П. Митчелла можно привести следующие факты:

1. На ВМ мембране митохондрий есть градиент концентрации H^+ и его можно измерить.

2. Создание градиента H^+ на ВМ митохондрий сопровождается синтезом АТФ.

3. Ионофоры (разобщители), которые, встраиваясь во ВМ органелл, создают поры для H^+ и рассеивают протонный градиент, что тормозит (прекращает) синтез АТФ.

4. Соединения-ингибиторы, блокирующие транспорт H^+ по протонному каналу АТФ-синтазы, ингибируют (прекращают) синтез АТФ.

На протяжении последних 50 лет гипотеза (теория) хемиосмотического сопряжения дыхания и фосфорилирования П. Митчелла остаётся единственной теорией, которая способна удовлетворительно объяснить подавляющее большинство эмпирических фактов, полученных ведущими исследователями-биоэнергетиками во всем мире при изучении функциональной активности митохондрий. Следует отметить, что в рамках хемиосмотической теории есть несколько вопросов, из которых два важнейших не решены до сих пор:

1. Не удалось экспериментально доказать предположенные П. Митчеллом механизм и стехиометрию переноса H^+ через ВМ из матрикса наружу. Митчелл полагал, что H^+ -переносящие и электронтранспортирующие белки дыхательной цепи образуют три «петли». Каждая петля переносит через мембрану из матрикса наружу $2H^+$. Два электрона, оставшиеся после выведения в среду $2H^+$, возвращаются обратно, переходят на внутреннюю сторону мембраны. На каждую пару электронов, поступающих от окисляемого субстрата на O_2 , эти три петли переносят из матрикса во внешнюю среду шесть ионов водорода ($3 \times 2 = 6H^+$).

2. Нет ясности в том, каким же именно образом поток H^+ через сложную АТР-синтазную систему создает новую ковалентную связь, посредством которой присоединяется концевая фосфатная группа АТР.

Таким образом, вышеперечисленные нерешенные вопросы до сих пор обязывают нас использовать термин **хемиосмотическая гипотеза** или **теория**. Некорректно говорить «хемиосмотический механизм» сопряжения дыхания и фосфорилирования.

СТРОЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Дыхательная цепь или электрон-транспортная цепь представляет собой систему трансмембранных белков и белков-переносчиков, встроенных во ВМ митохондрий, которые получают протоны и электроны от НАДН-Н⁺ и ФАДН₂. На долю белков, входящих в состав дыхательной цепи, приходится 20–25% общего белка ВМ митохондрий. Поступившие в дыхательную цепь электроны по её цитохромному сегменту передаются к акцептору – молекулярному кислороду (О₂). Энергия, выделяющаяся в ходе окислительно-восстановительных реакций, которые лежат в основе транспорта электронов, используется для переноса протонов в межмембранное пространство. В результате формируется трансмембранный потенциал ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$), энергия которого используется для синтеза АТФ.

Компоненты дыхательной цепи как бы «инкрустируют» ВМ митохондрий. Показано, что эти компоненты определенным образом сгруппированы на плоскости ВМ. Каждая из групп составляет некую самостоятельно функционирующую единицу. В составе каждой такой единицы в определенном молярном соотношении содержится полный набор всех необходимых для синтеза АТФ белков-переносчиков. Эти функциональные единицы получили название «дыхательных ансамблей». Расстояние между центрами соседних ансамблей составляет около 20 нм.

Общая схема строения и функционирования дыхательной цепи во ВМ митохондрий, согласно хемиосмотической гипотезе, представлена на рисунке 9.

Представленная на рисунке 9 схема показывает, что цепь переноса электронов (дыхательная цепь) образует трансмембранный электрохимический потенциал Н⁺, накапливая их в межмембранном пространстве. Ионы Н⁺ из межмембранного пространства могут проникнуть обратно в матрикс только через специальный канал в составе *АТФ-синтазы* (на схеме дано альтернативное обозначение фермента - *F₀F₁АТФ-аза*). Этот переход Н⁺ сопровождается выделением свободной энергии, за счёт которой синтезируется АТФ.

В результате совместного действия *фосфат-транслоказы* и *адениннуклеотид транслоказы* фосфат (Фн) и АДФ получают возможность проникнуть в матрикс, а АТФ – выйти из матрикса в цитоплазму (рис. 10).

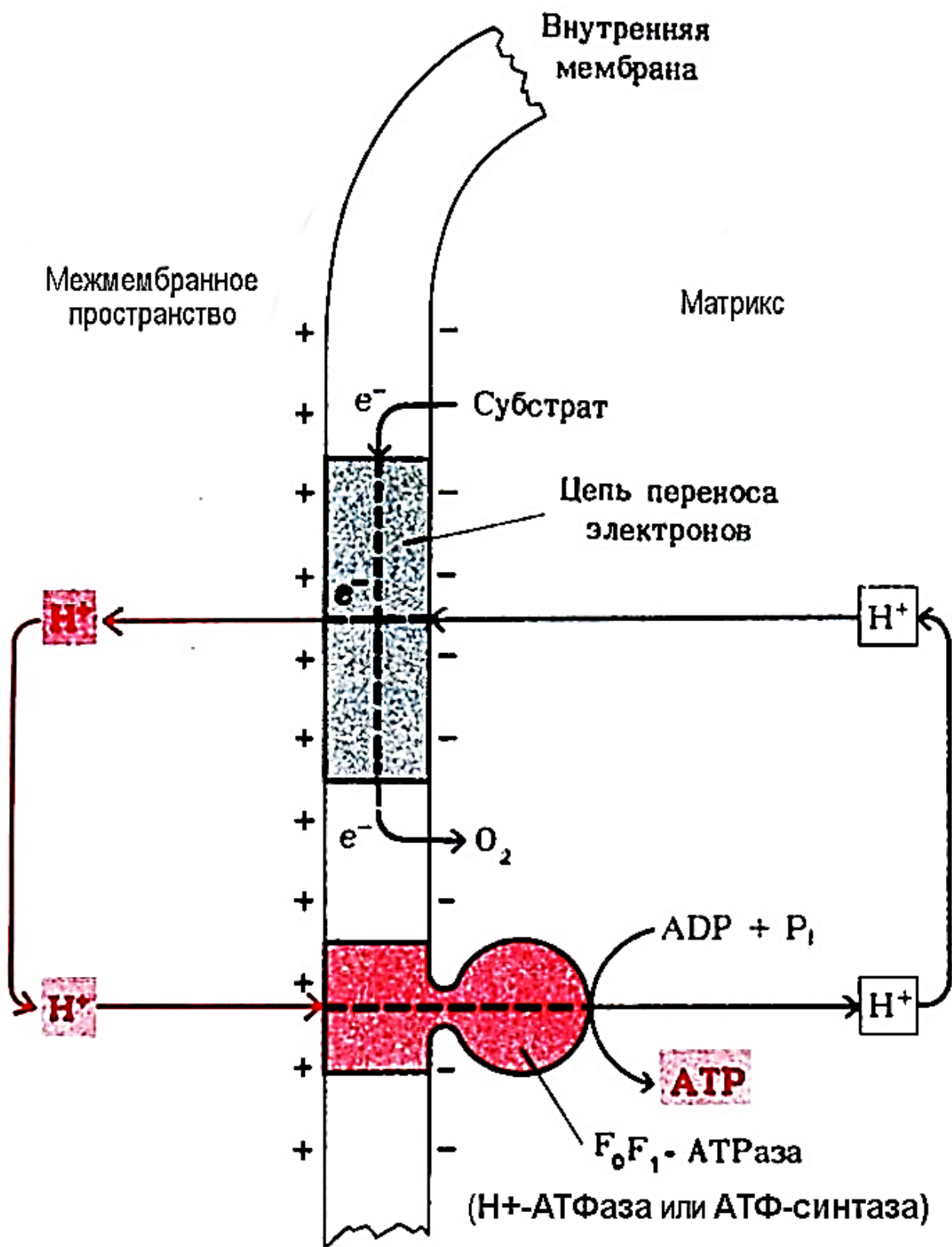


Рис. 9. Схема, иллюстрирующая сопряжение переноса электронов с синтезом АТФ в свете хемиосмотической гипотезы (Ленинджер А., 1985)

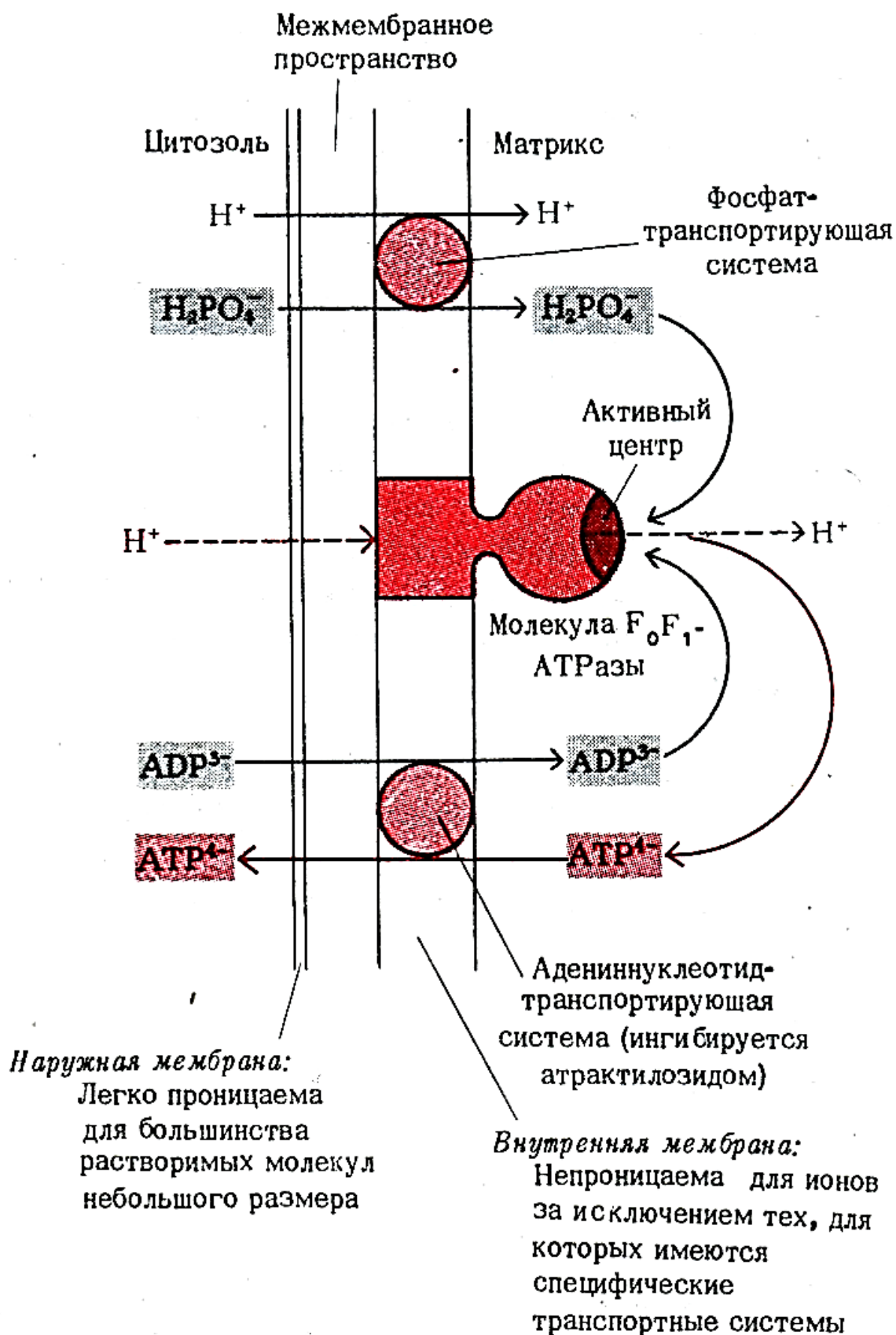


Рис. 10. Транспортные системы ВМ митохондрий, переносящие АДФ и Фн из цитоплазмы в матрикс, а синтезированный АТФ – из матрикса в цитоплазму (Ленинджер А., 1985)

КОМПЛЕКСЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Во ВМ митохондрий все переносчики H^+ и электронов организованы в виде пяти структурно обособленных, но тесно функционально взаимосвязанных **комплексов**. Комплексы, из которых состоит дыхательная цепь, следуют в строго определенной последовательности. Это, в частности, позволяет соблюдать важнейший принцип: каждый комплекс специфичен в отношении определенного донора и определенного акцептора электронов. Общий план строения дыхательной цепи митохондрий представлен на рисунке 11.

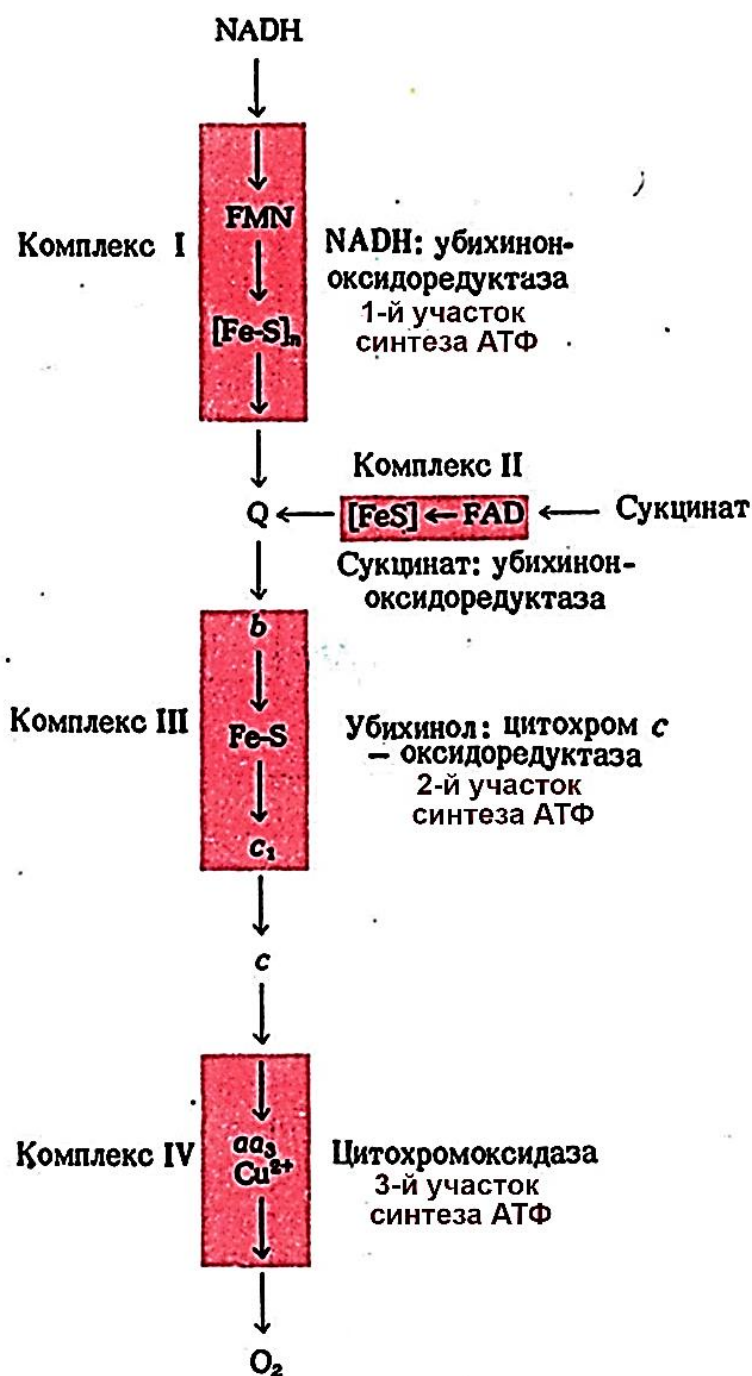


Рис 11. Комплексы дыхательной цепи митохондрий (Ленинджер А., 1985)
Q – коэнзим Q (CoQ), уби-
хинон.
Синтез АТФ происходит с
участием I, III и IV комплек-
сов дыхательной цепи.

КОМПЛЕКС I: НАДН-СОQ-ОКСИДОРЕДУКТАЗА (НАДН: УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА) ИЛИ НАДН-ДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС

В состав комплекса входят: простетическая группа – флавиномононуклеотид (ФМН) и пять Fe-S-кластеров (железосерных центров), содержащих негемовое железо. Молекула НАДН-Н⁺ доставляет в дыхательную цепь два атома водорода, отщепленных соответствующей дегидрогеназой от окисляемого субстрата. В общем виде, реакцию, которую катализирует комплекс I, можно представить, как:



Е-ФМН / Е-ФМНН₂ – фермент с окисленной и восстановленной простетической группой, соответственно.

Внутри комплекса I происходят следующие явления:

- от двух атомов водорода отделяются 2 электрона, которые передаются на молекулу убихинона (СоQ), в результате чего он восстанавливается до убихинола (СоQH₂). Функция Fe-S-кластеров состоит в направленном переносе электронов внутри комплекса I: от ФМН к СоQ. СоQH₂ диффундирует внутри липидного бислоя мембраны к III комплексу (рис. 12).

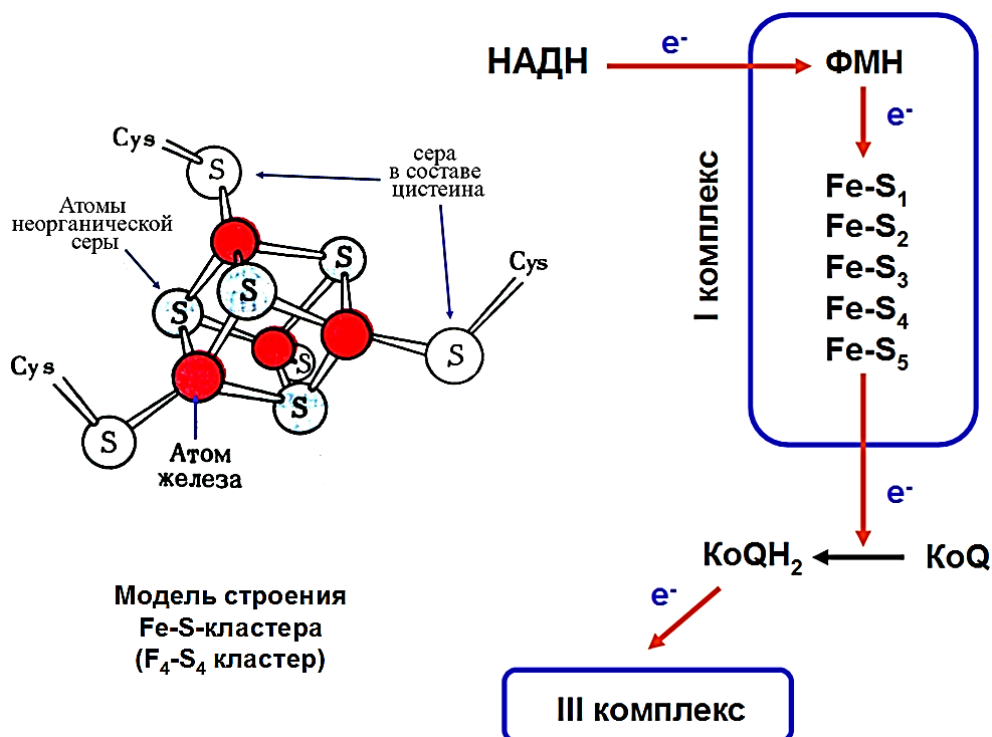


Рис. 12. Структура Fe-S-кластера и схема транспорта электронов (e-) через комплекс I с помощью Fe-S – кластеров к убихинону (KoQ или СоQ)

• 2H^+ от $\text{НАДН}-\text{H}^+$ и 2H^+ из матрикса переносятся через мембрану в межмембранное пространство. По этой причине I комплекс обеспечивает образование до 40% $\Delta\mu\text{H}^+$ (рис. 13).

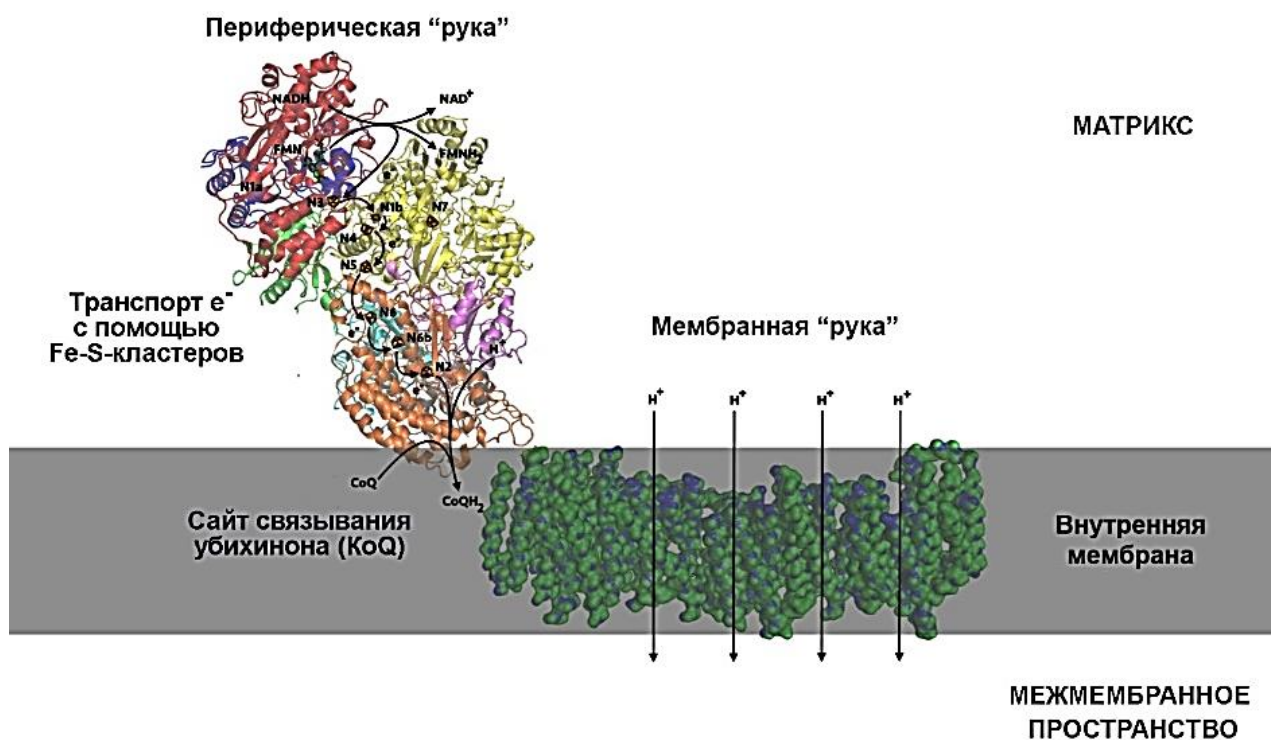


Рис. 13. Схема структурно-функциональной организации комплекса I (Нельсон Д., Кокс М., 2011)

Установлено, что комплекс имеет L-образный силуэт, в связи с чем его сравнивают со «старым башмаком». В составе мембранной «руки» имеются четыре уникальных по своему строению канала для транспорта H^+ . Полагают, что энергия редокс-переходов $\text{CoQ} \rightarrow \text{CoQH}_2$ трансформируется в конформационные изменения этих H^+ -каналов, которые приобретают способность транспортировать 4H^+ в межмембранное пространство: 2H^+ из матрикса и 2H^+ от CoQH_2 . Иными словами, на каждую окисленную молекулу $\text{НАДН}-\text{H}^+$ **комплекс I** переносит через мембрану 4H^+ .

Работу комплекса I ингибируют следующие соединения:

- ротенон — изофлавоноид растительного происхождения, сильный пестицид;
- пиерицидин А — антибиотик;
- амитал натрия — производное барбитуровой кислоты.

Ингибиторы взаимодействуют с сайтом связывания убихинона. В результате прекращается процесс передачи электронов от комплекса I на CoQ , и дыхательная цепь блокируется.

Применение сайт-специфических ингибиторов цепи переноса электронов позволило получить в ходе экспериментальных исследований ряд важных фактов, которые легли в основу современных знаний о механизмах митохондриального дыхания. В исследованиях *in vitro* ингибиторы предоставляют возможность анализировать функциональное состояние дыхательной цепи митохондрий и выявлять точки воздействия повреждающих факторов на биоэнергетические процессы.

КОЭНЗИМ Q (УБИХИНОН)

Это липофильное производное хинона, содержащее длинную боковую изопреноидную цепь (рис. 14). Убихинон (от *ubiquitous* – *повсеместный*) – широко распространен в биосистемах. У человека и животных число изопреновых единиц равно 10 (Q10). Изопреноидная цепь обеспечивает высокую неполярность молекуле Q10, что позволяет ей быстро диффундировать в толще ВМ митохондрий.

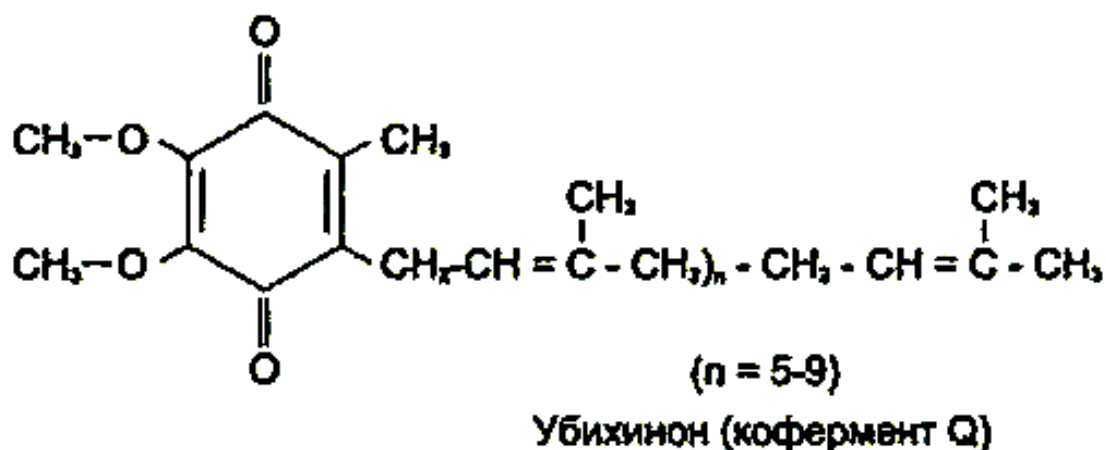


Рис. 14. Строение молекулы убихинона (CoQ)

Функция убихинона состоит в присоединении 2H^+ и 2 электронов, поступающих от I и II комплексов дыхательной цепи. Это высокомобильный переносчик электронов на цитохромный сегмент дыхательной цепи. CoQ10 – единственный переносчик электронов, который не имеет ковалентной связи с белком. Взаимодействие H^+ и электронов с CoQ10 происходит в два этапа, через образование семихинона, являющегося свободным радикалом (рис. 15).

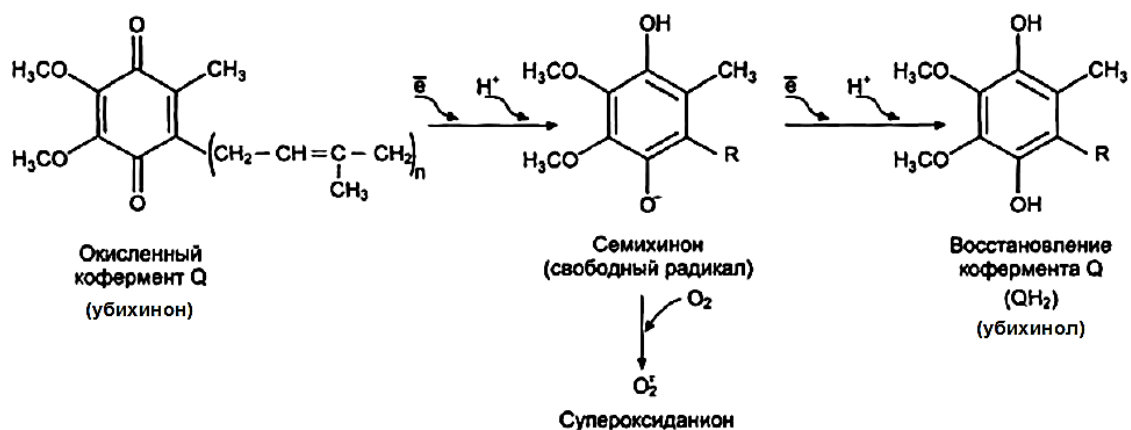


Рис. 15. Два этапа реакции восстановления убихинона

На этапе образования семихинона возможна случайная «утечка» одного электрона и спонтанная реакция одноэлектронного восстановления O_2 с образованием активной формы кислорода (АФК) - супероксидного анион-радикала кислорода: $\text{семихинон}^* + \text{O}_2 \rightarrow {}^*\text{O}_2^-$.

КОМПЛЕКС II: СУКЦИНАТ- CoQ -ОКСИДОРЕДУКТАЗА (СУКЦИНАТ: УБИХИНОНОКСИ-ДОРЕДУКТАЗА) ИЛИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС (СДГ-КОМПЛЕКС)

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) – одна из четырёх дегидрогеназ цикла Кребса и его единственный фермент, который прочно связан с ВМ митохондрий, а не находится в растворимой форме в матриксе. Активный центр СДГ обращён в матрикс. Строение комплекса II представлено на рисунке 16.

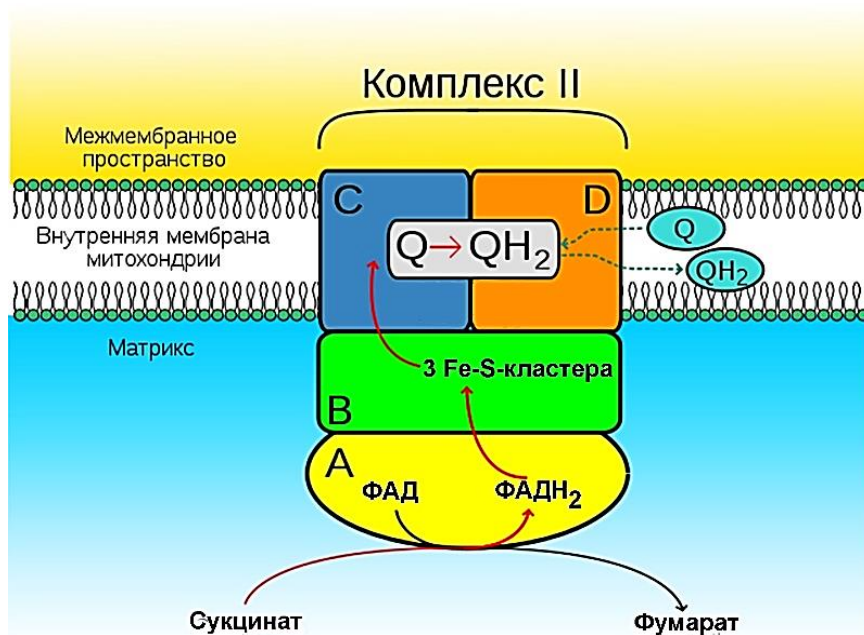
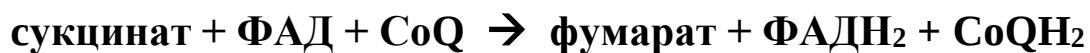


Рис. 16. Строение комплекса II

Комплекс II состоит из четырёх субъединиц. Субъединица А содержит активный центр СДГ и простетическую группу ФАД. Субъединица В содержит три Fe-S-кластера, переносящие электроны на CoQ. Субъединицы С и D – трансмембранные белки, прочно удерживающие СДГ во ВМ митохондрий. Между этими субъединицами расположена гемовая группа b-типа, которая не участвует в транспорте электронов. Полагают, что гем b снижает вероятность «утечки» электронов на их пути от сукцината к O₂ и этим предотвращает спонтанное одноэлектронное восстановление O₂, и образование цитотоксического супероксидного анион-радикала кислорода (*O₂⁻). В субъединице С находится центр связывания с убихиноном. Комплекс II катализирует реакцию, согласно общему уравнению:



Продукт реакции – фумарат легко диссоциирует из активного центра. От окисляемого сукцината отщепляются 2 атома водорода, которые сначала присоединяются к простетической группе: ФАД → ФАДН₂. Затем 2 электрона один за другим проходят через три Fe-S-кластера и поступают на CoQ → CoQH₂. 2H⁺ возвращаются в матрикс. По этой причине комплекс II не участвует в образовании ΔμH⁺ на ВМ митохондрий.

Помимо СДГ, в митохондриях функционирует несколько других дегидрогеназ, которые окисляют соответствующие субстраты. Отщепляемые от них электроны поступают на CoQ в обход комплекса II. Среди таких дегидрогеназ следует отметить следующие:

Во-первых, в начале пути β-окисления, ацилы-CoA окисляются с участием *ацил-CoA-дегидрогеназы*, которая содержит простетическую группу ФАД. Восстановленная форма простетической группы передаёт электроны следующему переносчику электронов по дыхательной цепи электронпереносящему флавопротеину – electron-transferring flavoprotein (ETF). Далее, ETF с помощью *ETF-убихинон-оксидоредуктазы* доставляет электроны на CoQ.

Во-вторых, окисление глицерол-3-фосфата, источниками которого являются гликолитический гидроксиацетонфосфат, или глицерол, освобождаемый при гидролизе триацилглицерола. Глицерол-3-фосфат окисляется с помощью глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, локализованной на внешней поверхности ВМ митохондрий. Данная дегидроге-

назад передаёт электроны также на CoQ. Упомянутые процессы иллюстрируют факт, согласно которому CoQ является «коллектором» для электронов, поступающих в дыхательную цепь от НАДН-Н⁺ и ФАДН₂.

Работу комплекса II (СДГ) ингибирует малонат (малоновая кислота). Малонат, благодаря существенному сходству его химической структуры с таковой у сукцината, связывается с активным центром СДГ, вызывая конкурентное ингибирование фермента.

КОМПЛЕКС III: CoQH₂-ЦИТОХРОМ C-ОКСИДОРЕДУКТАЗА ИЛИ ЦИТОХРОМ-bc₁-КОМПЛЕКС

Комплекс III переносит электроны от убихинола к цитохрому c (цит. c). Этот цитохром слабо связан с наружной поверхностью ВМ митохондрий, обращен в межмембранное пространство и не входит в состав комплекса III. На уровне комплекса происходит окисление восстановленного убихинола (CoQH₂) и восстановление цит. c. Комплекс III расположен поперёк ВМ митохондрий. Структура комплекса была расшифрована с применением метода рентген-структурного анализа в период с 1985 по 1998 гг. Схема строения комплекса III представлена на рисунке 17. Комплекс III – функциональный ансамбль, состоящий из двух одинаковых мономеров. В состав каждого мономера входят:

- цит. b (включает геммы b_H и b_L);
- железосерный белок Риске (содержит два Fe₂S₂-центра);
- цит. c₁.

Схема (рис. 17) показывает, что цит. c₁ и белок Риске выступают над поверхностью ВМ митохондрий и обращены в межмембранное пространство. Это позволяет им взаимодействовать с цит. c, который слабо ассоциирован с наружной поверхностью ВМ и легко переходит в межмембранное пространство. В составе цит. b одного из мономеров расположен центр связывания с убихиноном Q_P или Q_O (на схеме – слева). В составе цит. b второго из мономеров расположен центр связывания с убихиноном Q_N или Q_i (на схеме – справа). Две мономерные субъединицы цит. b образуют некую полость в середине мембраны. Внутри этой полости убихинон может перемещаться со стороны матрикса в межмембранное пространство, что позволяет переносить электроны и Н⁺ через мембрану. Установлено, что в ходе транспорта электронов через комплекс III происходят окислительно-восстановительные реакции, влияющие на степень окисленности Fe₂S₂-центров белка Риске. Эти явления заставляют комплекс III изменять свою конформацию в ходе функционирования.

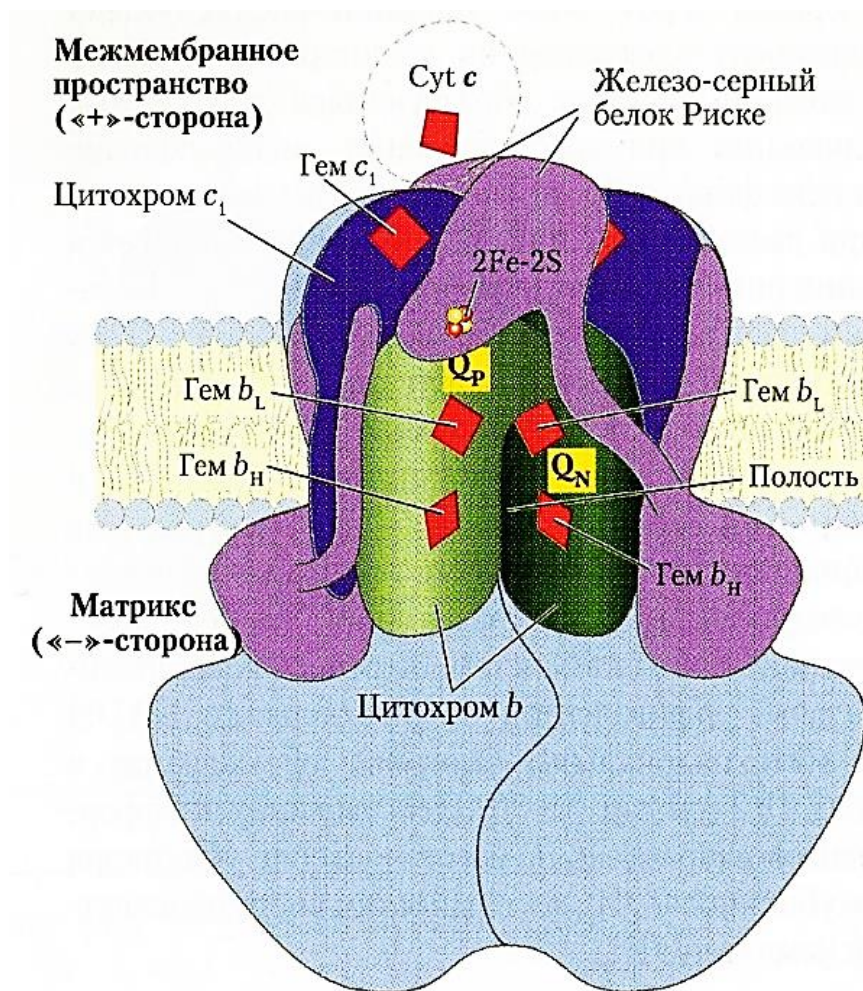
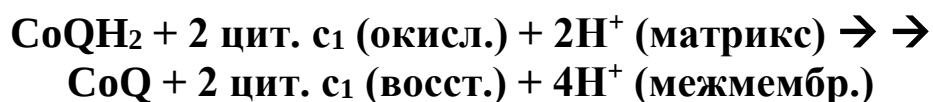


Рис. 17. Схема строения комплекса III (Нельсон Д., Кокс М., 2011)

Q_N , где N – от «negative» – отрицательный электрический заряд на внутренней поверхности ВМ митохондрий, обращенной в сторону матрикса. Q_P , где P – от «positive» – положительный электрический заряд на наружной поверхности ВМ митохондрий, обращенной в межмембранное пространство.

Предполагаемый механизм переноса H^+ и электронов через комплекс III получил название «Q-цикла», который постулировал П. Митчелл. Общее уравнение реакций в Q-цикле можно представить в следующем виде:



Предполагаемые реакции в Q-цикле представлены на рисунке 18.

Явления, происходящие в ходе Q-цикла:

1. Центр связывания убихинола Q_O , локализован у внешней поверхности мембраны (выше, на рис. 17 обозначен, как Q_P). Центр связывает $2CoQH_2$, которые окисляются Fe-S кластером белка Риске. В

итоге 4H^+ выходят в межмембранное пространство. Отнятые Fe-S кластером 4 электрона (e^-) следуют двумя путями. Первый путь: $2e^-$ передаются на цит. b_L . Второй путь: $2e^-$ с участием Fe-S-кластера передаются на цит. c_1 .

2. От цит. b_L $2e^-$ передаются на цит. b_H и далее в центр у внутренней поверхностной мембраны – Q_i (Q_N на рис. 18). Тут связывается одна молекула окисленного CoQ, который затем восстанавливается $2e^-$ (от цит. b_H) и 2H^+ из матрикса.

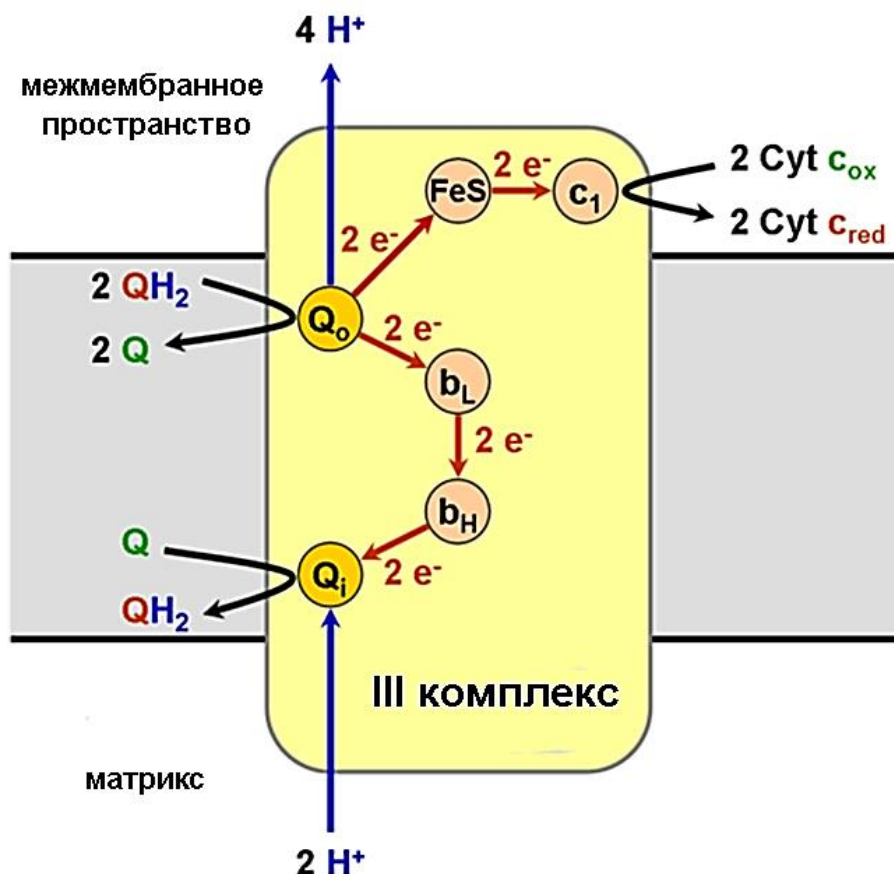


Рис. 18. Модель работы Q-цикла.

Q_o , где O – «out» – снаружи, то есть наружная поверхность ВМ митохондрий, обращенная в межмембранное пространство. Q_i , где i – «in» – внутри, то есть внутренняя поверхность ВМ митохондрий, обращенная в сторону матрикса митохондрий.

Итог: 2CoQH_2 окисляются, один CoQ восстанавливается и восстанавливаются 2 цит. c_1 .

Комплекс III участвует в образовании $\Delta\mu\text{H}^+$ на ВМ митохондрий.

Ингибитором комплекса III является антибиотик антимицин А. Он связывается с центром Q_i (рис. 18) и блокирует восстановление CoQ

под действием цит. b_H . В результате этого Q-цикл останавливается, что приводит к прекращению работы комплекса III.

ЦИТОХРОМ С

Цитохром с (цит. с) является сравнительно небольшим гидрофильным белком (12 кД), содержащим геминую группу, которая связана с белковой частью через цистеин. Цит. с слабо ассоциирован с наружной поверхностью ВМ митохондрий и легко переходит в межмембранное пространство митохондрий.

Функции цит. с:

- Компонент дыхательной цепи, переносящий один электрон от комплекса III на комплекс IV. Это происходит благодаря способности восстановленного цит. с диффундировать вдоль наружной поверхности ВМ к комплексу IV дыхательной цепи.
- При апоптозе цит. с выходит из межмембранного пространства в цитоплазму, преодолевая барьер НМ через образующиеся в ней гигантские поры. В цитоплазме цит. с взаимодействует с фактором активации апоптоза (Araf-1), что приводит к образованию апоптосомы. Подробно этот процесс представлен выше, в разделе «Апоптоз» (С. 22).

КОМПЛЕКС IV: ЦИТОХРОМ С-КИСЛОРОД-ОКСИДОРЕДУКТАЗА, ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗА (ЦИТОХРОМОКСИДАЗА), ИЛИ ЦИТОХРОМ $a+a_3$

Комплекс IV (цитохромоксидаза) – терминальная оксидаза дыхательной цепи митохондрий, которая переносит электроны от цит. с на молекулярный кислород.

Цитохромоксидаза – крупный интегральный белок ВМ митохондрий с молекулярной массой 204 кД. Она состоит из 13 субъединиц. Непосредственное участие в клеточном дыхании выявлено только для четырех её субъединиц, которые обозначают римскими цифрами: I, II, III и IV (рис. 19).

С участием цитохромоксидазы происходит окисление четырёх молекул цит. с, электроны от которых идут на восстановление O_2 . В ходе процесса идет захват $4H^+$ из матрикса, необходимых для образования двух молекул H_2O , и одновременно другие $4H^+$ выделяются в межмембранное пространство. Таким образом, комплекс IV (цитохромоксидаза), наряду с комплексами I и III, участвует в образовании $\Delta\mu H^+$ на ВМ митохондрий. Суммарное уравнение реакций, происходящих на цитохромоксидазе, можно представить как:



На рисунке 19 представлена модель участия субъединиц I–IV цитохромоксидазы в транспорте электронов и протонов:

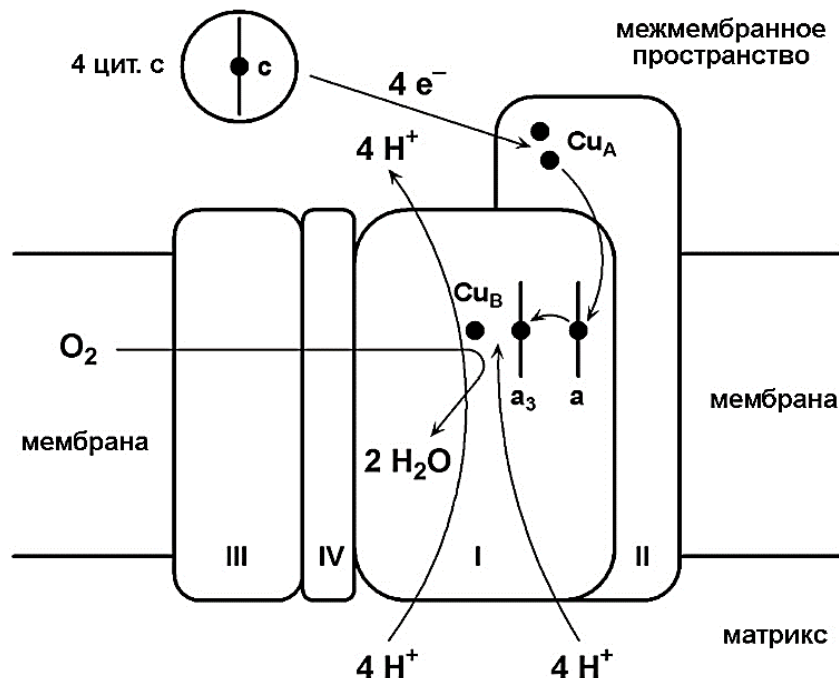


Рис. 19. Модель движения электронов и протонов через цитохромоксидазу (комплекс IV)

Субъединица I содержит двухядерный центр Cu_B , в состав которого входят: два гема (a и a_3) и атом Cu . В геме a атом Fe образует 6 координационных связей с 4 атомами азота пиррольного кольца. В геме a_3 – пять координационных связей, шестая – предназначена для связывания молекулы O_2 .

Субъединица II содержит двухядерный центр Cu_A , куда входят: два атома Cu , которые соединены с белком комплекса через сульфгидрильные группы остатков цистеина.

Полагают, что субъединица III необходима для переноса H^+ через субъединицу II. Роль субъединицы IV остается невыясненной.

Предполагают следующую последовательность явлений, происходящих в цитохромоксидазе. Электроны от восстановленного цит. с поступают на субъединицу II в центр Cu_A . Далее электроны переходят в субъединицу I и движутся по направлению: гем $a \rightarrow$ центр $a_3-Cu_B \rightarrow O_2$. Одновременно из матрикса поступают $4H^+$, которые расходуются в процессе образования $2H_2O$ из O_2 . Таким образом, в организме взрослого человека за сутки образуется 300–400 мл эндогенной метаболической воды.

Вышеперечисленные окислительно-восстановительные процессы сопровождаются высвобождением энергии, которая расходуется для переноса других 4H^+ из матрикса через мембрану в межмембранное пространство. Полное восстановление O_2 протекает в виде нескольких последовательных одноэлектронных переносов. При этом исключается «утечка» не полностью восстановленных цитотоксичных промежуточных интермедиатов, относящихся к активным формам кислорода (АФК): H_2O_2 и гидроксильных радикалов.

Ингибиторами комплекса IV (цитохромоксидазы) являются: цианиды (CN), азиды (N_3) и монооксид углерода (CO), или угарный газ. Они связываются с двудерным центром $\text{a}_3\text{-CuB}$, выигрывая конкуренцию с O_2 . В итоге блокируется процесс восстановления молекулярного кислорода, и клетка гибнет от «химической асфиксии» несмотря на то, что в окружающей среде содержится достаточное количество кислорода.

КОМПЛЕКС V: АТФ-СИНТАЗА, F_0F_1 -АТФаза ИЛИ H^+ АТФаза (ПРОТОННАЯ АТФаза)

Комплекс V встроен во ВМ митохондрий и имеет грибовидную форму, «шляпка» выступает из плоскости мембраны и обращена в матрикс. *АТФ-синтаза* имеет сложную структуру, включающую множество субъединиц, относящихся к разным типам. Комплекс V состоит из двух главных компонентов или факторов: F_0 и F_1 (F – «factor»). На этом основании комплекс V получил ещё одно обозначение: *F_0F_1 -АТФаза*. Впервые фактор F_1 был выделен из ВМ митохондрий и очищен в лаборатории Э. Рэкера. Схема структурной организации комплекса V представлена на рисунке 20.

F_0 – интегральный белок, пронизывающий ВМ митохондрий. Индекс «0» происходит от названия антибиотика олигомицина, который специфически связывается с этим фактором и ингибирует работу АТФ-синтазы путем блокировки H^+ -канала. Ингибирование синтеза АТФ олигомицином значительно снижает поток электронов по дыхательной цепи, однако этот поток не останавливается полностью. Субъединицы F_0 обозначаются латинскими буквами. В состав F_0 входят 1a, 2b и 10c – субъединицы. Субъединицы с формируют цилиндр, погруженный в мембрану, образуя канал для H^+ (рис. 21).

F_1 – периферический мембранный белок, являющийся каталитической частью комплекса. Субъединицы F_1 обозначаются греческими буквами. В состав F_1 входят 3α и 3β субъединицы. Они образуют

«шляпку» и уложены попарно, подобно долькам апельсина. Каждая из трёх β субъединиц участвует в образовании трёх каталитических центров *АТФ-синтазы*. γ и ϵ – субъединицы формируют «ножку» или «стержень». Один из доменов γ -субъединицы пронизывает «шляпку», другой домен связан с цилиндром, состоящим из 10с-субъединиц фактора F_0 . Когда по H^+ -каналу F_0 проходят протоны, возвращаясь из межмембранного пространства в матрикс вдоль градиента своей концентрации, происходит вращение цилиндра (10с) и стержня (γ и ϵ – субъединицы) (рис. 21).

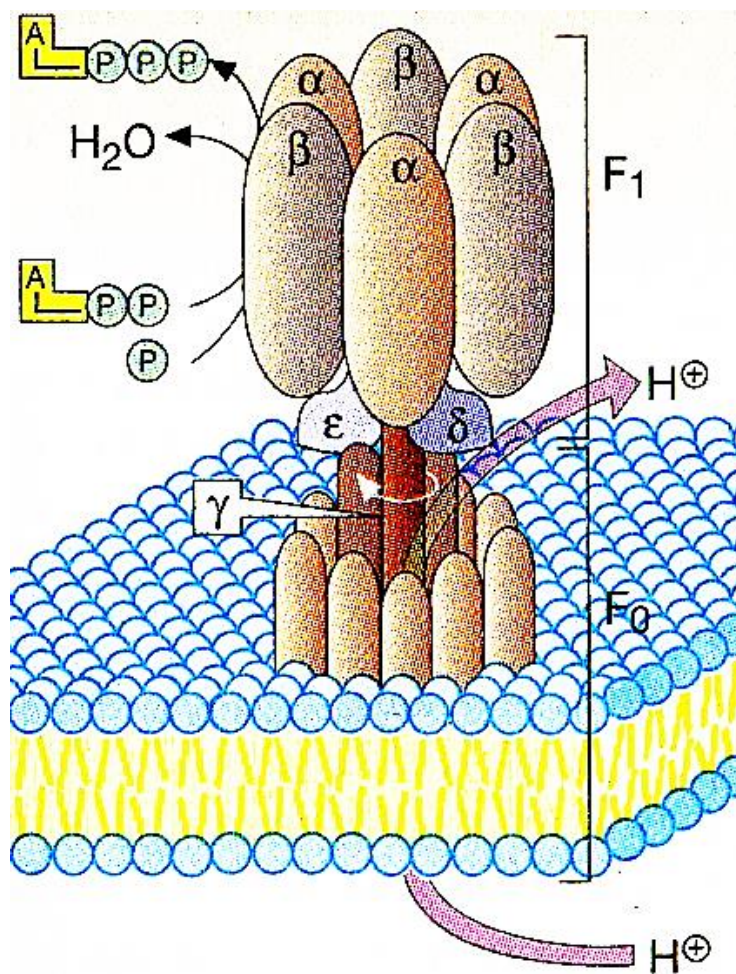


Рис. 20. Структура комплекса V (*АТФ-синтазы* или F_0F_1 -*АТФазы*)
(Кольман Я., Рём К.-Г., 2011)

Комплекс V имеет грибообразную форму. «Шляпка» (комплекс F_1) обращена в матрикс митохондрий (верхняя часть рисунка). Межмембранное пространство представлено на нижней части рисунка. «Ножка» (комплекс F_0) пронизывает ВМ митохондрий в направлении, перпендикулярном плоскости мембраны.

Субъединичный состав F_0 и F_1 более детально показан на рисунке 21.

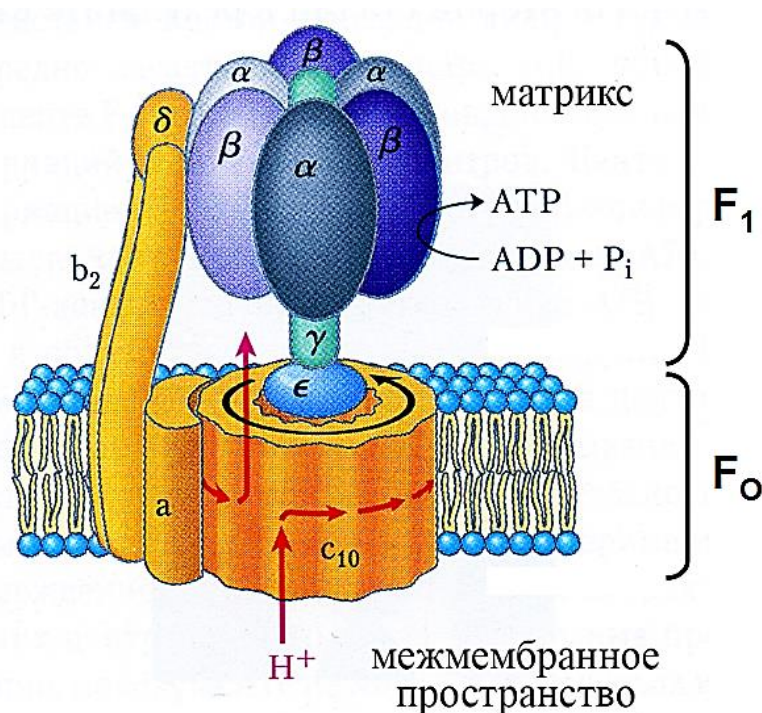
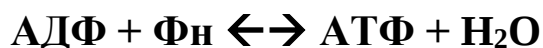


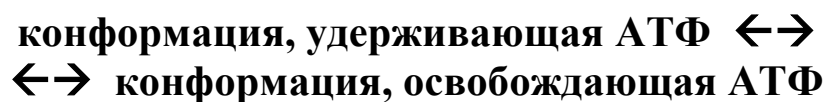
Рис. 21. Субъединицы в составе F_0 и F_1 (Нельсон Д., Кокс М., 2011)

МОДЕЛЬ МЕХАНИЗМА КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРА F_1 . ВРАЩАТЕЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ ПО П. БОЙЕРУ

В общем виде реакцию синтез АТФ в каталитическом центре АТФ-синтазы (β -субъединицы F_1) можно описать уравнением:



Реакция обратима, поскольку величина изменения свободной энергии ($-\Delta G$) близка к нулю. Сродство каталитического центра к АТФ почти в 2 раза выше, чем к АДФ: связь $E\text{-АТФ}$ более прочна, чем $E\text{-АДФ}$ (где E – фермент). Разница энергий связывания нуклеотидов с каталитическим центром фермента составляет ~ 40 кДж/моль. Этот фактор смещает равновесие реакции в сторону образования АТФ. Реакция синтеза АТФ происходит без затрат энергии, так как величина $\Delta \mu \text{H}^+$ не изменяется. Энергия требуется для освобождения АТФ из каталитического центра. Для освобождения, синтезированного АТФ, фермент совершает циклические изменения конформации каталитических центров в составе β -субъединиц:



Изменение конформации одной из 3-х β -субъединиц вызывается обратимым связыванием с ней γ -субъединицы. Это происходит в результате вращения комплекса: «цилиндр» из 10с субъединиц + 1 γ субъединица («ось») внутри относительно неподвижного фактора F_1 . Вращение «оси» происходит благодаря прохождению каждого иона водорода по H^+ -каналу (F_0). Часть энергии $\Delta\mu H^+$ расходуется на изменение конформации субъединиц «оси», что становится причиной её вращения. Схематично процесс вращательного катализа представлен на рисунке 22.

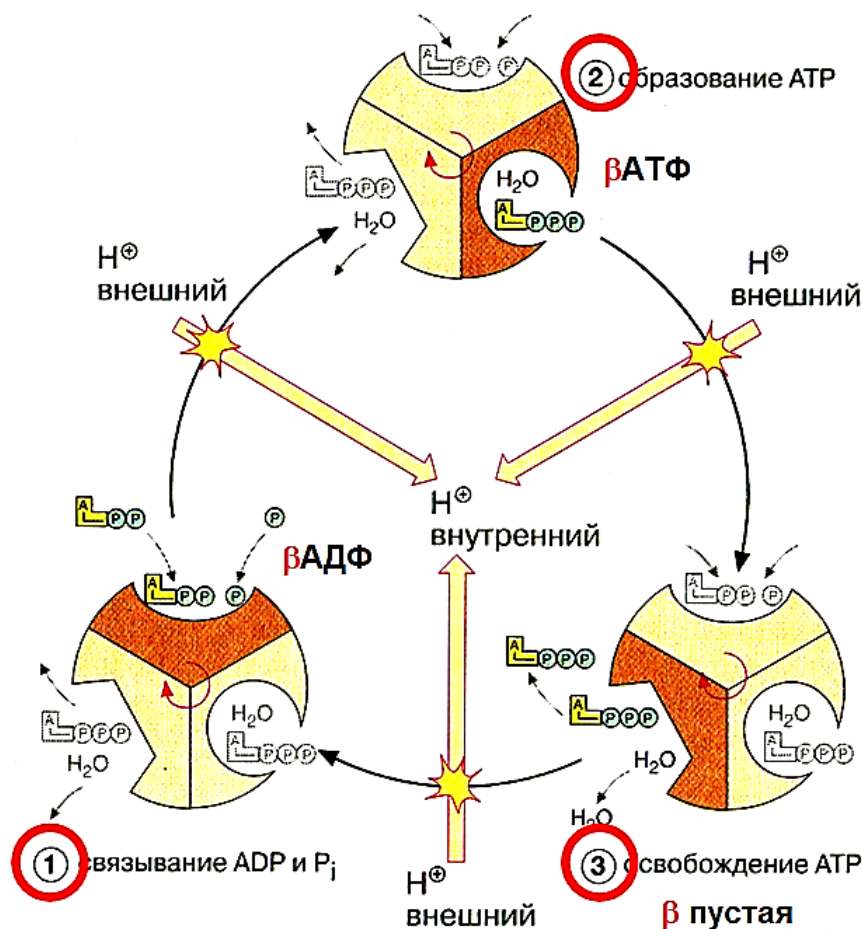


Рис. 22. Каталитический цикл АТФ-синтазы по П. Бойеру
(Кольман Я., Рём К.-Г., 2011)

Одна из трёх β -субъединиц, в каталитическом центре которой происходит очередное явление цикла, выделена коричневым цветом. H^+ внешний – ионы водорода в межмембранном пространстве. H^+ внутренний – ионы водорода в матриксе. β пустая – каталитический центр, из которого диссоциировала молекула синтезированного АТФ.

Цикл включает три фазы, каждая из которых проходит поочередно в 3-х каталитических центрах трёх β -субъединиц F_1 . При переносе

каждого H^+ через канал F_o – в трех каталитических центрах происходит своя фаза процесса:

I фаза – связывание АДФ (на схеме: β АДФ).

II фаза – образование фосфоангидридной связи (синтез АТФ, на схеме: β АТФ).

III фаза – АТФ диссоциирует из каталитического центра (на схеме: β -пустая).

Полагают, что часть энергии $\Delta\mu H^+$ расходуется на вращательное движение комплекса: «цилиндра» из 10с субъединиц + γ субъединица. Это сопровождается циклическими изменениями конформаций трёх β -субъединиц.

Общий план топографии комплексов дыхательной цепи митохондрий можно представить в виде схемы на рисунке 23, который иллюстрирует следующие положения:

- Комплекс I. Имеет матриксный и мембранный домены («Периферическая рука» и «мембранная рука», соответственно). В матриксном домене содержатся кофермент и пять Fe-S центров, а также участок, где комплекс взаимодействует с CoQ. Во внутримембранном домене находятся четыре канала для транспорта H^+ в межмембранное пространство. Комплекс участвует в формировании $\Delta\mu H^+$.

- Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа). Каталитический центр обращен в матрикс. Комплекс не вовлечен в формирование $\Delta\mu H^+$.

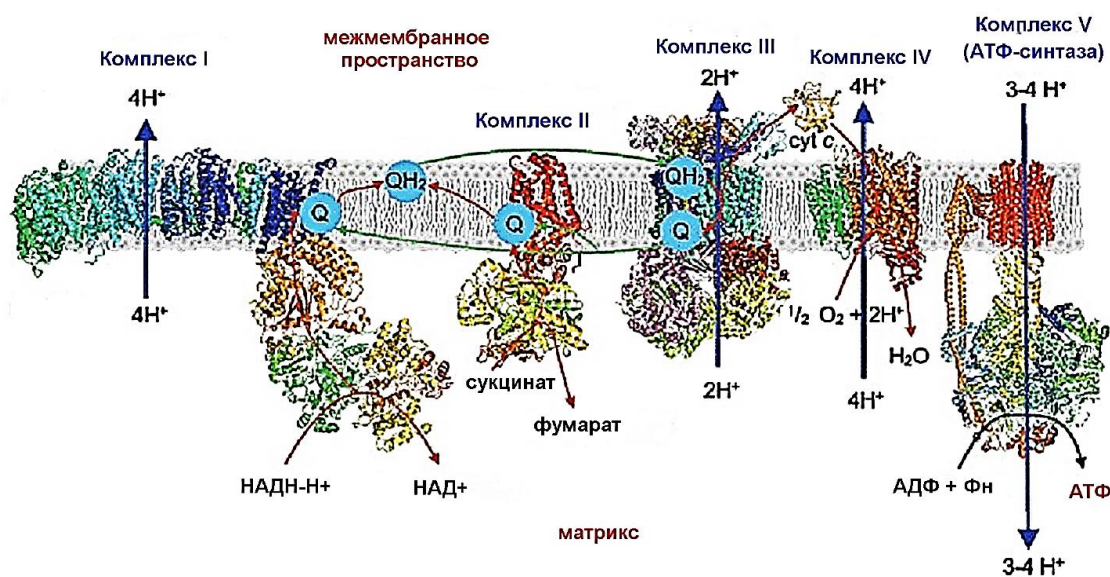


Рис. 23. Топография комплексов дыхательной цепи во внутренней мембране митохондрий

Q / QH_2 – убинон (Q) / убинол (QH_2), его окисленная и восстановленная формы; Cyt c – цитохром c

- CoQ (убихинон). Свободно диффундирует в толще мембраны митохондрий, выполняя роль коллектора электронов, поступающих от комплексов I и II, и передаёт их на цитохромный сегмент дыхательной цепи.

- Комплекс III. Акцептирует электроны от CoQH_2 и передаёт их на цитохром c. Комплекс участвует в формировании $\Delta\mu\text{H}^+$.

- Цитохром c. Передаёт электроны от комплекса III на комплекс IV.

- Комплекс IV (*цитохромоксидаза*). Катализирует четырёхэлектронное восстановление O_2 до H_2O и участвует в формировании $\Delta\mu\text{H}^+$.

- Комплекс V (*АТФ-синтаза*). Фактор F_0 встроен в мембрану и содержит H^+ -канал. Фактор F_1 обращен в сторону матрикса и содержит каталитические центры, участвующие в синтезе АТФ. $\Delta\mu\text{H}^+$, создаваемый работой комплексов I, III и IV, представляет собой движущую силу для синтеза АТФ. Протоны из межмембранного пространства проходят по H^+ -каналу в составе F_0 . Выделяющаяся при этом энергия расходуется для фосфорилирование АДФ до АТФ.

РАЗОБЩИТЕЛИ И ИОНОФОРЫ, КАК ИНГИБИТОРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Существует группа липофильных веществ естественного и синтетического происхождения, которые подавляют фосфорилирование АДФ до АТФ, но не влияют на транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий. Эти вещества способны связывать H^+ в межмембранном пространстве и переносят их через ВМ в матрикс митохондрий, минуя H^+ -канал в F_0 . С участием этих веществ резко повышается проницаемость ВМ митохондрий для H^+ . В результате происходит разобщение транспорта электронов и синтеза АТФ потому, что появившаяся H^+ -проводимость во ВМ вызывает «сброс» $\Delta\mu\text{H}^+$ и заключенная в нём энергия рассеивается в виде тепла, то есть уже не может быть использована для синтеза АТФ. Поэтому данные вещества получили название **разобщающих агентов** или **разобщителей**. Иными словами, под действием разобщителей исчезает протондвижущая сила.

К числу естественных разобщителей следует отнести белок термогенин или UCP-1. Он действует в митохондриях бурого жира, что позволяет ему обогревать соседние ткани выделяющимся теплом (подробнее см. выше раздел «Теплопродукция», С. 25).

Среди синтетических разобщителей наиболее широко известны 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) и карбонил цианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP) (рис. 24).

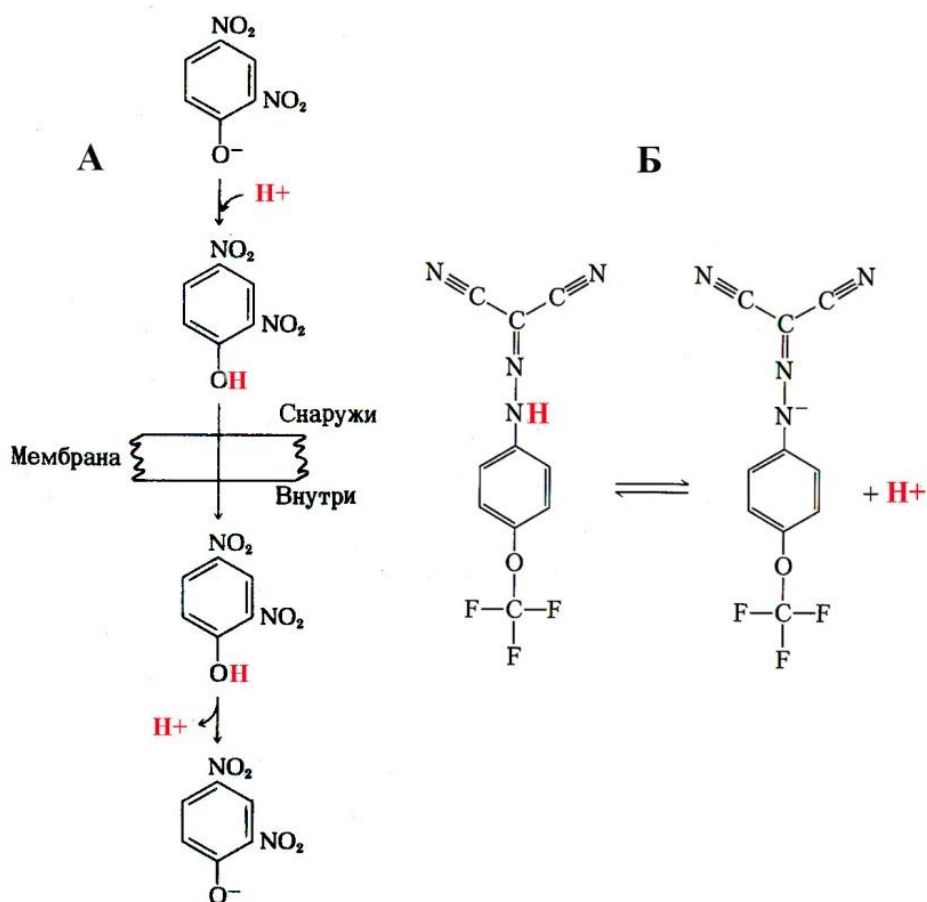


Рис. 24. Химическое строение 2,4-динитрофенола (А) и цианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон (Б). (Протон, обратимо присоединяющийся к молекуле, обозначен красным цветом)

Механизм действия разобщителей можно проиллюстрировать на примере 2,4-ДНФ. При нейтральном значении рН молекула 2,4-ДНФ существует преимущественно в форме аниона, и его липофильность относительно невелика. В протонированной форме липофильность разобщителя значительно возрастает, что позволяет 2,4-ДНФ проходить через ВМ митохондрий в матрикс, где молекула отдаёт доставленный H^+ . Этим разобщители препятствуют формированию $\Delta\mu H^+$ на ВМ митохондрий. Способность разобщителей обратимо связывать и отдавать H^+ , придаёт им свойство слабых кислот. Поскольку разобщители обеспечивают трансмембранный перенос протонов, их называют также протонофорами.

Разобщение транспорта электронов и синтеза АТФ могут также вызывать некоторые липофильные соединения-ионофоры, переносящие через ВМ митохондрий ионы K^+ и / или Na^+ . Типичные ионофоры-разобщители – это антибиотики валиномицин (рис. 25) и грамицидин.

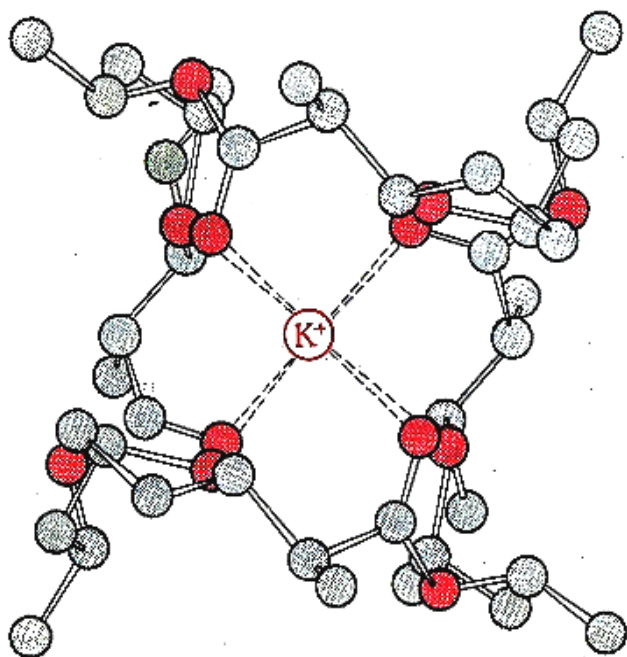


Рис. 25. Строение молекулы
валиномицина

Молекула валиномицина состоит из остатков L- и D-валина, лактата и гидроксиизовалерата, объединенных в кольцеобразную структуру. Валиномицин образует специфический комплекс с K^+ , который располагается в гидрофобной «сердцевине» молекулы. Благодаря высокой липофильности, комплекс валиномицин- K^+ легко преодолевает ВМ митохондрий. Аналогичным образом грамицидин обеспечивает трансмембранный перенос не только K^+ , но и Na^+ . В результате переноса одновалентных катионов исчезает электрическая составляющая ($\Delta\psi$) трансмембранного электрохимического потенциала ($\Delta\mu H^+$). На долю $\Delta\psi$ приходится 75% энергии, заключенной в $\Delta\mu H^+$ (подробнее рассмотрено ниже, раздел «Протондвижущая сила», С. 52). В результате этого синтез АТФ прекращается.

ОБЗОР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В РАМКАХ ХЕМИОСМОТИЧЕСКОЙ ГИПОТЕЗЫ / ТЕОРИИ П. МИТЧЕЛЛА

Материал, изложенный в начале лекции (раздел «Комплексы дыхательной цепи митохондрий», С. 33), говорит о том, что в состав элементарного «дыхательного ансамбля» – функциональной единицы дыхательной цепи митохондрий - входят: комплексы I и II (принимающие восстановительные эквиваленты от НАДН- H^+ и ФАДН₂, соответственно), CoQH – «собирающего» электроны от комплексов I и II и передающего электроны на цитохромный сегмент, состоящий из комплексов III, цитохрома c и комплекса IV.

ПРОТОНДВИЖУЩАЯ СИЛА

Движущей силой транспорта электронов вдоль дыхательной цепи на комплекс IV (цитохромоксидазу) является «перепад» стандартных окислительно-восстановительных потенциалов (стандартных редокс-потенциалов, E'_0) между комплексами дыхательной цепи, которые представляют собой редокс-пары. Комплексы расположены в строгой последовательности, которая определяется возрастанием у них сродства к электрону. В соответствии с этим принципом, редокс-пары с относительно большой отрицательной величиной E'_0 будут отдавать электроны другим парам, у которых E'_0 выражается более положительной величиной. Максимальная положительная величина E'_0 у редокс-пары H_2O/O_2 , составляющая +820 мВ, говорит о том, что у неё максимально выражена способность к акцептированию электрона, то есть, максимально высокое сродство к электрону (рис. 26).

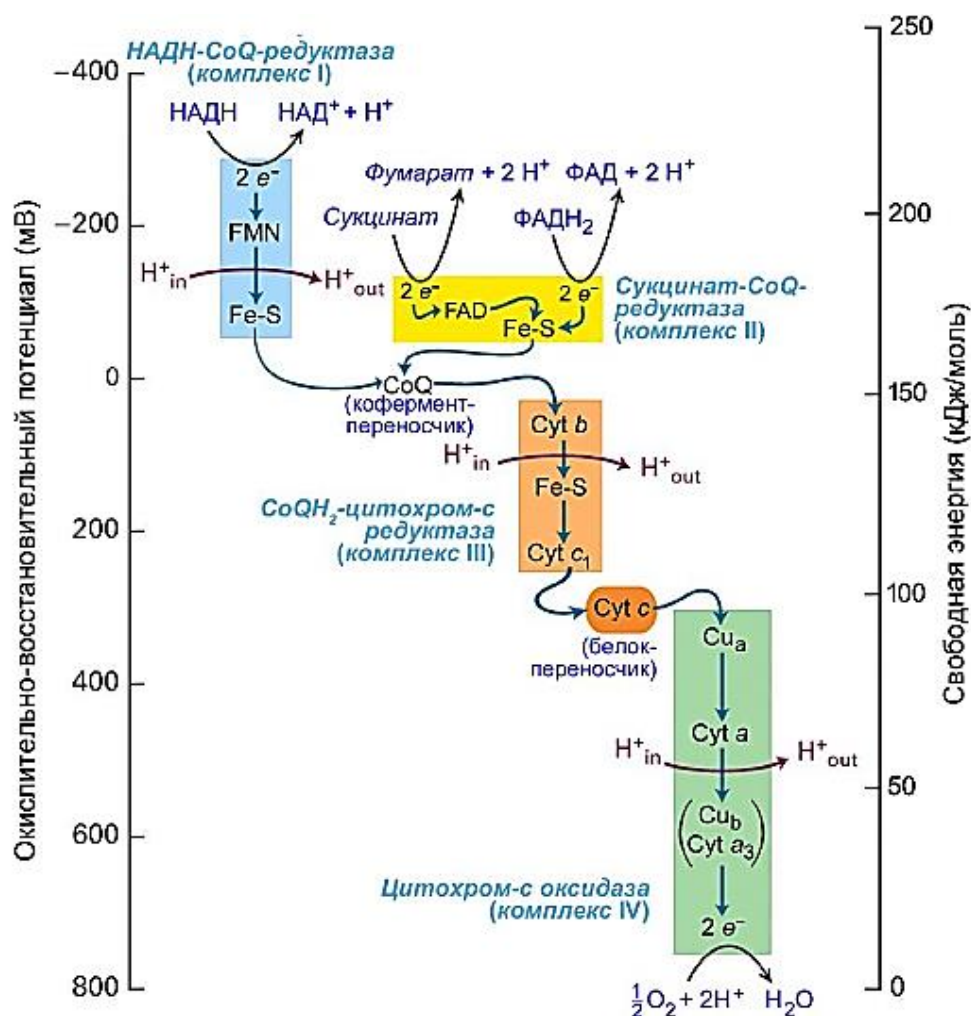


Рис. 26. Стандартные редокс-потенциалы (E'_0) комплексов дыхательной цепи митохондрий

Пунктирные линии – направления потоков электронов; Fe/S – железосерные центры; Q – убихинон (CoQ); Cyt – цитохромы; C – цитохром c

Левая шкала – шкала стандартных редокс-потенциалов (E°). Её верхняя часть имеет отметки со знаком «-». Это электроотрицательный отрезок шкалы. По мере приближения её значений к отметке «ноль» – электроотрицательность уменьшается, что указывает на уменьшение электрон-донорных свойств у комплексов. Нижняя часть шкалы – электроположительный отрезок. Рост величины E° со знаком «+» указывает на увеличение сродства комплексов к электрону – электроакцепторные свойства комплексов нарастают, достигая максимальной величины в редокс-паре H_2O/O_2 .

Таким образом, транспорт электронов происходит в строго определенном направлении: от НАДН- H^+ и ФАДН₂ к *цитохромоксидазе*, что продиктовано последовательностью расположения комплексов дыхательной цепи: от переносчиков с максимальным восстановительным потенциалом, к переносчикам с минимальным восстановительным (максимальным окислительным) потенциалом. Благодаря этому транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий не требует затрат энергии.

Как было сказано выше, электроны способны переходить только от электроотрицательной редокс-пары переносчиков дыхательной цепи к электроположительной редокс-паре. Такой поток сопровождается уменьшением свободной энергии системы. Чем больше будет разность E° между двумя редокс-парами, тем больше будет изменение свободной энергии (ΔG°). Эта свободная энергия будет высвобождаться и может быть использована для синтеза АТФ.

Известно, что при переходе двух электронов от редокс-пары НАДН- $^+ / НАД^+$ ($E^{\circ} = -320$ мВ) к редокс-паре $H_2O / \frac{1}{2}O_2$ ($E^{\circ} = +820$ мВ), изменение стандартной свободной энергии (ΔG°) составит – 52,6 ккал. Этой энергии в стандартных условиях достаточно для синтеза 3-х молекул АТФ, так как для синтеза одной АТФ в стандартных условиях требуется 7,3 ккал ($3 \times 7,3 \text{ ккал} = 21,9 \text{ ккал.}$). На рисунке 27 показаны энергетические соотношения в дыхательной цепи митохондрий.

Таким образом, в дыхательной цепи митохондрий существует три участка, в пределах которых перенос электронов сопровождается существенным уменьшением свободной энергии. Высвобождаемая тут свободная энергия используется для синтеза трех молекул АТФ. Эти участки называются **пунктами сопряжения**, или участками синтеза АТФ. Они расположены в комплексах I, III и IV (рис. 27). По этим причинам, теоретически, в ходе окисления одной молекулы НАДН- H^+ -зависимых субстратов, отщепляемые от них электроны проходят по «полной» дыхательной цепи (комплексы I, III и IV), что обеспечивает

синтез трёх молекул АТФ. Окисление одной молекулы сукцината даёт две молекулы АТФ, поскольку его электроны проходят через комплексы III и IV, минуя комплекс I.

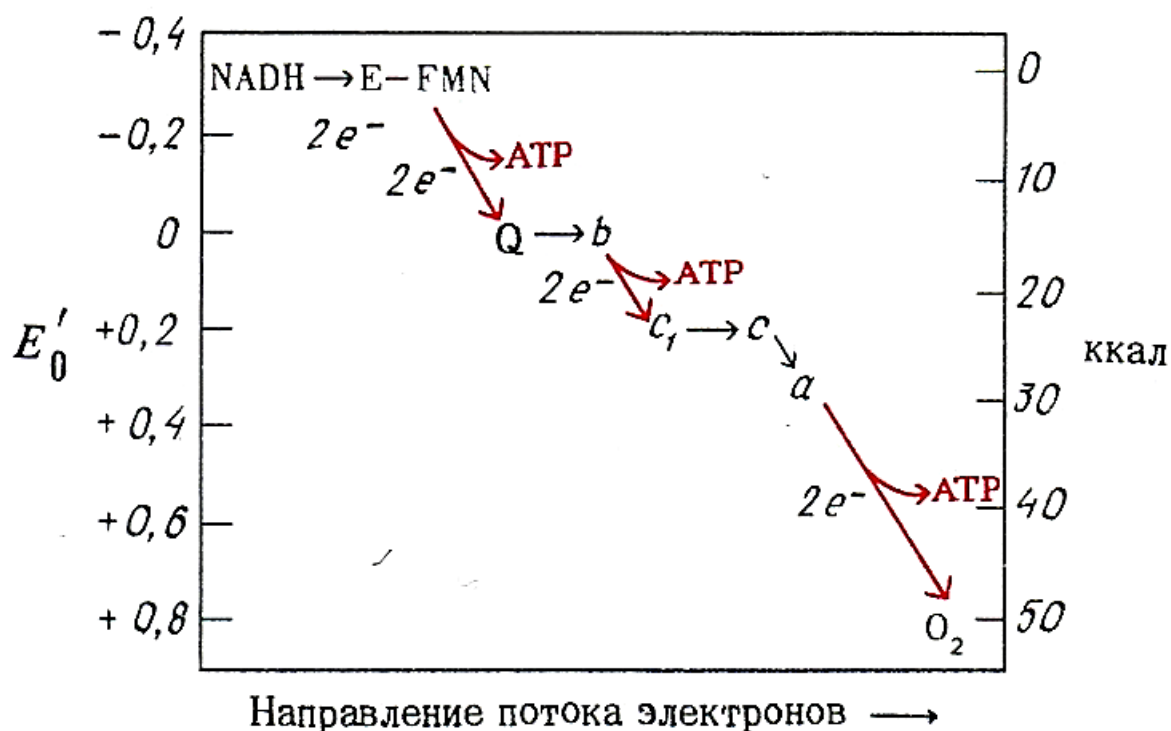


Рис. 27. Стандартные редокс-потенциалы (E'_0) переносчиков дыхательной цепи и относительные величины изменения свободной энергии (ΔG_0) на каждом из этапов процесса

E-FMN – НАДН- H^+ -дегидрогеназа; Q – убихинон (CoQ); b, c_1 , c и a – цитохромы; красными стрелками обозначены участки синтеза АТФ

Ранее было упомянуто, что в образовании $\Delta\mu H^+$ на ВМ митохондрий участвуют комплексы I, III и IV, при том, что основной вклад вносит функционирование комплекса I. Согласно хемиосмотической гипотезе / теории, энергия $\Delta\mu H^+$ используется для синтеза АТФ с помощью комплекса V (АТФ-синтазы). По этой причине $\Delta\mu H^+$ называют также протондвижущей силой синтеза АТФ.

Трансмембранный электрохимический потенциал H^+ ($\Delta\mu H^+$) имеет две составляющих:

$$\Delta\mu H^+ = \Delta\Psi + \Delta pH$$

$\Delta\Psi$ – электрический мембранный потенциал: «-» с внутренней стороны, «+» с наружной стороны ВМ митохондрий. Вклад $\Delta\Psi$ составляет 75% от энергии всего электрохимического потенциала.

ΔpH – градиент pH: межмембранное пространство имеет более кислую реакцию, чем матрикс. В митохондриях энергия, заключенная в $\Delta \mu H^+$, помимо синтеза АТФ с помощью комплекса V, используется в ряде других жизненно важных для клетки процессов (рис. 28).

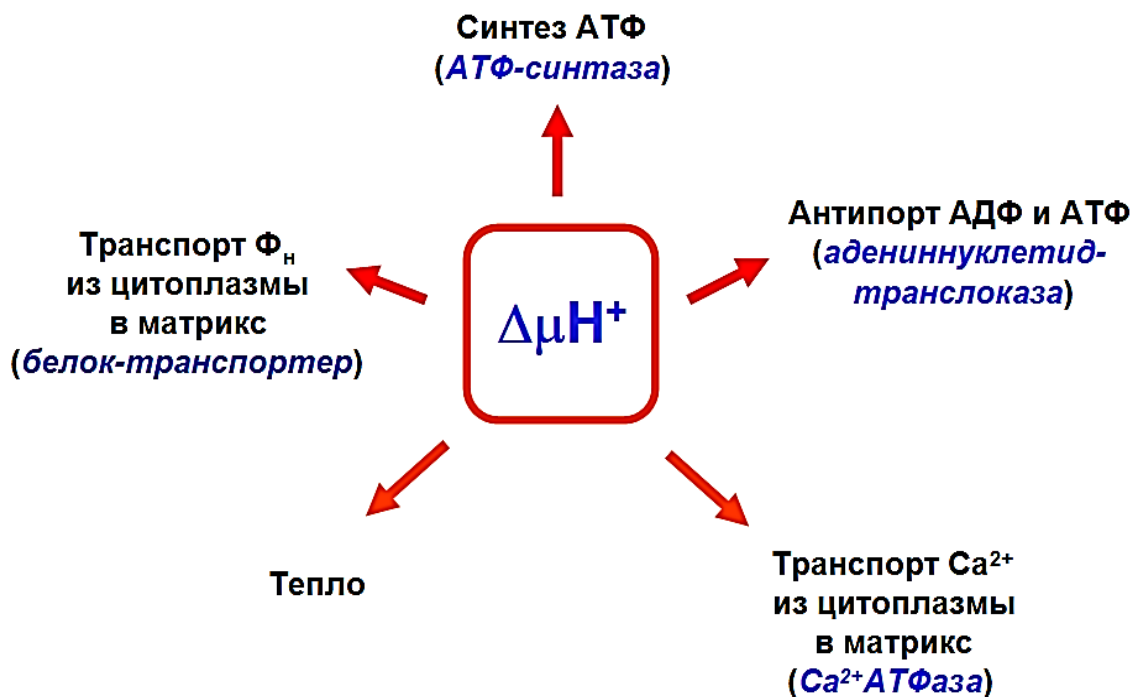


Рис. 28. Клеточные процессы, использующие энергию трансмембранного потенциала ионов водорода, $\Delta \mu H^+$

РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

В физиологических условиях транспорт электронов по дыхательной цепи тесно сопряжен с фосфорилированием АДФ в АТФ:



Реакции окислительного фосфорилирования, помимо АДФ – непосредственного субстрата фосфорилирования, требуют источников электронов (НАД-Н⁺ и/или ФАДН₂), Ф_н и О₂. В экспериментах с тканевыми гомогенатами, изолированными клетками и митохондриями установлено, что максимальная скорость дыхания (поглощения О₂) при окислении любого субстрата наблюдается только при наличии в среде инкубации сравнительно высокой концентрации АДФ. В ходе тканевого дыхания АДФ исчезает из среды, превращаясь в АТФ. После

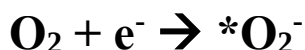
исчерпания всего АДФ, скорость дыхания быстро и существенно уменьшается и составляет около 15–20% от максимальной. В условиях *in vitro*, когда объем среды инкубации и количество суспендированных в ней митохондрий остаются неизменными, такая низкая скорость дыхания будет сохраняться до тех пор, пока в среду не будет добавлена новая порция АДФ. Эти данные указывают на то, что АДФ является фактором, лимитирующим скорость окислительного фосфорилирования. *In vivo* клетка постоянно меняет своё функциональное состояние, и в каждом из них меняется её потребность в энергии, потребность в АТФ. Так, в условиях повышения активности процессов, усиленно потребляющих энергию, концентрация АДФ существенно увеличивается вследствие ускорения распада АТФ до АДФ и Фн. Этим создаются условия для активации окислительного фосфорилирования, что позволяет адекватно компенсировать расход АТФ, пополняя его клеточное содержание. При смене функционального состояния клетки, при котором расход энергии минимален, низкая концентрация АДФ (АТФ не распадается) обеспечит более низкую скорость дыхания, соответствующую низкой потребности клетки в энергии в данных условиях. Регуляция скорости окислительного фосфорилирования концентрацией АДФ называется **дыхательным контролем** или **акцепторным контролем**. Это основной механизм регуляции активности энергетического обмена, через изменение концентрации АДФ.

В более широком плане реализацию принципа дыхательного контроля можно проиллюстрировать следующим образом. Когда клетка минимизирует расход АТФ, то отношение концентраций АТФ / АДФ достигает наибольшего значения. При этом концентрация АДФ минимальна, и *АТФ-синтаза* практически не расходует энергию $\Delta\mu\text{H}^+$ по причине дефицита АДФ – субстрата фосфорилирования. В свою очередь, происходит замедление транспорта электронов по дыхательной цепи, и окисление НАДН-Н⁺ минимизируется. В результате в матриксе митохондрий формируется высокое отношение концентраций НАДН-Н⁺/НАД⁺, что тормозит работу цикла Кребса: НАДН-Н⁺ – ингибитор *цитратсинтазы* – ключевого фермента цикла. В результате уменьшается окисление ацетил-СоА и продуцируемых им субстратов. Если клетка оказывается в состоянии, требующего интенсивного потребления АТФ, то концентрация АДФ существенно возрастает. В этих условиях перестройки активности биоэнергетических процессов начинают протекать в противоположном направлении и синтез АТФ активируется.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ, КАК ИСТОЧНИК АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

В физиологических условиях дыхательная цепь митохондрий является источником активных форм кислорода (АФК). АФК – группа молекул и свободных радикалов (соединений с одним неспаренным электроном), источником которых является молекулярный кислород. К ним относятся различные гидроперекиси и их радикалы, супероксидный анион-радикал кислорода (супероксид), гидроксильный радикал и синглетный кислород.

АФК чрезвычайно химически активны. При взаимодействии АФК с биомолекулами, в последних возбуждается свободнорадикальное окисление, которое повреждает их структуру и нарушает функции. Для биосистем особую угрозу представляет супероксидный анион-радикал кислорода, который является «родоначальником» всех остальных АФК, избыток которых вызывает множество цитотоксических эффектов. Супероксид образуется в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода в реакции:

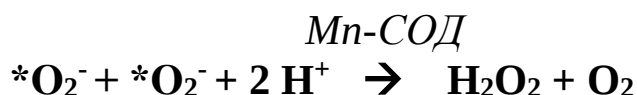


Эта реакция в митохондриях происходит в двух процессах:

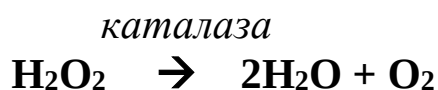
- а) с участием CoQ;
- б) в ходе внутрибелкового транспорта электронов через Fe/S центры в составе I и III комплексов дыхательной цепи.

В обоих случаях имеет место спонтанная «утечка» электронов от семихинона (промежуточная стадия восстановления убихинона до убихинола) и с Fe/S центров (см. выше, раздел «**Комплексы дыхательной цепи митохондрий**», С. 33).

В физиологических условиях и в интактной клетке никогда не образуется опасный для жизнедеятельности клетки избыток супероксида и других АФК. Это возможно благодаря существованию эффективной, многокомпонентной и многоуровневой системы антиоксидантной защиты, которая состоит из антиоксидантных ферментов и неферментативных элементов. Так, в митохондриях присутствует изоформа антиоксидантного фермента **супероксиддисмутазы (СОД)**, содержащая в активном центре атом Mn (**Mn-СОД**). Фермент катализирует реакцию дисмутации (взаимоуничтожения) между двумя *O_2^- :



Один из продуктов реакции – перекись водорода также относится к АФК, хотя её цитотоксичность ниже, чем у супероксида. H_2O_2 эффективно разрушается вторым антиоксидантным ферментом – **каталазой**:



Если часть супероксидов, которые легко преодолевают ВМ митохондрий, выйдут из матрикса в цитоплазму, то здесь они также будут эффективно обезврежены цитоплазматической изоформой СОД (**Cu, Zn-СОД**) и цитоплазматической каталазой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время общепризнана эндосимбиотическая теория происхождения митохондрий. Одним из аргументов в её пользу является существование в клетках эукариотов двух геномов: основного – ядерного генома и митохондриального генома.

Митохондрии – субклеточные органеллы, имеющие двойную мембрану: наружную и внутреннюю. Во внутренней мембране расположены белковые комплексы дыхательной цепи.

Митохондрии выполняют несколько важных функций, однако главная из них – биоэнергетическая, которая обеспечивает синтез основного количества АТФ в клетке.

Окислительное фосфорилирование – процесс образования АТФ, сопряженный с переносом электронов от окисляемого субстрата вдоль дыхательной цепи митохондрий на молекулярный кислород, где он восстанавливается до H_2O .

В настоящее время наиболее полное объяснение функционирования митохондрий даёт гипотеза (теория) хемиосмотического сопряжения дыхания и фосфорилирования Питера Митчелла. Дыхательная цепь митохондрий представлена пятью белковыми комплексами. Благодаря им, атомы водорода, отщепленные от «энергетических субстратов» несколькими типами дегидрогеназ, подвергаются разделению на протоны и электроны. Протоны переносятся в межмембранное пространство, формируя электрохимический градиент ($\Delta\mu\text{H}^+$) на внутренней мембране митохондрий. Электроны переносятся вдоль цитохромного сегмента дыхательной цепи на *цитохромоксидазу*, где происходит четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды. Энергия, аккумулированная в $\Delta\mu\text{H}^+$, является протондвижущей

силой, которая обеспечивает энергией синтез АТФ, а также ряд других процессов в митохондриях.

Дыхательная цепь митохондрий является источником потенциально цитотоксичных АФК. Они образуются вследствие спонтанной «утечки» электронов из двух процессов: восстановления убихинона и переноса электронов через железосерные центры в составе комплексов I и III. В физиологических условиях не образуется опасного для клетки избытка АФК. Этому эффективно противостоит многокомпонентная и многоуровневая система антиоксидантной защиты.

Лекция 2

СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

ВВЕДЕНИЕ

Геном – полная генетическая система клетки, которая записана в виде генетического кода молекулы ДНК. Геном хранит и обеспечивает наследственную передачу в ряду поколений всех структурно-функциональных признаков данного организма, а также определяет характер его онтогенетического развития.

В клетках эукариот основной геном – хранитель генетической информации - находится в ядре. У человека ядерная ДНК распределена между 23 парами хромосом: 22 пары аутосом и 1 пара половых хромосом (X- и Y-хромосомы). Таким образом, в ядре нормальных диплоидных соматических клеток человека содержится 46 хромосом. В дополнение к ядерному геному, у эукариотических организмов существует митохондриальный геном, представленный митохондриальной ДНК (мтДНК).

Ядерный геном человека содержит огромный объем генетической информации. Он состоит из $\sim 3,3 \times 10^9$ пар нуклеотидов. Ядерный геном кодирует 20 - 30 $\times 10^3$ генов, в том числе, около 1500 митохондриальных белков.

Митохондриальный геном имеет незначительный размер и содержит 16569 пар нуклеотидов. МтДНК кодирует лишь незначительную часть белков дыхательной цепи митохондрий, а также все митохондриальные рибосомальные и транспортные РНК (мт-рРНК и мт-тРНК). Известно, что для полноценного функционирования митохондрии необходимо около 3000 генов. Из них только 37 кодируются мтДНК: 13 генов полипептидных цепей, 22 гена мт-тРНК и 2 гена мт-рРНК.

мтДНК была открыта в первой половине 60-х годов прошлого столетия двумя, независимо работавшими, группами исследователей. В 1963 г. Маргит и Сильван Насс с помощью электронной микроскопии обнаружили чувствительные к ДНКазе нити внутри митохондрий. В 1964 г. Эллен Хаслбруннер, Ханс Таппи и Готфрид Шац нашли ДНК в составе высокоочищенной фракции митохондрий с помощью биохимических методов исследований.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

В настоящее время, общепризнанной является эндосимбиотическая гипотеза происхождения мтДНК. Теория начала развиваться в 1920-е годы, когда Б. М. Козо-Полянским было высказано предположение о том, что митохондрии являются симбионтами. Спустя годы, начиная с 1960-х годов XX в., теория получила новый стимул для своего дальнейшего развития благодаря работам Л. Маргулис.

Согласно эндосимбиотической теории, мтДНК происходит из кольцевых геномов бактерий, которые были поглощены древними одноклеточными организмами – предками современных эукариотических клеток. Полагают, что эти события произошли, когда концентрация O_2 в атмосфере древней Земли начала увеличиваться благодаря появлению первых одноклеточных фотосинтезирующих организмов. Эти организмы получили способность использовать энергию квантов солнечного света для синтеза АТФ, выделяя молекулярный кислород (O_2) в качестве «побочного продукта». O_2 – окислитель, потенциально токсичный для клеток. Умение его потреблять без фатальных для жизни клетки последствий стало безусловным эволюционным преимуществом. Таким образом, согласно эндосимбиотической гипотезе, ядерная ДНК и мтДНК имеют самостоятельное эволюционное происхождение.

Существует ряд фактов, поддерживающих эндосимбиотическую гипотезу происхождения мтДНК:

1. Хорошо совпадают размер и форма митохондрий и свободно живущих аэробных бактерий. И те, и другие содержат кольцевые молекулы ДНК, не связанные с гистонами. Это принципиально отличает кольцевую мтДНК от линейной (то есть, не кольцевой) ядерной ДНК.

2. Рибосомные и транспортные РНК митохондрий по нуклеотидным последовательностям отличаются от ядерных. Показано существенное сходство рРНК и тРНК митохондрий с аналогичными молекулами некоторых аэробных грамотрицательных бактерий.

3. Митохондриальные РНК-полимеразы кодируются в ядерном геноме, однако, ингибируются рифампицином, как бактериальные. РНК-полимеразы эукариотов нечувствительны к действию этого антибиотика.

СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

У животных и человека мтДНК представлена ковалентно замкнутой двуцепочечной молекулой, размером от 11 до 28 тысяч пар оснований. Молекула локализована в матриксе митохондрий, в непосредственной близости от внутренней мемbrane органеллы. МтДНК представлена двумя цепями:

- Цепь L (Light) – легкая цепь, богата цитозином, содержит 9 генов: 1 ген, кодирующий субъединицу ND6 (одна из субъединиц комплекса I дыхательной цепи) и 8 генов мт-тРНК.

- Цепь H (Heavy) – тяжелая цепь, богата гуанином, содержит 28 генов, которые кодируют 12 субъединиц белков комплексов дыхательной цепи, две мт-рРНК (12S и 16S) и 14 мт-тРНК.

Таким образом, в целом мтДНК кодирует две рРНК, 22 тРНК и 13 субъединиц белков, образующих комплексы дыхательной цепи, которые непосредственно участвуют в процессе окислительного фосфорилирования. Как отмечалось выше, ядерный геном кодирует около 1500 митохондриальных белков. Схема строения генома митохондрий представлена на рисунке 29.

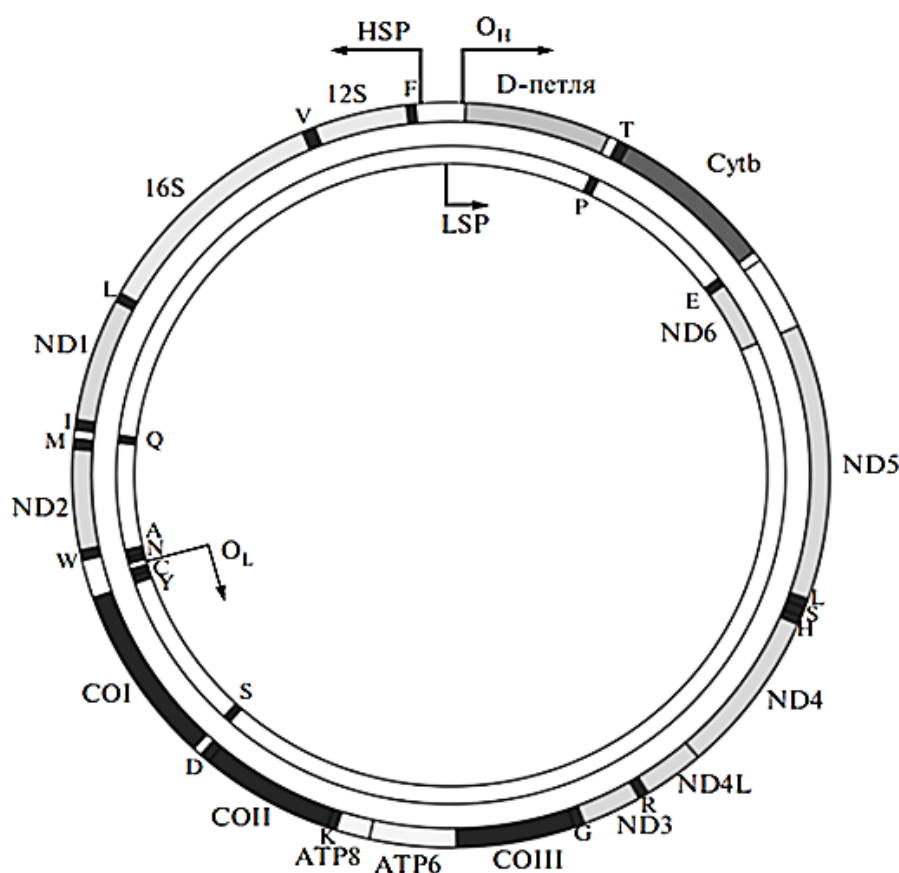


Рис. 29. Схема строения митохондриального генома (Сукерник Р.И., 2002)

Кодирующая часть мтДНК содержит 37 генов, которые кодируют:

а) 13 субъединиц белковых комплексов дыхательной цепи (ДЦ) митохондрий, участвующих в процессе окислительного фосфорилирования (рис. 30):

- I комплекс Д.Ц. – 7 субъединиц (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6)
- III комплекс Д.Ц. – 1 субъединица (Cyt b)
- IV комплекс Д.Ц. – 3 субъединицы (CO I, CO II, CO III)
- V комплекс Д.Ц. – 2 субъединицы (АТФ-аза 6 и 8)

б) 2 гена, кодирующих 2 рРНК (12s рРНК и 16s рРНК);

в) 22 гена, кодирующих 22 тРНК.

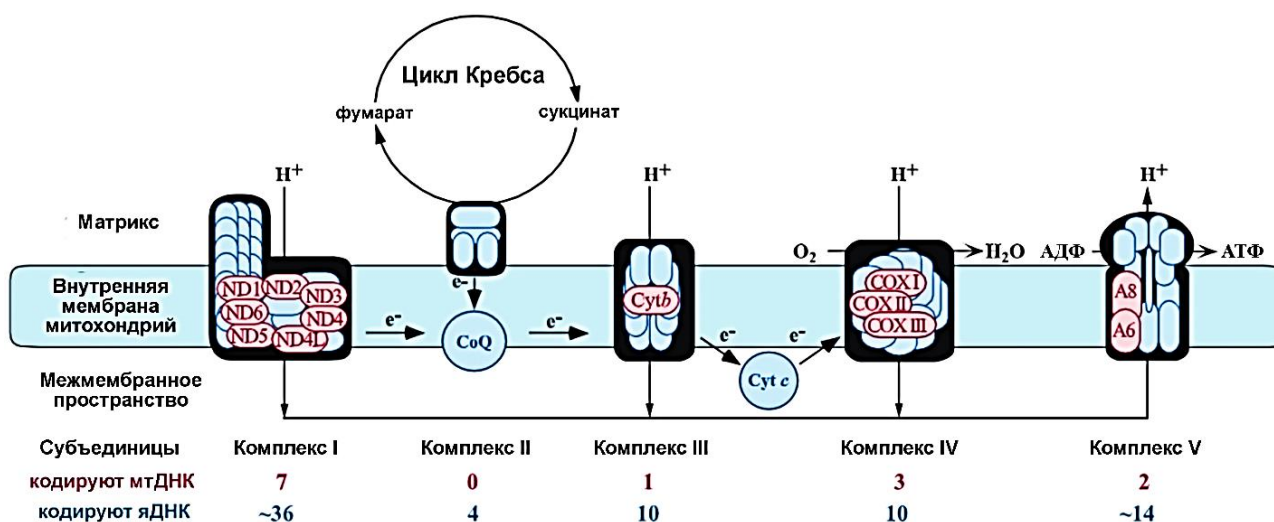


Рис. 30. Схема дыхательной цепи митохондрий, на которой субъединицы, кодируемые мтДНК, обозначены красным, а субъединицы, кодируемы ядерной ДНК (яДНК) – синим

Некодирующая часть мтДНК содержит:

1. Контрольный район (КР) – 1122 пары нуклеотидов, несет регуляторные последовательности:

HSP – точка инициации транскрипции тяжелой цепи;

LSP – точка инициации транскрипции легкой цепи

PH – промотор тяжелой цепи;

PL – промотор легкой цепи;

OH – точка инициации репликации тяжелой цепи;

OL – точка инициации репликации легкой цепи (лежит в кодирующей части).

2. Д-петля (от англ. Displacement loop) – 710 пар нуклеотидов, трехцепочечный участок ДНК, образующийся в результате репликации.

Все остальные белки, необходимые для нормальной работы митохондрий, кодируются исключительно ядерными генами и синтезируются на цитоплазматических рибосомах. Таким образом, функционирование митохондрии происходит в форме постоянного взаимодействия между её геномом и геномом ядра.

К числу особенностей мтДНК следует отнести следующие:

- В мтДНК обнаружены отклонения от универсального генетического кода. Так, в мтДНК человека кодон АУА кодирует метионин, вместо изолейцина в стандартном коде. Кодоны АГА и АГГ, в стандартном коде кодирующие аргинин, являются стоп-кодонами в мтДНК. Кодон УГА, в стандартном коде является стоп-кодоном, но в мтДНК кодирует триптофан. В отличие от ядерной ДНК, мтДНК многокопийна. Это означает, что мтДНК содержится, в среднем, в количестве 1000 копий молекулы на клетку. Для сравнения, ядерная ДНК имеет две копии на клетку – диплоидный набор хромосом, за исключением сперматозоидов и яйцеклеток (гаплоидный набор хромосом).

- Для мтДНК характерна примерно в 10–17 раз более высокая частота мутаций по сравнению с ядерной ДНК. Причина состоит в том, что даже в условиях нормы мтДНК подвергается воздействию активных форм кислорода (АФК), прежде всего, супероксидного анион-радикала кислорода (супероксида). Он образуется в реакции одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода (O_2). Спонтанная «утечка» электронов, способных так взаимодействовать с O_2 , имеет место в процессе восстановления убихинона в убихинол через обязательную стадию образования свободного радикала – семихинона, а также благодаря «утечке» электронов во время их переноса через железо-серные центры в составе комплексов I и III дыхательной цепи. Более высокой частоте мутаций мтДНК также способствуют отсутствие защитных гистонов и менее эффективно функционирующая система репарации по сравнению с ядерной ДНК. Индуцированные таким образом мутации, прежде всего мтДНК, являются одной из причин врожденных метаболических нарушений, которые получили название «митохондриальных болезней».

- мтДНК и, следовательно, любые мутации мтДНК, передаются от матери к потомству почти исключительно через яйцеклетку. Этот феномен получил название наследование мтДНК по материнской линии, или материнского наследования.

Ведущими причинами, обуславливающие феномен материнского наследования мтДНК, являются:

- Яйцеклетка содержит около 200000 молекул мтДНК, тогда как сперматозоид – в среднем 5 молекул мтДНК.

- Сперматозоиды содержат митохондрии только в области жгутика, что важно для обеспечения его движения энергией АТФ. После оплодотворения жгутик сперматозоида теряется.

- Внутри оплодотворенной яйцеклетки, митохондрии сперматозоидов (в том числе и те, которые содержат мтДНК с мутациями) быстро «маркируются» белком убиквитином и подвергаются деградации.

В ходе митотического деления клеток митохондрии (и их мтДНК) случайным образом (стохастически) распределяются между двумя дочерними клетками. В этот период количество митохондрий в материнской клетке существенно увеличивается. Их число может достигать 500 митохондрий на клетку, что лежит в основе накопления случайных мутаций мтДНК.

Упомянутые особенности обуславливают то, что потомки мужчин с мутациями мтДНК не наследуют признак (рис. 31).

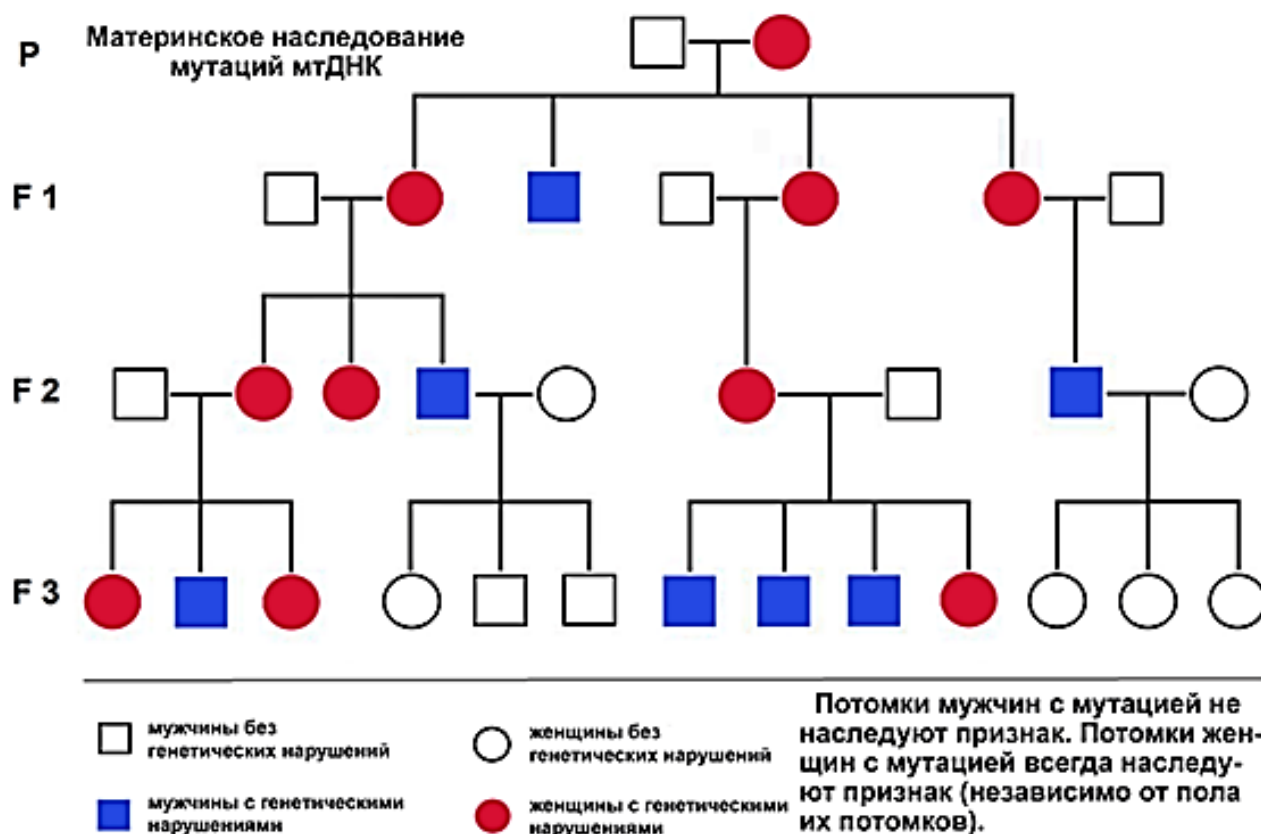


Рис. 31. Схема материнского типа наследования мутаций мтДНК

*P – от parents – родители. F1, F2 и F3 – от filial – дочерний, потомок.
 Потомство 1, 2 и 3 поколения*

МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Поскольку функционирование митохондрии происходит в форме постоянного «диалога» между её геномом и геномом ядра, митохондриальные болезни являются проявлением мутаций, как мтДНК, так и ДНК ядра.

К числу особенностей наследования мутаций мтДНК относятся:

- Материнский тип наследования.
- Гетероплазмия – присутствие в ооците как нормальных, так мутантных копий мтДНК. При этом соотношение нормальных мтДНК / мутантных мтДНК варьируется в широких пределах, что определяет многообразие фенотипов у потомства.
- Эффект «бутылочного горлышка». Подразумеваются существенная неравномерность распределения митохондрий с мутацией мтДНК при созревании ооцитов (рис. 32).

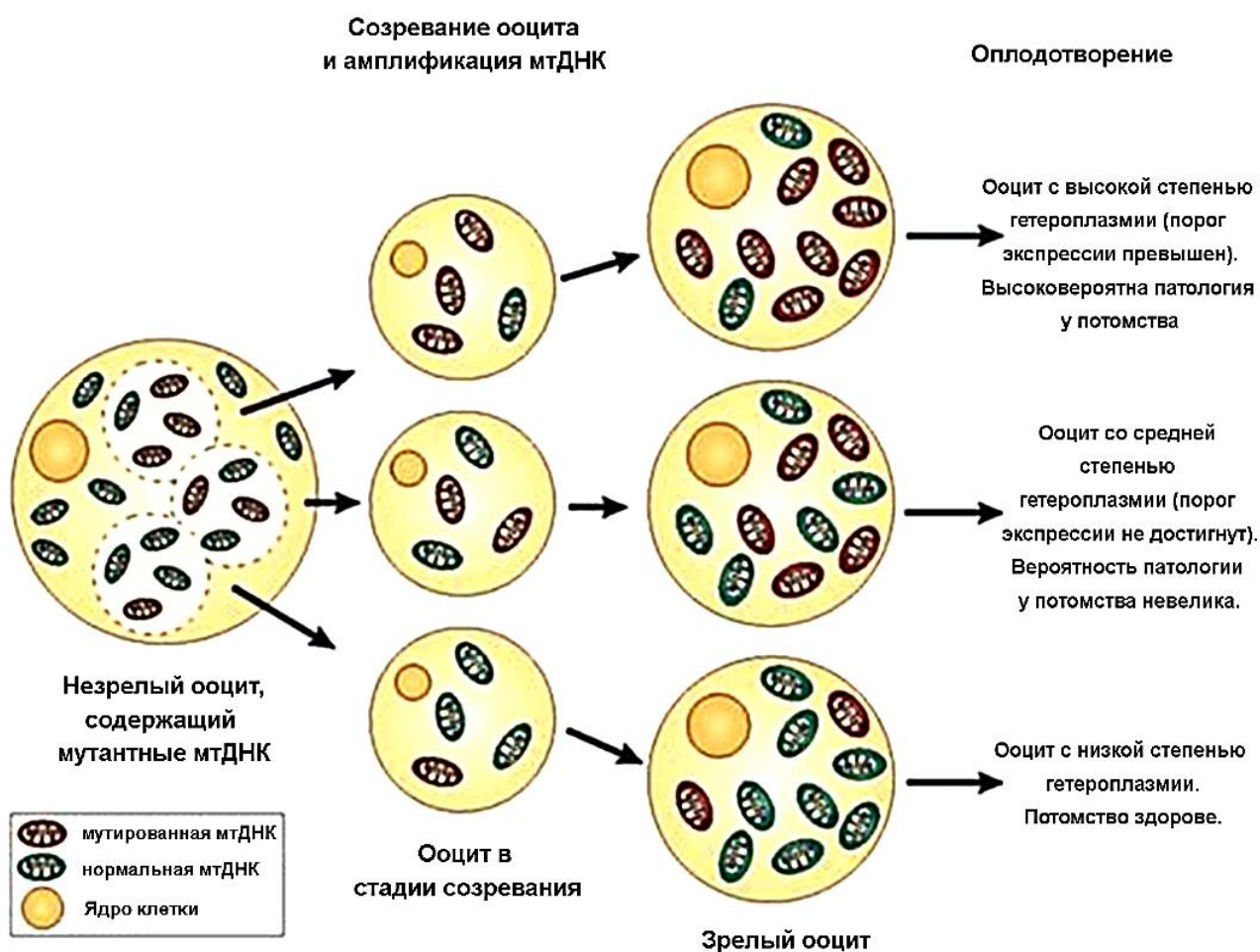


Рис. 32. Схема, иллюстрирующая проявление эффекта «бутылочного горлышка»

По мере созревания ооцитов и амплификации мтДНК, в разных ооцитах формируется различное соотношение между нормальными мтДНК и мтДНК с мутацией. Феномен приводит к появлению потомства ооцитов, у разных представителей которого в разной степени выражена гетероплазмия. Это определяет различную степень вероятности проявления патологии (митохондриальных болезней) у потомства после оплодотворения данной яйцеклетки. Собственно эффект «бутылочного горлышка» подразумевает появление ооцита, в котором доля мутированной мтДНК оказывается настолько мала, что после оплодотворения потомство здорово.

- Пороговый эффект или порог экспрессии (от threshold expression). Конкретное митохондриальное заболевание может клинически проявиться только тогда, когда количество митохондрий в клетке, содержащих мутированные мтДНК, достигнет определенного «критического» уровня или порога (рис. 33).

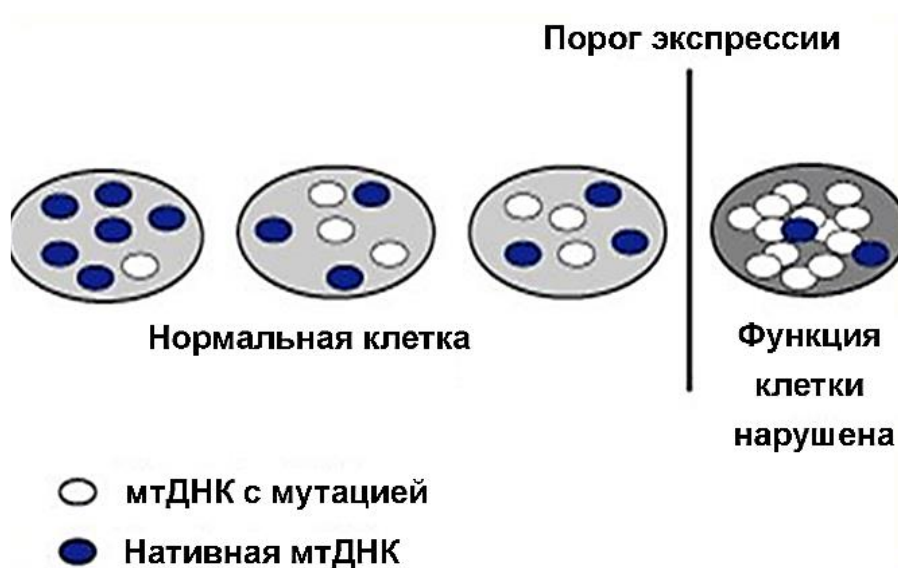


Рис. 33. Схема, иллюстрирующая проявление феномена порогового эффекта или порога экспрессии

Дебют митохондриальной болезни и её тяжесть определяется характером гетероплазмии как внутри клетки, так и между клетками одного и того же организма. Больные имеют разную процентную долю мутантной мтДНК не только в разных органах, но даже в разных клетках одного органа. Величина «порога» отличается у разных митохондриальных болезней. В среднем, митохондриальная патология проявляется, когда 50–70% мтДНК несет какую-либо мутацию. Если доля мутированных мтДНК не превышает 10%, то патология отсутствует.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ: ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Митохондриальные болезни представляют собой клинически гетерогенную группу патологий, ведущим этиологическим фактором которых является комплекс дисфункций дыхательной цепи митохондрий. Эти болезни могут быть вызваны мутацией генов, кодируемых как ядерной ДНК, так и мтДНК.

Можно выделить две главных особенности митохондриальных болезней:

1. Митохондриальные болезни поражают системы органов, клетки которых отличаются повышенной потребностью в энергии. По относительной энергозависимости, органы и ткани можно разместить в порядке убывания в ряду: центральная нервная система, скелетные мышцы и миокарда, орган зрения, почки, печень, костный мозг и эндокринная система.

2. Мутация может длительное время не проявляться. На начальном этапе недостаточность функции дефектных митохондрий компенсируют нормальные митохондрии. Со временем дефектные органеллы накапливаются, что и вызывает клинические проявления заболевания. При ранней манифестации течение болезни, как правило, более тяжелое и прогноз может быть неблагоприятным.

При одних митохондриальных болезнях поражается только определенный орган. Например, глаза, что имеет место при наследственной оптической нейропатии Лебера. При других митохондриальных болезнях в патологический процесс вовлекаются сразу несколько органов, и они проявляют себя выраженными неврологическими и миопатическими симптомами.

При многих митохондриальных болезнях, обусловленных мутацией мтДНК, у больных наблюдают вполне определенные наборы клинических признаков, что позволяет сгруппировать их в тот или иной конкретный клинический синдром. Например, синдром Кернса–Сейра (КСС), хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия (СРНО), митохондриальная энцефаломиопатия с лактоацидозом и инсультоподобными эпизодами (MELAS), миоклоническая эпилепсия с рванными красными волокнами (MERRF), нейрогенная слабость с атаксией и пигментным ретинитом (NARP) или синдром Ли (LS). Перечисленные синдромы будут подробно рассмотрены ниже. Вместе с тем, существует значительная клиническая изменчивость, и симптомы у пациентов могут не вписываться в одну конкретную категорию. В этих

случаях врач сталкивается с перекрывающимся спектром фенотипов заболеваний: мутации различных генов мтДНК имеют близкие клинические проявления.

К числу общих клинических признаков митохондриальных болезней, независимо от того, связаны ли они с мутациями в митохондриальном или ядерном геномах, являются:

- птоз (опущение верхнего века с полным или частичным перекрытием глаза),
- наружная офтальмоплегия (нарушение подвижности глазных яблок в горизонтальном и вертикальном направлениях),
- проксимальная миопатия (мышечная слабость в проксимальных отделах скелетной мускулатуры),
- непереносимость физической нагрузки,
- кардиомиопатия,
- нейросенсорная глухота (снижение слуха, обусловленное поражением структур внутреннего уха, центральных отделов слухового анализатора, преддверно-улиткового нерва),
- атрофия зрительного нерва,
- пигментные ретинопатии (группа наследственных дегенеративных хориоретинальных заболеваний, сопровождающихся прогрессирующим нарушением зрения вследствие потери клеточных слоев сетчатки и атрофии хориокапиллярного слоя),
- сахарный диабет.

Общими симптомами со стороны центральной нервной системы являются:

- флуктуирующая энцефалопатия (нерегулярно появляющаяся у больного симптоматика),
- судороги,
- деменция (стойкое снижение познавательной деятельности с утратой в той или иной степени ранее усвоенных знаний и практических навыков, а также затруднение или невозможность приобретения новых),
- мигрень,
- инсультоподобные эпизоды,
- атаксия (нарушение согласованности движений различных мышц при отсутствии мышечной слабости),
- относительно часто встречается невынашивание беременности на средних и поздних её сроках.

К настоящему времени известно более 200 митохондриальных болезней. Единой общепринятой классификации этих заболеваний нет ввиду того, что одна и та же мутация может иметь разнообразные клинические проявления. Основные причины:

- гетероплазмия,
- накопление ошибок мтДНК в процессе репликации,
- широкая тканеспецифичность порогового эффекта или порога экспрессии (threshold expression).

ОБОБЩЕННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Как вариант систематизации материала, митохондриальные болезни можно разделить на три группы.

1 группа. Первичные митохондриальные болезни. Заболевания возникают в результате мутаций мтДНК.

1.1. Точечные мутации генов, кодирующих митохондриальные белки, мт-тРНК и мт-рРНК. Наследуются по материнской линии. Точечная мутация, передаётся от матери через яйцеклетку вместе с попадающими в зиготу митохондриями. Болеют все дети (братья и сестры), только если больна мать, а отец здоров. Потомки больного отца и здоровой матери – патологию не наследуют. Примеры:

- синдром MELAS
- синдром MERRF
- синдром NARP
- синдром Лебера

1.2. Спорадические (случайные, нерегулярные) патологии, обусловленные дупликациями и делециями генов в эмбриогенезе. В семье отсутствуют повторные случаи заболевания. Примеры:

- синдром Кернса–Сейра (KSS)
- синдром Пирсона
- прогрессирующая наружная офтальмоплегия (PEO)

2 группа. Митохондриальные болезни, обусловленные дефектами (мутациями, делециями) ядерной ДНК. Наследование по Менделю. Заболевания передаются благодаря аутосомно-рецессивному, аутосомно-доминантному или Х-сцепленному типу наследования.

Мутации ядерной ДНК нарушают основную функцию митохондрий – окислительное фосфорилирование, а также обуславливают дефекты ферментов цикла Кребса и белков-транспортеров для субстратов во внутренней мембране органелл. Примеры:

- синдром Альперса
- синдром Люфта
- атаксию Фридрейха
- некоторые болезни соединительной ткани,
- сахарный диабет

3 группа. Заболевания, возникающие в результате мутаций в ядерной ДНК и, как следствие вторичные изменения в мтДНК: тканеспецифические делеции или дупликации мтДНК и уменьшение количества её копий. Примеры:

- недостаточность печени
- синдром Де Тони–Дебре–Фанкони

Подробные характеристики этих заболеваний будут даны ниже в разделе «Митохондриальные болезни: этиология, патогенез и диагностические признаки» и Таблица 1 (С. 77).

ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Митохондриальные болезни чрезвычайно трудны для диагностики. Проблема обусловлена отсутствием четкой связи между сайтом мутации и клиническим фенотипом. Это означает, что, с одной стороны, одна и та же мутация может вызывать разные симптомы, и, с другой стороны, сходный клинический фенотип могут формировать совершенно разные мутации.

Очевидно, что для постановки диагноза митохондриальной болезни принципиально важен комплексный подход, основанный на генеалогическом, клиническом, биохимическом, морфологическом (гистологическом) и генетическом анализах.

1. Генеалогический анамнез

Выявление в семейном анамнезе синдрома внезапной младенческой смерти, кардиомиопатий, деменций, раннего инсульта, ретинопатий, сахарного диабета, задержки физического развития может указывать на митохондриальную природу имеющегося заболевания.

2. Клинические проявления митохондриальных болезней

- Миопатический синдром: слабость и атрофия мышц, снижение миотонического тонуса, мышечные боли, непереносимость физической нагрузки (усиление мышечной слабости, появление рвоты и головной боли).

- Центральная нервная система и органы чувств: кома, задержка психомоторного развития, деменция, нарушение сознания, атаксия, дистония, эпилепсия, миоклонические судороги, «метаболический инсульт» (осложнения метаболической энцефалопатии), слепота центрального происхождения, пигментный ретинит, атрофия зрительных нервов, нистагм (непроизвольные движения глаз), катаракта, офтальмоплегия (паралич мышц глаза вследствие поражения глазодвигательных нервов), птоз, нарушение остроты зрения, гипоакузия (тугоухость или ухудшение слуха различной степени), дизартрия (невнятность речи), сенсорные нарушения, сухость слизистой рта, гипотония, снижение глубоких сухожильных рефлексов, инсультоподобные эпизоды (клиническое состояние, имитирующее острое нарушение мозгового кровообращения), гемианопсия.

- Периферическая нервная система: аксональная нейропатия (преимущественное поражение моторных нежели сенсорных волокон), нарушение двигательной функции гастроинтестинального тракта.

- Сердечно-сосудистая система: кардиомиопатия (обычно гипертрофическая), аритмия, нарушение проводимости.

- Желудочно-кишечный тракт: частые диспептические явления (рвота, диарея), атрофия ворсинок кишечника, экзокринная недостаточность поджелудочной железы.

- Печень: прогрессирующая печеночная недостаточность (особенно у младенцев), гепатомегалия.

- Почки: тубулопатия (по типу синдрома Де Тони–Дебре–Фанкони: фосфатурия, глюкозурия, аминацидурия), нефрит, почечная недостаточность.

- Эндокринная система: задержка роста, нарушение полового развития, гипогликемия, сахарный и несахарный диабет, гипотиреоз, гипопаратиреоидизм, гипоталамо-гипофизарная недостаточность, гиперальдостеронизм.

- Система кроветворения: панцитопения (сокращение количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови), макроцитарная анемия.

3. Основные биохимические проявления митохондриальных болезней

Повышение концентрации в крови:

- лактата и пирувата;
- 3-гидроксимасляной и ацетоуксусной кислот;

- аммиака;
- аминокислот;
- неэстерифицированных жирных кислот с разной длиной цепи;
- миоглобина;
- продуктов перекисного окисления липидов;

Снижение концентрации в крови: карнитина.

Снижение активности некоторых ферментов энергетического обмена в митохондриях.

Лактатный ацидоз является постоянным спутником митохондриальных болезней, хотя проявляется и при ряде других заболеваний. По этой причине более информативным является измерение концентрации лактата в венозной крови после умеренной физической нагрузки на велоэргометре.

4. Характерные изменения структуры скелетной мышцы при митохондриальной недостаточности

Морфологические исследования с помощью световой и электронной микроскопии в сочетании с гистохимическими методами позволяют выявить нарушения строения митохондрий, признаки их дисфункций и снижения активности митохондриальных ферментов.

Световая микроскопия с применением различных видов специальной окраски, в том числе и для определения активности митохондриальных ферментов выявляет:

- феномен «рваных» (шероховатых) красных волокон (RRF – ragged red fibres) в количестве более 5% (при окраске по Гомори). Напоминает разрыв волокон по периферии и обусловлен скоплением пролиферирующих генетически измененных митохондрий под сарколеммой (рис. 34);

- гистохимические признаки недостаточности митохондриальных ферментов (цикла Кребса и дегидрогеназ дыхательной цепи), особенно цитратсинтетазы, сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы;

- субсарколеммальное накопление гликогена, липидов, кальция. Накопление жировых капель в различных тканях, в том числе в мышечных волокнах, происходит в результате ингибирования окисления жирных кислот в митохондриях (β -окисление).

Электронная микроскопия позволяет определить:

- пролиферацию митохондрий;
- скопления аномальных митохондрий под сарколеммой;

- полиморфизм митохондрий с нарушением их формы и размера, дезорганизацию крист;
- наличие в митохондриях паракристаллических включений;
- наличие митохондриально-липидных комплексов.

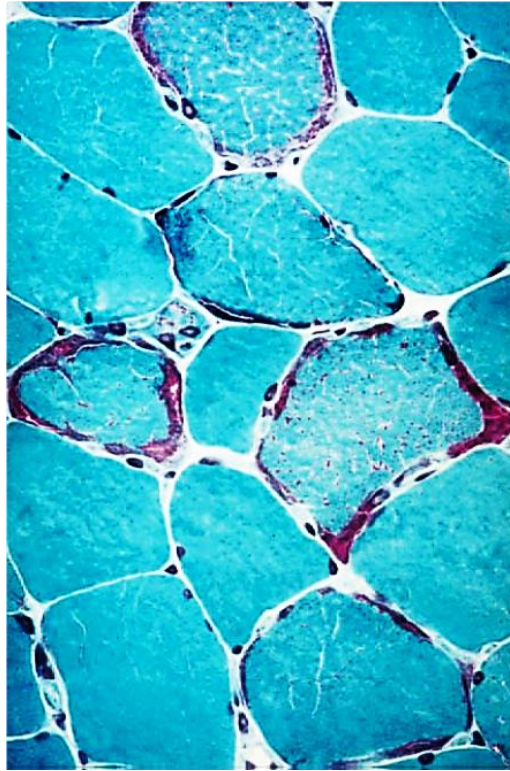


Рис. 34. Рвано-красные волокна (RRF), выявляемые окрашиванием по Гомори

Аномальные скопления митохондрий, несущих мутированную мтДНК, проявляются в виде пурпурных пятен, в основном на периферии мышечных волокон

5. Генетический анализ необходим для подтверждения диагноза митохондриальной болезни

Обнаружение любого вида митохондриальной мутации с достаточно высоким соотношением аномальной и нормальной мтДНК подтверждает диагноз митохондриального заболевания или синдрома. Отсутствие митохондриальной мутации позволяет предполагать у пациента наличие патологии, связанной с мутацией ядерной ДНК.

Известно, что **уровень гетероплазмии** во многом определяет фенотипическое проявление мутации. Поэтому, при проведении молекулярного анализа принципиально важно оценивать количество мутантных мтДНК. Оценка уровня гетероплазмии включает детекцию мутации, однако методы обнаружения мутации не всегда учитывают уровень ее гетероплазмии.

Метод клонирования дает достоверные количественные результаты (наиболее трудоемкий и продолжительный).

Флуоресцентная полимеразная цепная реакция (ПЦР) предоставляет более точные результаты при меньшей трудоемкости (не позволяет выявлять мелкие делеции и вставки).

Денатурирующая высокоразрешающая жидкостная хроматография дает воспроизводимые результаты при любых видах мутаций (делеции, вставки, точечные мутации), находящихся в состоянии гетероплазмии (оценка уровня гетероплазмии более точна по сравнению с двумя вышеуказанными).

ПЦР в реальном времени используется для обнаружения и количественной оценки мутаций мтДНК. Используют: гидролизуемые зонды (TaqMan) и интеркалирующий краситель SYBR. Наиболее точные оценки дают 3 метода:

- **минисеквенирование (SNaP-shot)** – определение однонуклеотидных замен, делеций и инсерций короткими зондами (15–30 нуклеотидов). Участок ДНК несущий мутацию, например С→Т выделяется и амплифицируется с помощью ПЦР. Этот участок является матрицей. Зонд имеет идентичную структуру, массу 5485 Да, но короче матрицы на один нуклеотид. К смеси зонда и матрицы добавляют нуклеотиды Т и С. Если к зонду присоединится нуклеотид С, то матрица «дикого» типа и ее масса составит 5758 Да. Если нуклеотид Т – матрица была мутантного типа с массой 6102 Да. Затем массу полученных образцов определяют с помощью масс-спектрометра.

- **Пиросеквенирование** – сочетание секвенирования и синтеза. Матрицу инкубируют в смеси из 4-х ферментов, 4-х дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) и 4-х терминаторов транскрипции dNTP. Присоединение комплементарного нуклеотида сопровождается флуоресцентной биохимической реакцией.

- **Biplex Invader** – позволяет обнаруживать сразу 2 мутации.

Однако, при сопоставимой точности Biplex Invader – наиболее прост в использовании, а SNaPshot – дорогостоящий метод.

В настоящее время предпочтение отдается **чиповым технологиям**, позволяющим анализировать основные патогенные мутации мтДНК сразу во множестве образцов, устанавливая при этом уровень гетероплазмии каждой отдельной мутации.

6. Примерный алгоритм диагностики митохондриальных болезней

6.1. Получение доказательного клинического предположения о наличии митохондриальной болезни. В типичных случаях это выявление клинической картины, характерной для той или иной формы митохондриальной энцефаломиопатии, например: синдромы MELAS, MERRF и др., однако «классические» варианты этих фенотипов встречаются сравнительно редко. Проведение целенаправленного поиска по выявлению лабораторных маркеров митохондриальной дисфункции, мультисистемного, полиорганного поражения, а также материнского типа наследования. Положительные результаты поисков на данном этапе будут указывать на митохондриальную природу заболевания.

6.2. Исследование мтДНК в лимфоцитах. Рекомендуется проводить у пациентов с четкими фенотипами MELAS, MERRF и атрофией зрительных нервов Лебера. При выявлении искомой мутации диагноз конкретной митохондриальной болезни может считаться подтвержденным.

6.3. При отсутствии выявляемых мутаций в лимфоцитах крови проводят биопсию скелетной мышцы: четырехглавой или дельтовидной. Скелетная мышца является более надежным источником мтДНК, поскольку отсутствие клеточных делений в мышце способствует «удержанию» митохондрий, содержащих мутантную мтДНК. Образцы мышечных биоптатов делят на 3 части: одна - для микроскопического исследования (гистология, гистохимия и электронная микроскопия), вторая - для энзимологического и иммунологического анализов (изучение характеристик компонентов дыхательной цепи), третья - для молекулярно-генетического анализа.

6.4. При отсутствии известных мутаций мтДНК в мышечных биоптатах проводят развернутый молекулярно-генетический анализ — секвенирование всей цепи мтДНК (или кандидатных генов ядерной ДНК) с целью выявления нового варианта мутации.

6.5. Идентификация конкретного биохимического дефекта в том или ином звене дыхательной цепи митохондрий является альтернативой изучения скелетной мускулатуры.

7. Митохондриальные болезни: этиология, патогенез и диагностические признаки

Таблица 1.
Характеристика основных нозологических форм митохондриальных болезней

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
Первичные митохондриальные болезни			
Синдром MELAS (<i>mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes</i>)			
Мутация гена тРНК для Лей (<i>MTTL1</i>), 80 % случаев. Описан в 1984 г. Один из наиболее распространенных синдромов (10 случаев на 100000 населения). Первые признаки - в 6–10 лет.	Снижение эффективности трансляции и синтеза белка внутри митохондрий, нарушение энергопродукции в дыхательной цепи. Мутации локализованы и поражают чаще мозг, кору больших полушарий, скелетные и сердечную мышцы, поражают почечную железу, печень, почки.	Инсультоподобные эпизоды, злокачественные мигрени, задержка психомоторного развития. Непереносимость физических нагрузок, миопатия, сердечная недостаточность. Сахарный диабет, низкий рост, гипопаратиреоидизм. Атрофия зрительных нервов, пигментный ретинит, глухота. Протеинурия, острая и хроническая почечная недостаточность. Поражение печени и ЖКТ	КТ (компьютерная томография) и МРТ (магнитно-резонансная томография) головного мозга - очаги инфаркта, кальцификация базальных ганглиев. В биоптате ске-летной мышцы - феномен RRF. Лактат-ацидоз.
Синдром Кернса-Сайра - KSS (<i>Kearns-Sayre Syndrome, retinopathy, proximal muscle weakness, cardiac arrhythmia and ataxia</i>)			
Многочисленные делеции мтДНК глазодвигательных мышц, спорадические случаи, точечные мутации. Описан в 1958 г. Типичное начало – до 20 лет.	Делеция мтДНК наиболее выражена в клетках синусового, атриовентрикулярного узла и ножек пучка Гисса. Это ведет к поражению проводящей системы сердца и развитию жизнеугрожающих состояний	Дистальная блокада ножек пучка Гисса, полная атрио-вентрикулярная блокада, синдром слабости синусового узла. Кардиомиопатии. Наружная офтальмоплегия, птоз, пигментный ретинит, пигментная дегенерация сетчатки, тугоухость. Мышечная гипотония и слабость; атаксия. Дефицит гормонов щитовидной и паращитовидной желез. Гипогонадизм, сахарный диабет, нарушение адреналового обмена.	Повышение лактата, пирувата, 3-гидроксибутирата в крови. Повышение содержания белка в спинномозговой жидкости > 1 г/л. Плоская сахарная кривая, транзиторная гипогликемия. Феномен RRF. Обнаружение крупной делеции мтДНК.

Продолжение таблицы 1.

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
Синдром Нирсона (Гоарда Нирсона) - Pearson (Marrow-Pancreas) syndrome			
Крупные делеции мтДНК, преимущественно, локализованных в митохондриях клеток костного мозга. Описан в 1979 г. Заболевание редкое – выявлено около 100 случаев. Клинические признаки проявляются уже у новорожденных. Большинство умирают на 1-м году жизни.	Нарушение окислительного фосфорилирования. Поражение красного костного мозга, серьёзное нарушение кроветворения.	Бледность, вялость, сонливость. Макроцитарная анемия с нейтропенией и тромбоцитопенией. Отставание в развитии. Нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, в меньшей мере - дисфункции печени и почек. Диарея. Фатальный метаболический ацидоз.	Обнаружение крупной делеции мтДНК в лейкоцитах, тромбоцитах. Вакуолизация эритроцитов, гемосидероз, сидеробластоз. Макроцитарная анемия, нейтропения, тромбоцитопения. На поздних стадиях — феномен RRF.
Синдром MERRF (Myoclonic epilepsy associated with «tagged red fibres»)			
Точечная мутация гена, кодирующего тРНК для Лиз (A8344G), на долю которой приходится свыше 80 % случаев. Манифестирует в подростковом возрасте.	Нарушается синтез митохондриальных белков, в частности субъединиц цитохромоксидазы. Для фенотипического проявления необходима уровень гетероплазмии 80–95 %.	Миоклонус-эпилепсия, миопатия, атаксия, демиелинизация, нейросенсорная тугоухость. Церебральные инфаркты. Нарушение сердечного ритма и проводимости. Низкий рост, задержка физического развития.	КТ головного мозга — диффузная атрофия мозга, деструкция белого вещества, снижение плотности мозговой ткани, иногда кальцификация базальных ганглиев. Повышение концентрации лактата в крови, белка — в спинномозговой жидкости. Недостаточность цитохром-с-оксидазы. В биоптатах скелетных мышц — феномен RRF. Митохондрии увеличены, деформированы, содержат липидные включения.

Продолжение таблицы 1.

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
Болезнь (синдром) Лебера (LHON — Leber hereditary optic neuropathy) — врожденная нейропатия зного нерва			
Наиболее частая причина — мутация в нуклеотиде 11778 мтДНК. Нуклеотид находится в пределах гена, кодирующего ND4 I комплекс дыхательной цепи. Манифестирует в 18–30 лет.	Нарушение окислительного фосфорилирования вследствие мутации генов, кодирующих субъединицы НАДН-дегидрогеназы. Дефекты дыхательной цепи проявляются поражением органов и тканей высоким уровнем метаболизма	Острая двухсторонняя прогрессирующая потеря центрального зрения, двухсторонняя атрофия зрительного нерва, завершающаяся полной слепотой. Иногда расстройство сердечной проводимости. Тремор, атаксия, дизартрия, спастичность (Лебер +).	Для подтверждения диагноза — единственный метод - ДНК-диагностика (ПЦР). Не имеется морфологических и биохимических маркеров.
Синдром NARP (neuropathy, ataxia and pigmentary retinopathy)			
Точечная мутация мтДНК гена, кодирующего 6 субъединицу АТР-синтазы, V комплекса дыхательной цепи. Возраст манифестации младенчество — подростковый возраст.	Нарушение окислительного фосфорилирования.	Проксимальная мышечная слабость, атаксия, задержка психического развития, деменция. Генерализованные судороги, нарушение чувствительности. Пигментный ретинит с последующей потерей зрения.	Биопсия мышц выявляет дефицит активности ферментов дыхательной цепи митохондрий.
Вторичные митохондриальные болезни			
Синдром множественных делеций			
Наследуется наиболее часто по аутосомно-доминантному типу. Ген, кодирующий фермент адениннуклеотидтрансферазу (АНТ) манифестирует в 20–30 лет.	Снижение активности фермента АНТ приводит к нарушению энергетического метаболизма и процессов репликации.	Проявления очень полиморфны, характеризуются вовлечением многих органов и систем организма (нервной, эндокринной, мышечной, глаз и др.). Наиболее часто наблюдаются наружная офтальмоплегия, генерализованная миопатия, периферическая полинейропатия, поражение слуховых и зрительных нервов, катаракта, задержка роста, гипопаратиреоз.	Лактат-ацидоз. В биоптатах скелетных мышц — феномен RRF.

Продолжение таблицы 1.

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
Атаксия Фридрейха (<i>Friedreich's ataxia</i>)			
Аутосомно-рецессивный тип наследования. Мутацией является экспансия GAA тринуклеотидных повторов (200-900) в гене фратаксина (9q13). Клинические симптомы проявляются в 6-9 лет и 12-15 лет.	Экспансия GAA тринуклеотидных повторов нарушает продукцию или стабильность мРНК фратаксина. Функция фратаксина - транспорт железа из митохондрий. Патология характеризуется накоплением железа внутри митохондрий, что приводит к увеличению свободных радикалов и окислительному стрессу.	Атаксия при ходьбе, дискоординация в руках, изменение почерка, слабость в ногах. В начале заболевания может отмечаться дизартрия. Неврологическая дегенерация поражает спинно-мозжечковые и пирамидные тракты, дорсальные столбы, мозжечок и продолговатый мозг. Поражение глаз: нистагм, парез взора, аномальную фиксацию. Сколиоз, диабет. Кардиомиопатия носит, преимущественно, гипертрофический характер и возникает как следствие окислительного стресса. Атрофия зрительного нерва - у 25 % пациентов. Потеря зрения наиболее характерна для пациентов с экспансией GAA повторов на одном аллеле и точечной мутацией на втором.	Определение мутантных триплетных повторов фратаксина. Ранним и важным дифференциально-диагностическим признаком является исчезновение сухожильных и надкостничных рефлексов. Угнетение рефлексов (ахилловых и коленных) может быть самым ранним проявлением неврологической дисфункции.
Синдром Вольфрама (<i>Wolfram syndrome, DIDMOAD</i> — <i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness</i>)			
Большинство случаев связано с трансмембранным белком вольфрамина (WFS1) геном на хромосоме 4p16.1 яДНК. Некоторые — с мутациями митохондриального генома. Манифестирует с 4-6 лет	Нарушение структуры белка wolframin.	Начинается с ювенильного сахарного диабета в сочетании с атрофией зрительных нервов. В последующем развивается несахарный диабет и тугоухость. Заболевание носит прогрессирующий характер. У половины пациентов присоединяется неврологическая симптоматика: миоклонус, судороги, атаксия, дизартрия, нистагм. Иногда развивается ретинопатия, сидеробластическая анемия, нейтропения, тромбоцитопения	

Продолжение таблицы 1.

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
Синдром Альперса (Alpers-Hildebrandt syndrome)			
Мутации ядерного гена <i>POLG1</i> , кодирующего митохондриальную полимеразу. Манифестация в 2-4 года.	Нарушение репликации мтДНК, истощение мтДНК	Прогрессирующая дегенерация нейронов, судороги и миоклонии. Задержкой психо-физического развития, мышечная гипотония, спастические парезы, гиперрефлексия, атаксия. Возможны эпизоды рвоты, снижение зрения и слуха. Часто развиваются гепатомегалия, желтуха, цирроз печени	
Митохондриальные заболевания, обусловленные нарушением цикла Кребса (фруктуксидоз, α-кетоглутаровая ацидурия)			
Дефицит фумараты, α-кетоглутарат дегидрогеназного комплекса, суцинат дегидрогеназы и аконитазы. Манифестация от 2 недель до 1-го года жизни.	Нарушения работы цикла Кребса, несовместимые с жизнью.	Тяжелая прогрессирующая энцефалопатия, микроцефалия, судороги, нарушение мышечного тонуса. Нарушения физического и психомоторного развития, рвота, сонливость, повышенная расторможенность. Снижение сухожильных рефлексов, опистотонус. Увеличение печени. Микроцефалия. Судороги.	Умеренный метаболический ацидоз, увеличение уровня лактата в крови. Высокая почечная экскреция соответствующих метаболитов цикла Кребса. В фибробластах и миоцитах — резкое снижение активности ферментов.
Синдром Лея (Lea) — Leigh syndrome (infantile subacute necrotizing encephalopathy) — инфантильная подострая некротизирующая энцефалопатия			
Точечные мутации мтДНК <i>7893C</i> или <i>7889G</i> ; либо ядерные мутации или других генов белков окислительного фосфорилирования. Манифестация в 1-2 года	Дефект транспорта электронов в дыхательной цепи.	Задержка психомоторного развития, снижение аппетита, эпизоды рвоты, дефицит массы тела. Мышечная гипотония или дистония с переходом в тонико-клонические судороги. Наружно наблюдается акт глотания. Нередко наблюдаются птоз, офтальмоплегия, атрофия зрительных нервов, реже пигментная дегенерация сетчатки. Смерть может наступить от прогрессирующей энцефалопатии.	В скелетных мышцах — накопление липидных включений, снижение гистохимической реакции на комплексы I, IV дыхательной цепи, субсарколеммальные скопления митохондрий, аномальные митохондрии с дезорганизацией крист.

Продолжение таблицы 1

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
<i>Митохондриальные болезни, обусловленные нарушением β-окисления жирных кислот с различной длиной углеводной цепи</i> Недостаточность дегидрогеназ для жирных кислот с различной длиной углеводной цепи. Манифестирует в раннем возрасте.	Нарушение трансмембранного переноса жирных кислот, митохондриального β-окисления. Истощение углеводных запасов при метаболическом стрессе (инфекционные болезни, физическая, эмоциональная перегрузка, голодание) является фактором риска. Липиды становятся источником восполнения энергетических потребностей. Активируются дефектные процессы окисления, накопление в биологических жидкостях дикарбоновых кислот, их токсичных производных, конюгатов карнитина — развивается вторичная карнитиновая недостаточность.	Заболевание характеризуется приступообразным течением. Существуют тяжелая (ранняя, генерализованная) и легкая (поздняя, мышечная) формы, отличающиеся разной степенью ферментного дефицита или его тканевой локализацией. Тяжелая форма манифестирует в раннем возрасте, в т. ч. в периоде новорожденности. Проявляется рвотой, генерализованными тонико-клоническими судорогами, прогрессирующей вялостью, сонливостью, общей мышечной гипотонией, нарушением сознания вплоть до комы, расстройством сердечной деятельности (нарушение ритма или кардиомиопатия), увеличение печени (синдром Рея). Легкая форма впервые проявляется в школьном возрасте и у подростков. Развиваются боли в мышцах, слабость, утомляемость, моторная неловкость, темная окраска мочи (миоглобинурия).	Гипокетотическая гипогликемия, метаболический ацидоз, увеличение в крови молочной кислоты, аммиака, повышение активности трансаминаз и креатинфосфокиназы. Низкий уровень общего карнитина при увеличении содержания его эстерифицированных форм. В моче высокая экскреция дикарбоновых кислот с соответствующей длиной углеводной цепи, их гидроксигликированных производных и ацилкарнитинов. Дифференциальную диагностику проводят с митохондриальными энцефаломиопатиями, органическими ацидемиями, кардиомиопатиями другого происхождения, эпилепсией, ацетонемической рвотой

Окончание таблицы 1.

Этиология. Сроки манифестации	Патогенез	Клинические проявления	Диагностика
<i>Синдром Люффа (Luff disease) — гиперметаболизм не тиреоидного происхождения</i>			
Мутации в генах, кодирующих белки дыхательной цепи. Тип наследования не выяснен. Манифестация в 6–30 лет.	Разобщение окисления и фосфорилирования, энергия расходуется в форме тепла.	Общая слабость, мышечное истощение, чрезмерное потоотделение, высокая калорийность питания без увеличения веса тела, полидипсия без полиурии, полифагия, повышение общего обмена веществ, при нормальной концентрации гормонов щитовидной железы (Т3 и Т4). Отдышка, тахикардия, лихорадка (до 38,4 °С), непереносимость высокой температуры окружающей среды.	Феномен RRF.

ПРИНЦИПЫ ТЕРАПИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Митохондриальные болезни, как и остальные генетически обусловленные заболевания, на сегодняшний день остаются неизлечимы. В клинической практике применяется только симптоматическое лечение, эффективность которого относительно невелика. Основу применяемой терапии составляют фармпрепараты, стимулирующие транспорт митохондриальных субстратов, повышающие продукцию АТФ и снижающие лактатацидоз. Терапевтическая схема подбирается индивидуально, однако серьезной проблемой в этом вопросе является то, что эффект и дозы каждого препарата чрезвычайно вариабельны у каждого из пациентов, даже с одним и тем же молекулярно-генетическим дефектом. Перечень широко рекомендуемых препаратов невелик.

Можно выделить следующие подходы к терапии митохондриальных болезней

1. Симптоматическое лечение

1.1. Диетотерапия с учетом патогенеза.

- При патологии транспорта и окисления жирных кислот рекомендуется частое и дробное питание со снижением калорийности.
- При нарушении обмена пировиноградной кислоты для восполнения дефицита ацетил-КоА используется кетогенная диета.
- При дефиците ферментов цикла Кребса применяется частое питание.
- При дефиците ферментов дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования рекомендуют использовать низкоуглеводную диету.

1.2. Медикаментозная терапия с учетом патогенеза.

- Препараты, активизирующие перенос электронов по дыхательной цепи (коэнзим Q10, витамины K1 и K3, препараты янтарной кислоты, цитохром C).
- Кофакторы энзимных реакций энергетического обмена (никотинамид, рибофлавин, карнитин, липоевая кислота и тиамин).
- Средства, уменьшающие степень лактат-ацидоза (дихлорацетат, димефосфон).
- Антиоксиданты (убихинон, витамины C и E).

В медикаментозный комплекс включают противосудорожные препараты, ферменты поджелудочной железы. Вместе с тем, необходимо исключить препараты, ингибирующие энергообмен (барбитураты, хлорамфеникол).

По показаниям назначают переливание компонентов крови.

2. Хирургическая коррекция

При нейросенсорной потере слуха, сопровождающей синдромы MELAS, KSS, применяют улитковые (кохлеарные) имплантаты.

При нарушении проводимости сердца (синдром KSS) возможно вживление искусственного водителя ритма (электрокардиостимулятора).

Клинический полиморфизм, сложность диагностики и тяжесть последствий определяют высокую актуальность разработки методов этиотропного лечения митохондриальных болезней: создание технологий генной терапии. Сегодня, приёмы и технологии генной терапии митохондриальных болезней находятся на стадии экспериментальных разработок с использованием различных моделей и клеточных линий. К сожалению, результаты этих исследований до сих пор не вышли за пределы исследовательских лабораторий. Примеры перспективных экспериментальных подходов к генной терапии дефектов дыхательной цепи митохондрий представлены в таблице 2.

Таблица 2

Экспериментальные методы генной терапии дефектов дыхательной цепи

Название метода	Описание метода	Результаты
Аллотопическая экспрессия	Клетку трансформируют Векторной конструкцией, содержащей нормальную копию митохондриального гена. <i>Примечание:</i> применим не ко всем митохондриальным генам.	Устранение дефектов генов ND1, ND4, АТР6 в клеточных линиях.
Ксенотопическая экспрессия	Использование генов субъединиц комплексов дыхательной цепи других видов организмов (альтернативных комплексов): дрожжевой NADH-оксидазы (ND1). <i>Примечание:</i> большинство комплексов не способны транспортировать протоны из матрикса в межмембранное пространство.	Устранение дефектов ферментов дыхательной цепи в клетках млекопитающих.
Коррекция системы трансляции тРНК	Импорт тРНК в митохондрии. Модификация или гиперэкспрессия аминоксил-тРНК-синтетаз.	Компенсация дефекта трансляции. Восстановление клеточного дыхания.

Эндонуклеазы рестрикция	Узнают сайты, возникшие после появления мутации, и специфически разрезают мутантную мтДНК.	Изменяют уровень гетероплазмии, блокируя транскрипцию и / или репликацию генов.
ПНК (пептидо-нуклеиновые кислоты)	Специфически связываются с мутантной мтДНК, блокируют репликацию.	
<i>Scell membrane crossing oligomers</i>	Модифицированный вариант ПНК, имеет большую полярность и лучше проникает в митохондрию.	
Белки типа «цинковые пальцы»	Связываются с определенной нуклеотидной последовательностью в мтДНК.	

ПРИНЦИПЫ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПЕРЕДАЧИ ПАТОГЕННЫХ МУТАЦИЙ мтДНК

Для профилактики проблем, обусловленных митохондриальными болезнями, большое значение имеют меры по предотвращению передачи патогенных мутаций мтДНК от больной матери к ребенку. Ведущую роль в этом играют медико-генетические консультации, на базе которых осуществляют пренатальную (дородовую) и преимплантационную диагностики.

Пренатальная диагностика проводится в семьях, в которых ранее ребенку был поставлен диагноз митохондриальной болезни. В случае мутаций в ядерных генах пренатальная диагностика позволяет на раннем сроке беременности (8–12 недель) на материале ворсин хориона проверить плод на наличие конкретной мутации. Данная информация важна женщине для принятия решения о прерывании беременности. В случае мутаций мтДНК пренатальная диагностика строго не рекомендована ввиду феномена гетероплазмии. Уровень гетероплазмии в клетках ворсин хориона не связан напрямую с уровнем гетероплазмии у новорожденного.

Преимплантационная диагностика позволяет на одной клетке, взятой от 8-клеточного плода после оплодотворения в пробирке, проверить наличие конкретной мутации и в случае её отсутствия пересадить эмбрион женщине. Таким образом, диагностика проходит до наступления беременности. В случаях мутаций мтДНК предимплантационная диагностика тоже возможна, но имеет свои ограничения. Выбор эмбриона с наименьшей степенью гетероплазмии снижает, но не исключает риск передачи мутации мтДНК от матери ребенку. Не всегда

у женщины есть ооциты с минимальным допустимым уровнем гетероплазмии. Допустимый уровень индивидуален и зависит от типа мутации, манифестации заболевания и семейного анамнеза. На данный момент уровень гетероплазмии в бластомере более 5% рассматривается как высокий риск развития болезни. Кроме того, для диагностики мутаций мтДНК необходимо минимум 2 бластомера из 8, что может существенно снижать жизнеспособность и развитие эмбриона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В клетках эукариотических организмов, помимо ядерного генома, хранящего основную генетическую информацию, присутствует незначительный по объему информации, митохондриальный геном. мтДНК содержит только 37 из 3000 генов, необходимых для полноценного функционирования митохондрий. Следовательно, функционирование митохондриального аппарата клетки протекает в форме постоянного взаимодействия ядерного и митохондриального геномов.

мтДНК, а значит и мутации мтДНК, передаются от матери к потомству почти исключительно через яйцеклетку: наследование мтДНК по материнской линии. Митохондриальные болезни – клинически гетерогенная группа патологий, ведущим этиологическим фактором которых является комплекс дисфункций дыхательной цепи митохондрий. Они могут быть вызваны мутацией генов, кодируемых как ядерной ДНК, так и мтДНК. Митохондриальные болезни можно разделить на три группы: первичные митохондриальные болезни (мутации мтДНК), вторичные болезни (мутации ядерной ДНК) и болезни, возникающие в результате мутаций в ядерной ДНК и, как следствие, вторичные изменения в мтДНК.

Митохондриальные болезни чрезвычайно трудны для диагностики, что обусловлено отсутствием четкой связи между сайтом мутации и клиническим фенотипом. Постановка диагноза возможна только на основе комплексного подхода, основанного на данных генеалогического, клинического, биохимического, морфологического (гистологического) и генетического анализов.

Митохондриальные болезни неизлечимы, поскольку отсутствуют пригодные для клинического применения технологии генной терапии. В клинической практике применяется симптоматическое лечение, эффективность которого относительно невелика.

В профилактике митохондриальных болезней ведущие роли играют пренатальная и преимплантационная диагностики.

Лекция 3

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС. ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Окислительный (оксидативный) стресс (oxidative stress) – состояние организма, развивающееся в условиях, при которых существенно возрастает скорость реакций свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул на фоне недостаточности функциональной активности системы антиоксидантной защиты (АОЗ). На рисунке 35 схематично представлено направление сдвига баланса между скоростью продукции активных форм кислорода (АФК), свободных радикалов (СР) и гидроперекисей различной природы в клетке, органе, организме, с одной стороны, и функциональной активностью системы АОЗ, с другой стороны.

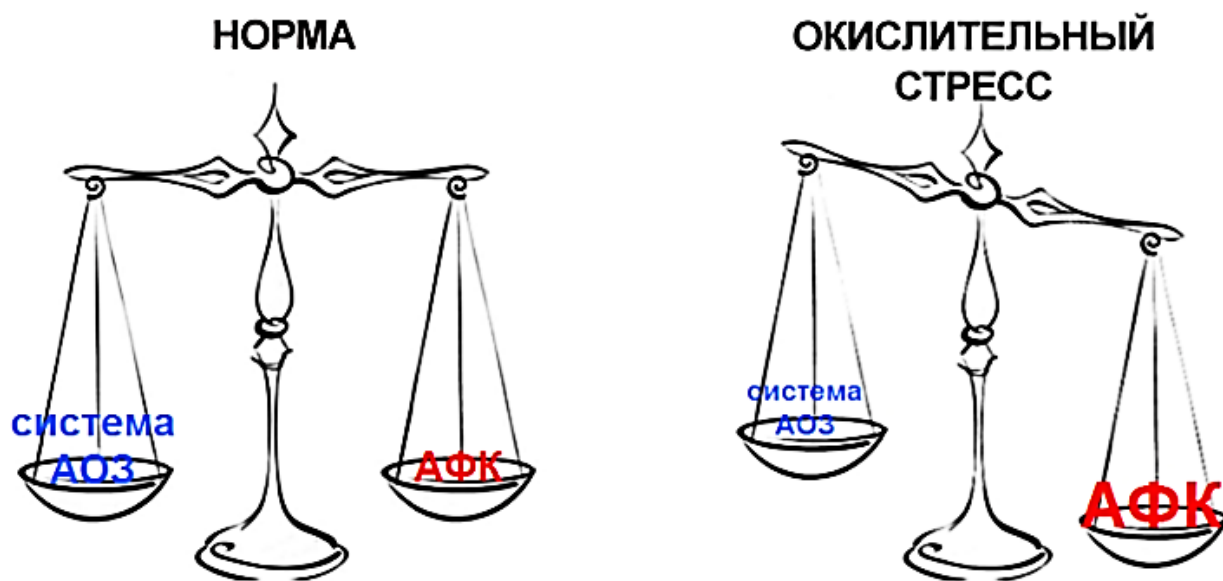


Рис. 35. Аллегорическая картина нарушения физиологического баланса при окислительном стрессе

Этот дисбаланс приводит к избыточному накоплению продуктов реакций СРО, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью. Они вызывают окислительную модификацию практически любых биомолекул, что приводит к нарушению их структуры и функ-

ций. Эти явления часто становятся причинами возникновения и прогрессирования различных патологических процессов в организме, ускоряют его старение и могут вызвать летальный исход.

Различают **прямой механизм** индукции окислительного стресса, когда первично повреждается система АОЗ, и **косвенный механизм**, при котором оксиданты сначала изменяют активность метаболических процессов, не участвующих непосредственно в работе системы АОЗ. Далее, косвенные механизмы, формируют вторичную функциональную недостаточность системы АОЗ.

В современной биохимии отсутствует общепринятая количественная градация степеней тяжести окислительного стресса. Вместе с тем, можно выделить, по меньшей мере, две ступени его тяжести:

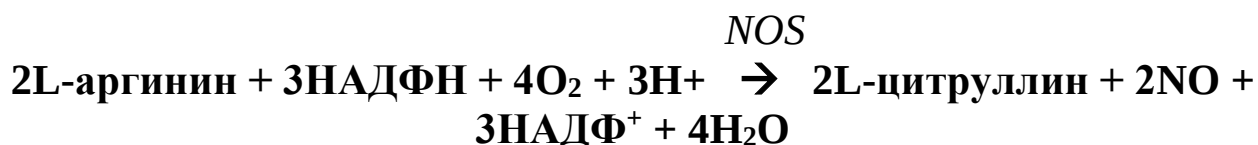
I ступень. Окислительное повреждение относительно немногочисленной группы клеток, которые элиминируются (удаляются) из клеточной популяции путем **апоптоза**. При этом, как правило, не возникает угрозы жизнеспособности органа и организма в целом.

II ступень. В случае системного окислительного стресса клетки массированно гибнут путем **некроза**. В этом случае масштабы повреждения тканей могут оказаться настолько велики, что они становятся несовместимы с жизнью организма.

В ходе формирования научных представлений о биохимической природе окислительного стресса, первоначально полагали, что в основе феномена лежат повреждающие эффекты, обусловленные действием АФК и продуктов СРО ненасыщенных липидов: гидроперексидов жирных кислот и СР, образующихся при их распаде. Эти взгляды претерпели существенную коррекцию после того, как в период с 1980 по 1986 гг. Р. Фарчготт и Л. Игнарро открыли сигнальные функции молекулы оксида азота (II) или монооксида азота (NO). NO является свободным радикалом. При возникновении определенных патологических процессов продукция NO во всех тканях организма существенно усиливается. Оказавшийся в избытке оксид азота, начинает неферментативно реагировать с супероксидным анион-радикалом кислорода в результате чего образуются активные формы оксида азота (АФОА). Они обладают выраженным цитотоксическим действием. Благодаря этому, современная парадигма окислительного стресса включает в себя не только повреждающие эффекты АФК, но и эффекты АФОА. Нарушения структуры и функций биомолекул, специфически вызванный воздействием на них АФОК, получили отдельное название - **нит-**

розативный стресс. Таким образом, в настоящее время нитрозативный стресс рассматривается как неотъемлемый составной элемент феномена окислительного стресса, в рамках которого цитотоксические эффекты одновременно оказывают как АФК, так и АФОА.

Молекула NO представляет собой свободный радикал, поскольку имеет один неспаренный электрон в атоме азота (*N=O). В живых системах образование монооксида азота происходит в результате окисления атомом кислорода L-аргинина, которое катализирует фермент *NO-синтаза* (NOS). Процесс ферментативного синтеза оксида азота сложен, однако в общем виде реакция может быть описана уравнением:



NO относят к семейству вторичных мессенджеров, осуществляющих местную регуляцию. Однако эта функция присуща NO только, если он синтезируется с участием трёх конститутивных изоформ NOS: эндотелиальной (*eNOS*), нейрональной (*nNOS*) и макрофагальной (*mNOS*). Коренным образом роль NO в организме изменяется в условиях многих патологических процессов, патогенез которых включает реакцию воспаления и нарушения функционального состояния иммунной системы. При этом во множестве типов клеток начинает синтезироваться индуцибельная изоформа *NO-синтазы* – *iNOS*, которая отсутствует в норме. В результате концентрация оксида азота во многих тканях существенно возрастает и NO такого происхождения уже не способен выполнять функции сигнальной молекулы. В этих условиях, помимо накопления избыточного количества NO, в тканях обязательно повышается концентрация супероксидного анион-радикала кислорода (*O₂⁻). В силу высокой реакционной способности того и другого радикалов, они начинают активно взаимодействовать в неферментативной реакции. Её скорость чрезвычайно высока и лимитируется лишь скоростью диффузии этих радикалов. Продуктом реакции является пероксинитрит (ONOO) – соединение, многократно превосходящее NO по своим окислительным свойствам:



Появление пероксинитрита – ведущий механизм повреждения тканей при нитрозативном стрессе. Пероксинитрит уже не является свободным радикалом, поскольку неспаренные электроны в молекулах $^*\text{O}_2^-$ и $^*\text{NO}$ образуют новую химическую связь. Выявлена важная закономерность, согласно которой в условиях повышения тканевой концентрации оксида азота с наномолярной (в физиологических условиях) до микромолярной (в условиях патологии), NO способен выигрывать конкуренцию у супероксиддисмутазы (СОД) за супероксидный анион-радикал. По этой причине в условиях патологии большая часть $^*\text{O}_2^-$ взаимодействует с NO с образованием пероксинитрита, а не обезвреживается с помощью СОД.

Молекула пероксинитрита стабильна в водных растворах, что позволяет ей диффундировать на относительно большие расстояния и активно взаимодействовать с различными биомолекулами. Ведущими цитотоксическими эффектами пероксинитрита являются:

- окисление железосерных центров и тиолов белков;
- ингибирование активности ферментов, каталитический центр которых содержат металлы с переменной валентностью;
- нитрование остатков тирозина в различных белках, что повреждает их нативную конформацию и нарушает функционирование.

Таким образом, с позиций современных представлений, окислительный стресс включает в себя цитотоксические эффекты АФК и АФОА. Они и определяют, в конечном итоге, судьбу клетки в условиях окислительного стресса.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ (РЕДОКС) ГОМЕОСТАЗ КЛЕТКИ

Негативные последствия окислительного стресса для клеток, органов и целостного организма не сводятся только к повреждению биомолекул и клеточных структур, лежащих в основе нарушения их функций. Одновременно с вышеупомянутыми процессами, в силу повышения концентрации соединений-оксидантов, в клетках формируется существенный **сдвиг окислительно-восстановительного гомеостаза или редокс-гомеостаза**.

Для нормальной жизнедеятельности клетки в её внутриклеточных компартментах, помимо стабилизации **pH-оптимума**, необходимо поддерживать **оптимальные значения редокс потенциала (Eh)**. В биохимии под окислительно-восстановительным потенциалом подразумевают способность вещества-восстановителя отдавать электроны

веществу-окислителю. Величину стандартного редокс потенциал (Eh^o) для конкретной редокс-пары определяют измерением электродвижущей силы, поэтому его величину выражают в вольтах (В) или в милливольтах (мВ). Для этого используют полуэлемент, в котором вещества восстановитель и окислитель присутствуют в концентрациях 1 моль/л при 25 °С и рН 7,0 и находятся в равновесии с электродом специальной конструкции, который способен принимать электроны от восстановителя и передавать их окислителю. Для измерения редокс-потенциалов используют электрод специальной конструкции, который называется «водородный электрод».

Многие жизненно важные реакции, идущие в рамках как катаболизма, так и анаболизма, относятся к категории окислительно-восстановительных реакций и катализируются ферментами класса оксидоредуктаз. Отсюда становится понятным, почему для их оптимального протекания принципиально важна стабильность редокс потенциала. Для каждого компартмента клетки в физиологических условиях характерно определенное значение редокс потенциала. В норме редокс-статус клетки, в целом, носит восстановительный характер, что определяется преобладанием молекул – доноров электронов, то есть, восстановителей. По этой причине в физиологических условиях усредненное значение стандартного редокс потенциала (Eh^o) внутриклеточного пространства составляет около -320 мВ, которое принадлежит отрезку шкалы с отрицательными значениями Eh^o для окислительно-восстановительных пар со свойствами восстановителей (рис. 36).

Из графика на рисунке 36 следует, что в диапазоне отрезка шкалы с отрицательными значениями расположены редокс-пары, имеющие свойства **восстановителей – доноров электронов**. Максимальные восстанавливающие свойства имеет редокс-пара глюкоза/пируват со значением Eh^o около -700 мВ. По мере продвижения вдоль шкалы к отметке «0», восстанавливающие свойства редокс-пар уменьшаются. Далее начинается отрезок шкалы с электроположительными значениями Eh^o . Тут следуют редокс-пары, обладающие свойствами **окислителей – акцепторов электронов**. Максимальное значение Eh^o имеет редокс-пара $H_2O/1/2 + 2e^-$ – около +850 мВ.

В условиях окислительного стресса, когда в клетке преобладают молекулы – оксиданты (окислители), значение Eh^o внутриклеточного пространства сдвигается в сторону более электроположительных значений. В результате такого нарушения клеточного редокс-гомеостаза,

страдают множество метаболических процессов, в том числе те, которые обеспечивают жизнедеятельность клеток.

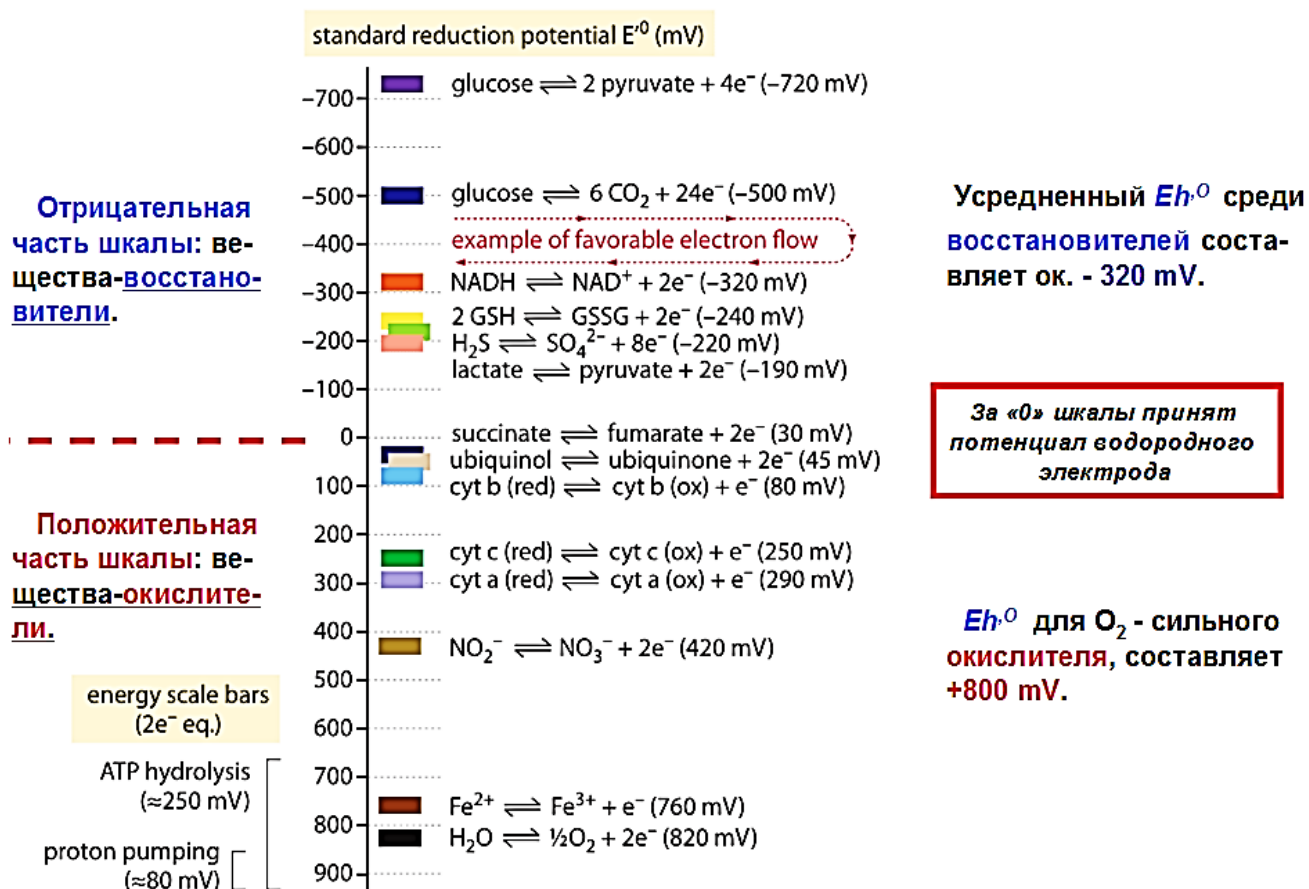


Рис. 36. Шкала значений стандартных потенциалов (Eh^0)

окислительно-восстановительных пар, формирующих редокс-статус клетки

Окислительно-восстановительный потенциал измеряют с помощью «водородного электрода». Его не следует путать со стеклянным электродом, предназначенным для измерения концентрации ионов водорода (pH) в водных системах.

Одним из механизмов быстрой регуляции метаболических путей является изменение активности ключевых ферментов путем их фосфорилирования / дефосфорилирования, что обеспечивается работой *протеинкиназ (ПК)* и *фосфопротеинфосфатаз (ФПФ)*, соответственно. Избыток оксидантов в условиях окислительного стресса способен не только изменять активность ферментов, но также активировать / инактивировать факторы транскрипции и влиять на работу мембранных ионных каналов. Показано, что *ПК* и *ФПФ* – ферменты, которые наиболее чувствительны к сдвигам редокс-статуса, вследствие чего в условиях окислительного стресса их активность существенно меня-

ется. При этом, в первую очередь, происходит окисление чувствительных к изменению редокс-потенциала сульфгидрильных групп (-SH) аминокислоты цистеина в составе первичной структуры ферментного белка. Окисление / восстановление тиолов белков считаются основным механизмом, с помощью которых оксиданты (в том числе АФК и АФОА) модулируют работу различных путей передачи внутриклеточных регуляторных сигналов. В частности, оксиданты способны активировать многие *ПК* и ингибировать *ФПФ*, что влечет за собой расширение масштабов фосфорилирования остатков тирозина или серина / треонина в составе различных белков. Это существенно изменяет их функциональную активность: в одних случаях достигается её усиление, в других случаях – ослабление.

Классическим примером, иллюстрирующим роль оксидантов в стимулировании адаптивного ответа клеток, может служить протеинкиназа JNK (с-Jun N-terminal kinase). Её название можно перевести, как киназа, фосфорилирующая N-конец белка с-Jun. JNK является представителем семейства стресс-активируемых протеинкиназ (САПК) или SAPK (stress-activated protein kinase). В результате воздействия на клетку различных неблагоприятных факторов (стресс-факторов), в том числе, в условиях окислительного стресса, происходит активация JNK. Далее, эта серин/треониновая киназа фосфорилирует белок с-Jun, который образует гетеродимер с другим белком – с-Fos. Гетеродимер с-Jun/с-Fos формирует транскрипционный фактор, получивший название AP-1 (activator protein-1). Фосфорилирование с-Jun с участием JNK необходимо для завершения активации AP-1. Активированный транскрипционный фактор проникает в ядро и инициирует экспрессию генов, кодирующие белки, необходимые для пролиферации и дифференциации клеток, а также для повышения их жизнеспособности.

Таким образом, надёжная стабилизация оптимальных значений Eh^o в компартментах клетки не менее важна, чем стабилизация рН-оптимума. В клетке существует эффективный «буфер», позволяющий стабилизировать редокс гомеостаз. Этот «буфер» образуют следующие редокс-пары:

- **Глутатион, 2GSH/GSSG – восстановленный глутатион / окисленный глутатион**

Пара 2GSH/GSSG присутствует во всех компартментах клетки в относительно высокой концентрации, составляющей около 10 мМ. Отношение концентраций 2GSH/GSSG в норме высоко, поскольку пре-

обладает восстановленная форма глутатиона. Эти обстоятельства, в сочетании с высокой реакционной способностью глутатиона, обеспечивают его доминирующую роль в формировании окислительно-восстановительного статуса клетки. Пара 2GSH/GSSG образует главный компонент клеточного редокс «буфера». Степень снижения отношения 2GSH/GSSG может служить количественным показателем степени окислительного стресса. Окисленный глутатион восстанавливается в реакции, катализируемой ферментом *глутатионредуктазой*. Фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит кофермент флавинадениндинуклеотид и участок связывания с молекулой НАДФН, которая является донором водорода, необходимого для восстановления окисленного глутатиона.

- **Пиридиновые нуклеотиды, НАДФ⁺/НАДФН**

НАДФН является самым важным восстановителем (донором водорода) в реакциях биосинтеза жирных кислот, стероидов и других реакциях, а также в восстановлении окисленного глутатиона в реакции, катализируемой *глутатионредуктазой*. При этом происходит восстановление дисульфидной связи окисленного глутатиона (GSSG) до его сульфгидрильной формы – GSH.

- **Тиоредоксин, Trx(SH)₂/TrxSS – восстановленный / окисленный тиоредоксин**

Тиоредоксины – семейство небольших (молекулярная масса около 12 кДа) дисульфид-содержащих редокс-активных белков. Функционально важной частью этих белков являются сульфгидрильные группы, при помощи которых молекулы тиоредоксина способны восстанавливать дисульфидные связи в других белках, разрушая появившиеся в них дисульфидные мостики. Окисленные формы тиоредоксинов восстанавливаются с участием флавинового фермента *тиоредоксинредуктазы*, которая использует молекулу НАДФН в качестве донора водорода, возвращая этим окисленный тиоредоксин в активную (восстановленную) форму.

- **Цистеин / цистин, Cys(SH)₂/CysSS – восстановленный / окисленный**

Цистеин – заменимая аминокислота, проявляющая свойством сильного антиоксиданта благодаря выраженной способности её дисульфидной группы вступать в окислительно-восстановительные реакции. Цистин – продукт окислительной димеризации цистеина, в ходе

которой две тиольные группы двух цистеинов образуют дисульфидную связь цистина. Важно, что цистеин является предшественником важнейшего антиоксиданта – глутатиона.

В заключение необходимо подчеркнуть, что окислительный стресс и обусловленный им сдвиг редокс-гомеостаза соотносятся как два взаимообусловленных и взаимоусиливающих феномена, образующих «порочный круг». Он способствует прогрессированию многих заболеваний, в патогенезе которых участвует окислительный стресс, в первую очередь, таких как сахарный диабет и атеросклероз.

ПОСЛЕДСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

В настоящее время выделяют три наиболее значимых следствия, которые обусловлены гиперактивацией реакций СРО в биосистемах при окислительном стрессе:

1. Универсальный механизм повреждения биомембран, реализующийся при многих патологических процессах. Он может выступать в качестве как патогенетического, так и этиопатогенетического факторов.

2. Наряду с гидролизом мембранных фосфолипидов, катализируемым *фосфолипазами*, гиперактивация реакций СРО является важным механизмом модификации фосфолипидного бислоя мембран. Следствиями такой модификации являются:

- образование гидрофильных пор в мембранном бислое («водная коррозия» мембран по Ю.А. Владимирову), что в дальнейшем обуславливает появление неспецифической проницаемости мембраны для макромолекул;

- активация процесса способствует «демонтажу» мембранных структур и обновлению их фосфолипидного компонента.

3. Гиперактивация реакций СРО биомолекул является значимым механизмом биологического старения, который определяет его скорость.

На рисунке 37 в общем виде представлена роль АФК, АФОА и свободных радикалов различной природы в повреждении биомолекул при окислительном стрессе. Повреждающее действие СР в живых системах направлено на три типа клеточных мишеней: белков, нуклеиновых кислот и липидов мембран:

- Окисление аминокислот в составе белка
- Свободнорадикальные реакции оказывают летальное и мутагенное действие, основанное на разрушении нуклеиновых кислот.

- СР инициируют цепное окисление липидов в мембранах, которое приводит к нарушению их барьерных и других свойств и, в конечном итоге, к подавлению функций клетки.

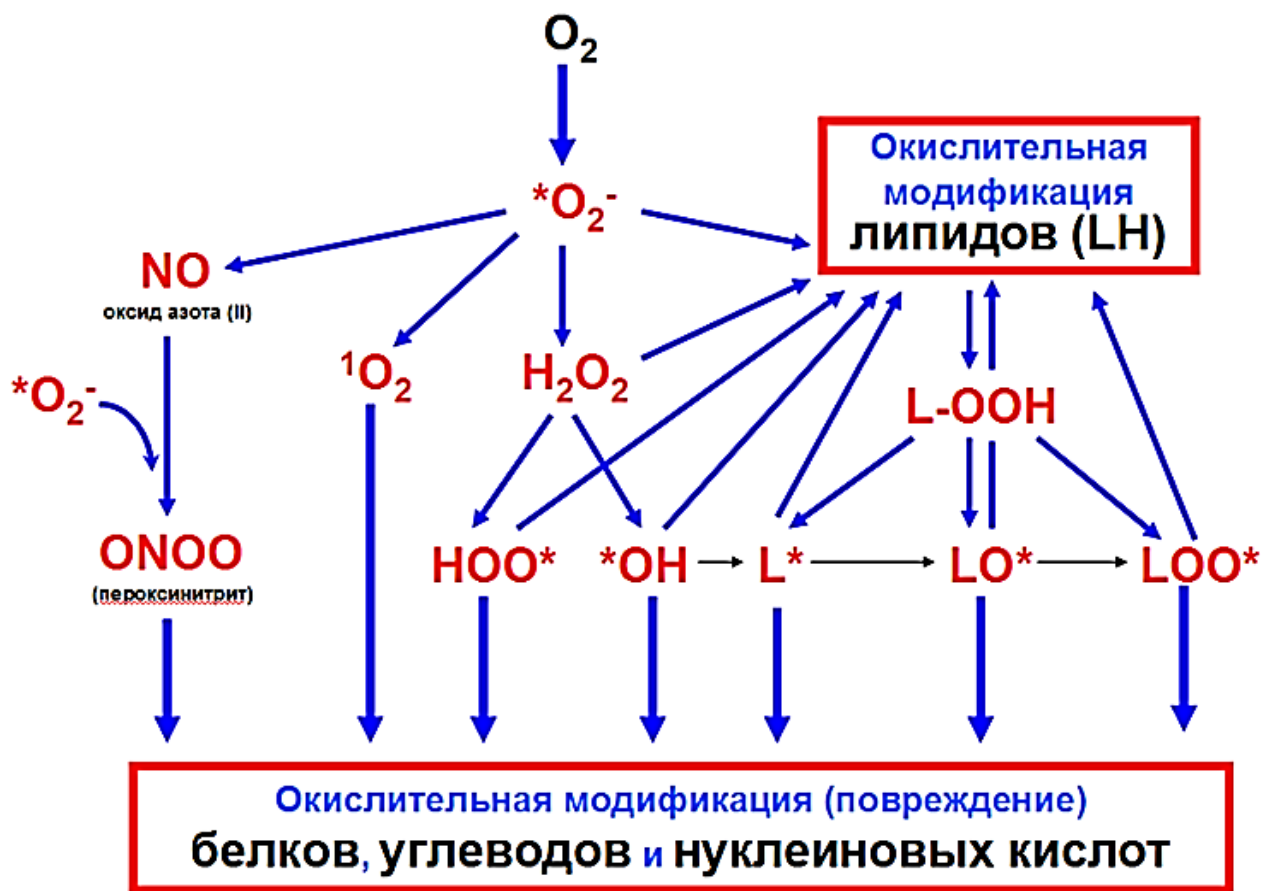


Рис. 37. Активные формы кислорода, оксида азота и свободные радикалы в механизмах повреждения биомолекул при окислительном стрессе.

Представленная выше схема показывает, что СРО липидов могут инициировать как АФК, так и СР липидов, образовавшиеся при их перекисном окислении. Такие липидные СР обеспечивают стимуляцию реакций продолжения цепи и реакций разветвления цепи. Подробно эти явления описаны в **Лекции 3** (С. 64) в 1-й части **Избранных лекций**.

МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ФОСФОЛИПИДНОГО БИСЛОЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

В этом разделе будут рассмотрены последствия мембранотропного действия СР, которые ответственны за окислительную модификацию фосфолипидного бислоя клеточных мембран.

ПОВЫШЕНИЕ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН

Липидный бислой любых клеточных мембран, подвергнутый атаке СР и других оксидантов, становится более проницаем, прежде всего, для протонов (H^+) и ионов кальция (Ca^{2+}). Особое значение для жизнедеятельности клетки приобретает появление протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий, приводящее к разобщению окислительного фосфорилирования. Это вызывает дефицит энергии в клетке и может быть рассмотрено как эквивалент недостаточности кислорода.

При индукции СРО липидов в мембранах саркоплазматического ретикулума (СПР) клеток мышц происходит нарушение транспортной функции кальциевого насоса – Са-АТФазы. Коэффициент Ca^{2+}/ATP , в нормальных условиях составляющий величину, равную 2, начинает снижаться по мере накопления в мембранах продуктов СРО липидов. В основе этого эффекта лежит увеличение проницаемости для ионов мембран СПР. Каталитическая активность Са-АТФазы относительно устойчива к индукции СРО липидов, однако на более поздних стадиях процесса развивается её ингибирование. Полагают, что этот процесс обусловлен как накоплением межмолекулярных белковых сшивок, так и прямым окислением молекул Са-АТФазы поскольку фермент содержит легко окисляемые SH-группы в составе активного центра. В результате окислительной модификации Са-АТФазы она превращается в нерегулируемый канал для Ca^{2+} , через который эти ионы начинают выходить вдоль градиента концентрации из полостей СПР в цитоплазму, нарушая кальциевый гомеостаз и тем самым работу Ca^{2+} -контролируемых систем клетки. Са-АТФаза – мембранный фермент, активность которого, в том числе, зависит от вязкости фосфолипидного микроокружения. Показано, что окислительная модификация этих фосфолипидов приводит к увеличению их вязкости и к снижению активности Са-АТФазы. Есть данные, указывающие на то, что изменения вязкости фосфолипидного микроокружения фермента нарушают конформационные переходы в его молекуле, которые необходимы для определенной стадии работы Са-АТФазы. В конечном итоге способность АТФазы гидролизовать АТФ сохраняется, но Ca^{2+} не закачивается внутрь, а, наоборот, начинает выходить из СПР в цитоплазму (рис. 38).

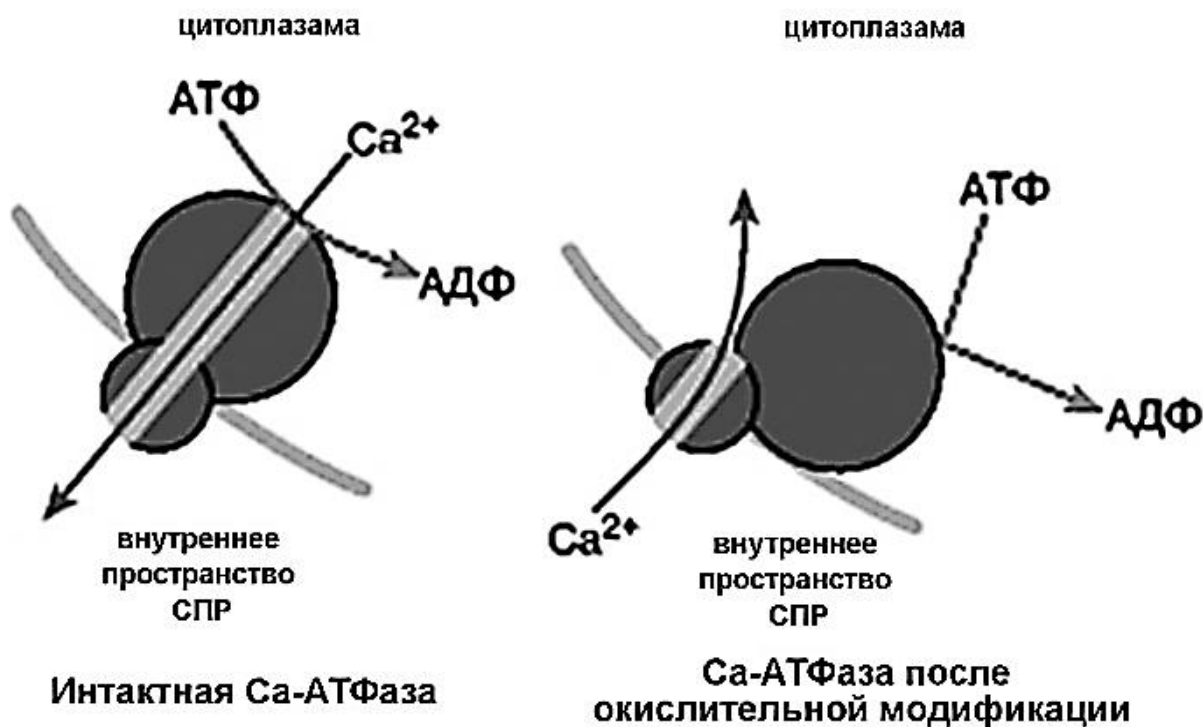


Рис. 38. Окислительная модификация Са-АТФазы, приводящая к трансформации ионного насоса в ионный канал (Болдырев А.А. и др., 2006)

В условиях гиперактивации СРО в мембране возможен также следующий механизм формирования неспецифической ион-проводящих пор в фосфолипидном бислое (рис. 39).

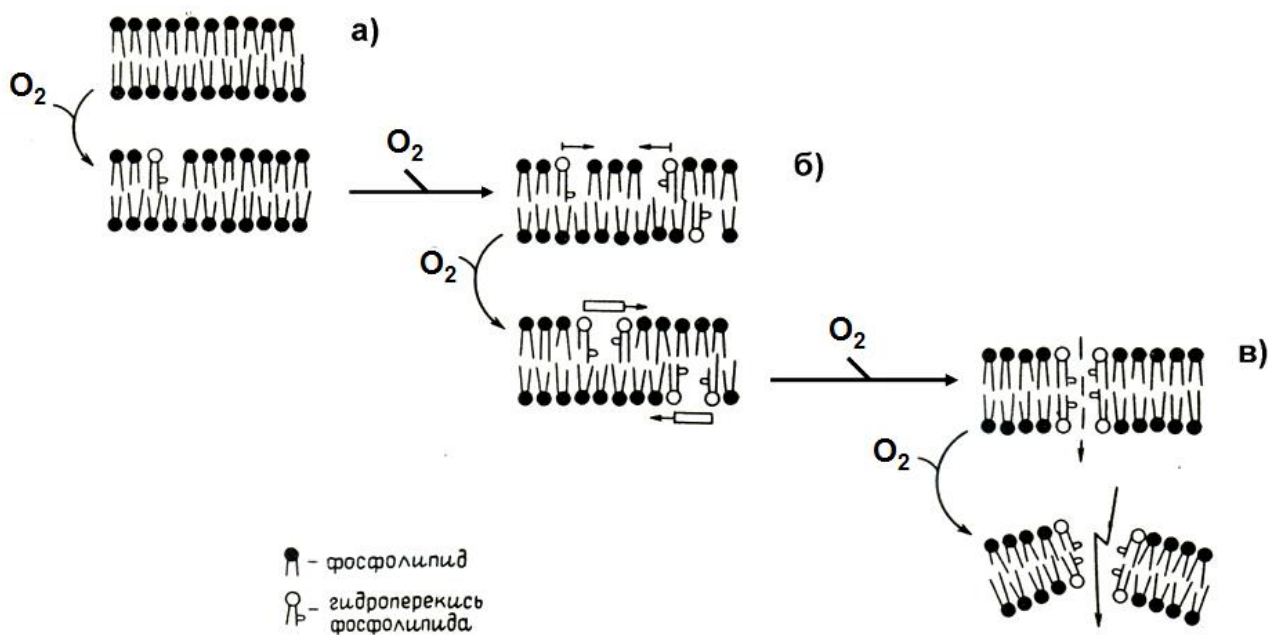


Рис. 39. Схема формирования перекисных кластеров и разрушения мембраны под действием свободнорадикального окисления (Лебедев А.В., 1990)

Ниже (раздел «Повышение полярности мембранного фосфолипидного бислоя», С. 102), подробно представлен механизм изменения конфигурации молекулы фосфолипида, подвергнутой окислительной модификации. Появление полярности в изначально гидрофобной части молекулы фосфолипида, благодаря образованию там гидроперекисей жирных кислот, создает условие для спонтанного слияния молекул окисленных фосфолипидов с образованием «перекисных кластеров» (рис. 39, фрагмент а). Такие кластеры способны двигаться вдоль плоскости мембраны путем латеральной диффузии (рис. 39, фрагмент б). Пара образуется при совпадении позиций двух перекисных кластеров в наружном и внутреннем слоях мембраны. «Упаковка» молекул фосфолипидов в пределах кластера гораздо менее плотна, чем в норме. Этот дефект мембранной структуры формирует неспецифический «канал» для различных ионов (рис. 39, фрагмент в). Полагают, что образование и слияние нескольких крупных «перекисных кластеров» может привести к деструкции мембраны.

СНИЖЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАН

Одно из наиболее важных следствий окислительной модификации мембранных фосфолипидов является потеря мембраной электрической стабильности. Она проявляется в снижении потенциала электрического пробоя мембраны. В исследованиях, проведенных как с естественными (эритроциты и митохондрии), так и с искусственными бислойными липидными мембранами, было показано, что после инициации СРО мембранных фосфолипидов различными способами, наблюдали не только увеличение электрической проводимости мембран, но и снижение потенциала пробоя со 100 мВ до 30 мВ и меньше. В результате электрическая «прочность» мембраны может снизиться настолько, что бислой уже оказывается неспособен выдерживать собственный потенциал, что приводит к электрическому аутопробою. Одновременно с этим в исследуемых цитоплазматических мембранах были отмечены:

- утечка K^+ во внешнюю среду,
- выход во внешнюю среду молекул гемоглобина,
- набухание клеток.

Увеличение проницаемости мембран для ионов, обусловленное ионофороподобным действием продуктов СРО фосфолипидов, или по-

лученное в результате электрического пробоя, может привести к серьёзным нарушениям метаболизма клетки. Так, увеличенная проницаемость внутренней мембраны митохондрий порождает недостаток энергии в клетке, одним из результатов которого становится повышение концентрации в цитоплазме ионов Ca^{2+} и Na^+ . Следствием этого становится активация ионами Ca^{2+} мембранно-связанной фосфолипазы, что приводит к дальнейшему снижению электрической стабильности мембраны и к потере её барьерных свойств. Происходит замыкание «порочного круга», что может завершиться гибелью клетки.

ПОВЫШЕНИЕ ПОЛЯРНОСТИ МЕМБРАННОГО ФОСФОЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

Потеря барьерной функции мембран в результате СРО её фосфолипидного компонента чаще всего приводит к серьёзному повреждению клетки. Наряду с этим явлением, гиперактивация СРО фосфолипидов мембранного бислоя способна вызывать, так называемую, «мягкую» модификацию его физических свойств. В результате этого на поверхности участка мембраны, чьи фосфолипиды подверглись окислительной модификации, появляются отрицательные электрические заряды, которые в норме отсутствуют. Если неокисленная ненасыщенная жирная кислота в составе фосфолипида погружена в гидрофобную «сердцевину» бислоя, то жирная кислота, подвергнутая СРО, приобретает полярные свойства, так как у неё появляется отрицательно заряженные перекисные, кето- и альдегидные группы. Такая модифицированная жирная кислота продолжает оставаться в составе молекулы фосфолипида. Однако, становясь полярной, она «выталкивается» из гидрофобной зоны мембранного бислоя наружу, в водную фазу. «Развернутые» модифицированные жирные кислоты возвышаются над плоскостью мембраны, и именно они формируют отрицательно заряженные зоны на её поверхности. Рост электроотрицательности поверхности мембраны становится причиной ухудшения межмембранных взаимодействий, а также нарушения взаимодействий между плазматическими мембранами клеток и частицами сывороточных липопротеинов.

Роль окислительной модификации фосфолипидного бислоя клеточной мембраны в формировании различных патологических процессов схематично представлена на рисунке 40.

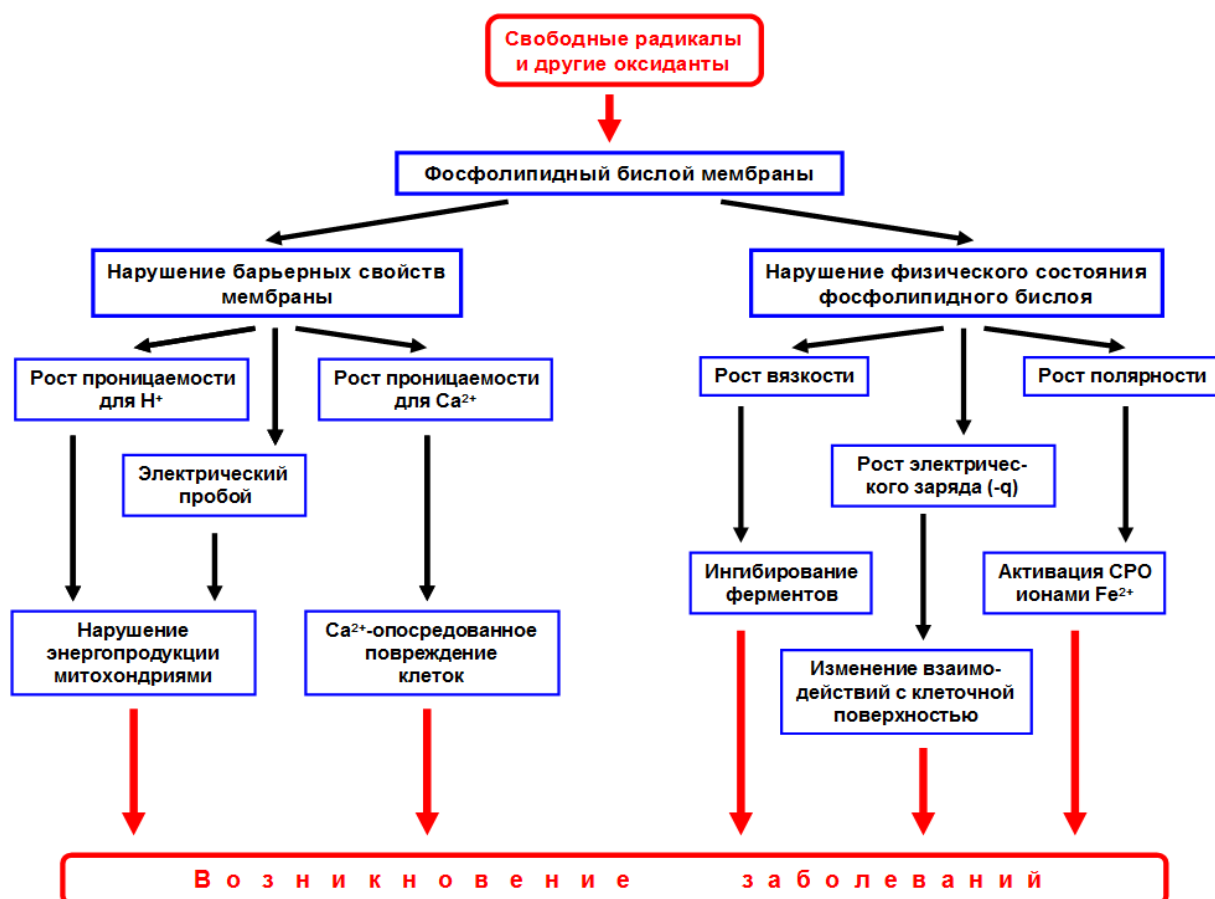


Рис. 40. Универсальный механизм повреждения фосфолипидного бислоя клеточной мембраны под влиянием свободных радикалов, лежащий в основе этиопатогенеза заболеваний (Владимиров Ю.А. и др., 1991)

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

В условиях окислительного стресса молекулы белков подвергаются окислительной модификации по всей длине полипептидной цепи. СР способны атаковать белки в различных участках их молекул. Именно окисление аминокислот в составе белка неизбежно приводит к физическим и физиологическим изменениям самих белков. Эти явления лежат в основе нарушений их первичной, вторичной и третичной структур, что может изменить их чувствительность к протеолизу, а также завершится агрегацией или фрагментацией, и, в конечном итоге, потерей функциональной активности биомолекулы.

Окислительная модификация аминокислот в составе молекул белков может быть как **обратимой**, так и **необратимой**. Примерами первого варианта могут служить: обратимое окисление-восстановление тиоловых групп, что обязательно сопровождает любой вид окисли-

тельного стресса, а также окисление метионина до метионина сульфоксида с последующим энзиматическим восстановлением до метионина. Примером необратимого окислительного повреждения является разрыв гетероциклического и ароматического колец в молекулах гистидина и триптофана, соответственно.

Примером последствий окисления гистидина может служить нарушение функций системы *НАДФН-редуктаза – цитохром P-450*. Высказана гипотеза о том, что «маркировка» белка путем окисления гистидина, служит для его распознавания протеазами и, таким образом, включает его в кругооборот протеинов. Показано, что синглетный кислород способен образовывать эндоперекись гистидина.

Продуктами окисления тирозина являются: дитиروزин и изодитиروزин.

Пролин в молекулах белков является предпочтительной мишенью гидролиза пептидных связей, что сопровождается появлением N-концевого остатка глутамата в образовавшемся фрагменте.

Цистеин. Сам процесс образования дисульфидных связей в пептидах и белках, нельзя однозначно относить только к категории повреждений, вызываемых различными оксидантами. Выше, в данной лекции уже было подчеркнуто, что тиол / дисульфидное равновесие - обратимое явление, которое играет ключевую роль в модулировании самых разных функций белков в физиологических условиях. Так, у ферментов при смене тиол / дисульфидного статуса изменяются его каталитические свойства (K_m и / или V_{max}).

Наиболее распространенный и легко обнаруживаемый тип повреждения белков – образование карбонильных групп при окислении таких аминокислот, как лизин, аргинин и пролин. Карбонильные группы образуются из карбоксильных групп белков под действием АФК и различных СР. Карбонильные группы, в свою очередь, способны взаимодействовать с аминогруппами, образуя, так называемые, Шиффовы основания. Эти высокоактивные химически соединения участвуют в образовании поперечных сшивок между белковыми молекулами, что нарушает их функциональную активность. Процесс химического, то есть неферментативного, сшивания наблюдается и при гликозилировании белков, который существенно активируется в условиях окислительного стресса. Гликозилированные таким путем белки частично теряют способность выполнять свои функции, что, например, имеет место в патогенезе сахарного диабета.

Можно привести несколько примеров окислительной модификации белков и изменения при этом их функциональных свойств:

- В норме фермент *ксантиндегидрогеназа* катализирует превращение ксантина (и гипоксантина) в мочевую кислоту. Под действием избытка АФК происходит интенсивное окисление SH-групп в составе фермента, что приводит к трансформации *ксантиндегидрогеназы* в *ксантиноксидазу*. Последняя, с участием мочевой кислотой, начинает образовывать супероксидный анион-радикал кислорода. В итоге происходит дополнительное увеличение концентрации АФК в тканях.

- Если фермент в составе активного центра содержит металл с переменной валентностью, то в присутствии избытка перекиси водорода начинается образование гидроксильных радикалов (*ОН), которые вызывают инактивацию фермента.

- Показано, что в организме мышей, несущих мутантную форму гена, кодирующего *Mn-СОД*, супероксидный анион-радикал не утилизируется с достаточной эффективностью. Его избыток повреждает структуру I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также окисляет железо-серные кластеры в их составе. Эти явления лежат в основе дисфункций не только дыхательной цепи, но и цикла трикарбоновых кислот.

МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Известно более 20 типов окисленных форм молекул ДНК. Оказалось, что чувствительность ДНК к окислительному повреждению зависит от того, образует ли ДНК комплекс с гистонами или является индивидуальной (свободной) молекулой. Двойная спираль ДНК, например, более устойчива к окислению, чем её одиночная цепь. Повреждения молекулы ДНК могут быть вызваны различными причинами, включая внешние факторы, такие как ионизирующая радиация и химические воздействия, а также эндогенные факторы: АФК и СР различного происхождения. Характерным следствием воздействия ионизирующей радиации на молекулу ДНК является её разрыв. Ведущую роль в этом явлении играют гидроксильные радикалы (*ОН), которые в данных условиях в большом количестве образуются в организме в результате радиолитического распада воды. Разрыв молекулы ДНК может происходить также в результате воздействия супероксидного анион-радикала кислорода. Полагают, что ведущим фактором при этом, в конечном итоге, все же являются *ОН, которые легко образуются из супероксида

и напрямую взаимодействуют с азотистыми основаниями. Фрагментация ДНК происходит также под действием эндонуклеаз, которые существенно активируются в результате повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , которая всегда наблюдается при окислительном стрессе.

Повреждающие эффекты избытка $\cdot\text{OH}$ при окислительном стрессе приводят не только к разрывам молекулы ДНК, но и к окислительной модификации пуриновых и пиримидиновых оснований в составе нуклеотидов. Азотистые основания, как важнейшие компоненты молекулы ДНК, по убывающей чувствительности к повреждающему действию радикалов $\cdot\text{OH}$, можно расположить в ряду: гуанин, аденин, затем тимин и цитозин и на последнем месте – остаток дезоксирибозы. В условиях окислительного стресса в молекуле ДНК происходит образование радикала в положении С-4 дезоксирибозы с последующим разрывом полинуклеотидной цепи. В результате окислительной модификации азотистых оснований образуется тимингликоль и 5-(оксиметил)урацил из тимина. Возможно также образование димеров тимина или его гидроперекиси. Последняя разлагается до своего радикала, который способен взаимодействовать с новой молекулой азотистого основания. В результате этих явлений нарушается принцип комплементарности азотистых оснований в молекуле ДНК.

Радикалы, образующиеся при свободнорадикальном окислении липидов, также участвуют в повреждении молекулы ДНК. Например, показано, что 13-гидроперекись линолеиновой кислоты способна разъединять двойную спираль ДНК.

Практически любые типы повреждения ДНК под влиянием гиперактивированных процессов СРО неизбежно приводят к нарушению структуры хромосом и хромосомным aberrациям.

Картина была бы неполной, если бы в этом разделе мы не упомянули окислительные повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК). мтДНК содержит всего 37 из 3000 генов, которые кодируют белки, необходимые для функционирования митохондрий. Установлено, что мтДНК, в гораздо меньшей степени устойчива к окислительной модификации по сравнению с ядерной ДНК. Это обусловлено следующими причинами:

- мтДНК располагается в матриксе митохондрий в непосредственной близости к ферментным комплексам дыхательной цепи, которые даже в физиологических условиях являются источниками АФК. Это

означает, что даже в норме у мтДНК, риск подвергнуться окислительной модификации намного выше, чем у ядерной ДНК.

- В митохондриях ферменты репарации повреждений мтДНК значительно менее активны, чем в ядре клетки.

- мтДНК, в отличие от ядерной, не защищена гистонами.

Очевидно, что в условиях окислительного стресса вероятность повреждения мтДНК будет только увеличиваться.

Окислительное повреждение мтДНК приводит к синтезу функционально неполноценных субъединиц, входящих в состав комплексов дыхательной цепи митохондрий, вследствие чего нарушается энергообеспечение клеток. В результате, в первую очередь страдают клетки, постоянно требующие высоких энергозатрат: клетки центральной нервной системы и миоциты. «Митохондриальным болезням» посвящена предыдущая **Лекция 2** (С. 60–87).

Таким образом, при окислительном стрессе страдают структуры и функции не только важнейших биомолекул, но и клеточных мембран. В случае, когда реакции свободнорадикального окисления в клетке лишаются ограничивающего контроля системой антиоксидантной защиты, масштабы нарушения процессов жизнедеятельности приводят к гибели клетки. При окислительном стрессе механизм летальных для клетки явлений носит неспецифический и универсальный характер. Схематично этот механизм представлен на рисунке 41.

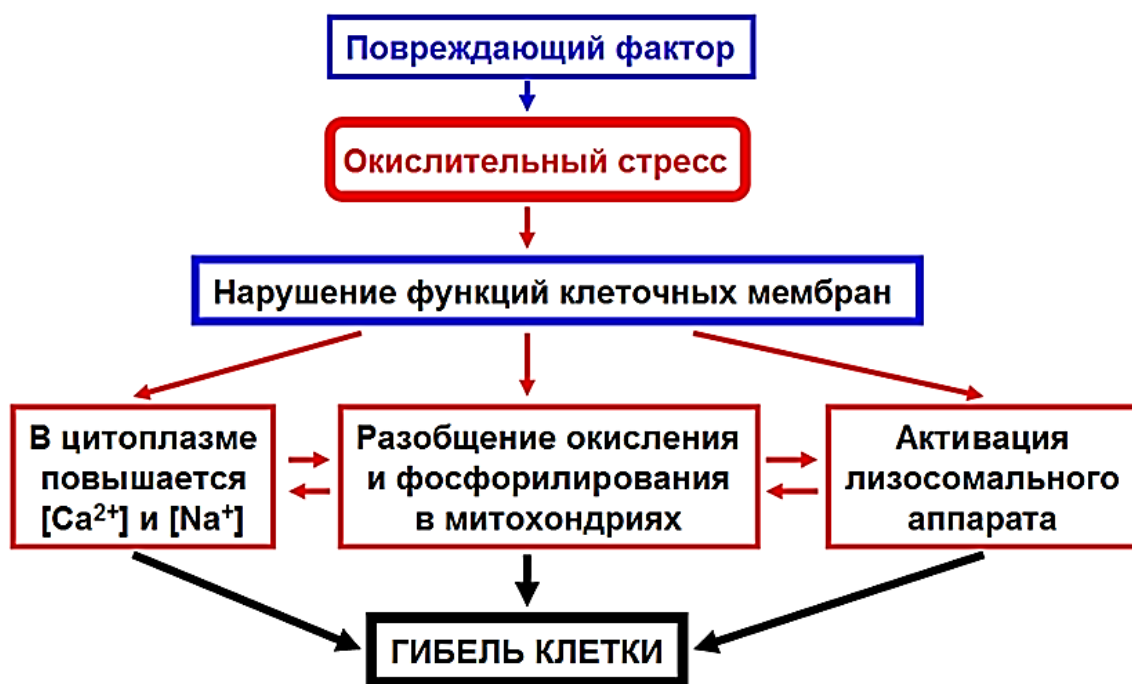


Рис. 41. Универсальный механизм гибели клетки, вызываемой окислительным стрессом (Владимиров Ю.А., 1991)

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Атеросклероз – хроническое заболевание артерий, которое характеризуется накоплением в подэндотелиальном пространстве холестерина и других липидов, что завершается образованием атеросклеротических бляшек. Последующее разрастание в них соединительной ткани (склероз), и кальциноз стенки сосуда приводят к деформации и сужению его просвета (вплоть до облитерации) и, как следствие, к нарушению кровоснабжения различных органов. Если патологический процесс охватывает коронарные сосуды, то клиническим проявлением атеросклероза становится ишемическая болезнь сердца. Этиопатогенез атеросклероза имеет сложную и многофакторную природу. Ниже изложены современные представления о роли СРО липидов в возникновении и развитии атеросклероза.

АКТИВАЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Ещё в 60-е годы прошлого столетия было доказано, что в крови больных атеросклерозом повышается концентрация гидроперекисей липидов, а также одного из продуктов СРО липидов – малонового диальдегида (МДА). Обнаружена линейная корреляция между концентрациями МДА и триацилглицеролов в сыворотке крови. Кроме того, оказалось, что не только содержание общего холестерина в крови больных атеросклерозом растёт линейно с увеличением концентрации МДА, но и то, что содержание МДА в стенке артерий линейно нарастает с увеличением концентрации МДА в сыворотке крови. Важным для понимания роли процессов СРО липидов в патогенезе атеросклероза стали данные, указавшие на то, что с ростом содержания МДА в частицах сывороточных липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) увеличивается степень атеросклеротического поражения артерий.

С другой стороны, было показано, что развитие атеросклероза сопровождается уменьшением активности антиоксидантных ферментов, играющих ключевые роли в защите липопротеинов сыворотки и стенок сосудов от повреждающего действия продуктов СРО липидов. В крови больных обнаружено снижение активности *глутатионпероксидазы (ГПО)* и *СОД*. В стенках кровеносных сосудов (в интима и медиа) показано ингибирование *каталазы*, *глутатионредуктазы (ГР)*, *ГПО* и *СОД*.

Известно, что повышение концентрации в сыворотке крови холестерина, транспортируемого в составе ЛПОНП и, особенно в ЛПНП, является важнейшим фактором риска атеросклероза. Биохимическая суть этой закономерности очевидна, поскольку холестерол, накапливающийся в стенках сосудов при атеросклерозе, доставляется туда с помощью ЛПНП, которые уже подверглись окислительной модификации в результате активации реакций СРО – трансформировались в «окисленные» липопротеины (оксипЛПНП). Этот феномен был доказан исследованиями, которые продемонстрировали, что по мере нарастания количества ЛПНП (и переносимого ими холестерина) в крови больных атеросклерозом в липопротеинах активировались процессы СРО, о чем свидетельствовало существенное повышение содержания в частицах продуктов СРО липидов – МДА и диеновых конъюгатов. Кроме того, оксипЛПНП были выделены из атеросклеротических бляшек.

По поводу того, где и каким образом ЛПОНП и ЛПНП в организме больных атеросклерозом могут подвергаться окислительной модификации с образованием оксипЛПОНП и оксипЛПНП, существуют следующие данные:

1. Печень секретирует в кровь уже окисленные липопротеины. Доказано, что при гиперхолестеринемии (обуславливает повышение внутриклеточного содержания холестерина) в микросомах гепатоцитов существенно активируются реакции НАДФН-зависимого СРО. Они сопровождаются окислением холестерина и фосфолипидов, которые затем включаются в состав образующихся в гепатоцитах липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и уже в модифицированной форме (оксипЛПОНП) секретироваться в кровь. В кровяном русле оксипЛПОНП трансформируются в оксипЛПНП.

2. ЛПОНП и ЛПНП могут подвергаться окислительной модификации непосредственно в кровяном русле под действием продуктов СРО, выделяемых при активации тромбоцитов. Известно, что тромбоциты больных атеросклерозом обладают повышенной агрегируемостью. По-видимому, в сыворотке больных при образовании агрегатов тромбоцитов выделяются значительные количества продуктов СРО, которые воздействуют на ЛПОНП и ЛПНП.

3. Активированные нейтрофилы, макрофаги и моноциты крови выделяют АФК, которые способны окислять сывороточные липопротеины непосредственно в кровотоке.

4. Окислительная модификация ЛПОНП и ЛПНП происходит с участием эндотелиальных и гладкомышечных клетках стенок сосудов. У больных атеросклерозом в этих клетках под влиянием провоспалительных цитокинов и ряда других соединений, например, ангиотензина II, существенно активируются изоформа *НАДФН-оксидазы* (*NOX4*) и эндотелиальная *синтаза оксида азота* (*eNOS*). Вследствие этого в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов существенно повышаются концентрации супероксидного анион-радикала кислорода и NO, которые легко взаимодействуют с образованием ещё более сильного окислителя – пероксинитрита (раздел «**Представление об окислительном стрессе**», С. 88). Эти цитотоксичные продукты не только активно участвуют в индукции окислительного стресса, лежащего в основе дисфункции эндотелия сосудов, но и в окислительной модификации ЛПОНП и ЛПНП.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НАРУШАЕТ ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРОЛА В ОРГАНИЗМЕ

Эритроциты – единственный тип клеток организма человека и животных, которые лишены ферментов синтеза холестерина *de novo*. Кроме того, на мембранах эритроцитов отсутствуют рецепторы для ЛПНП, которые позволяют обеспечивать клетку холестерином путем рецептор-опосредованного эндоцитоза частиц ЛПНП. Таким образом, единственный путь доставки холестерина в эритроциты – прямой перенос его молекул в мембрану клеток из сывороточных ЛПОНП и ЛПНП. Установлено, что в оксипЛНП нарушаются белок-липидные взаимодействия на поверхности частиц: уменьшается микровязкость липидного монослоя при одновременном увеличении его полярности. Эти явления способствуют существенному облегчению контакта оксипЛНП с липидными областями мембраны и стимулируют высвобождение молекул холестерина из оксипЛНП. Иными словами, при атеросклерозе, у оксипЛНП значительно усиливаются холестерол-донорные или атерогенные свойства. Это способствует перегрузке мембран холестерином, что приводит к дисфункции эритроцитов: снижается активность Na,K-АТФ-азы, уменьшается проницаемость мембраны для воды и других соединений, снижается деформируемость эритроцитов, растёт склонность к агрегации.

В организме больных атеросклерозом окислительной модификации подвергаются также липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

ЛПВП тоже образуются в гепатоцитах и секретируются в кровь в форме насцентных (незрелых) частиц. Полагают, что окислительная модификация ЛПВП может происходить как в гепатоцитах, так и на стадии их «созревания» в кровотоке. В норме ЛПВП опосредуют «антиатерогенный поток» холестерина по кровяному руслу. Антиатерогенные свойства ЛПВП обусловлены их способностью акцептировать избыточный холестерин при взаимодействии с мембранами клеток сосудистой стенки, ЛПНП и ЛПОНП с последующей доставкой холестерина в печень и выведении излишков холестерина из организма. У оксипЛПВП увеличивается поверхностный отрицательный заряд, что затрудняет их взаимодействие с отрицательно заряженными гликозаминогликанами клеточных мембран и подавляет их способность акцептировать холестерин с поверхности клеток и липопротеинов сыворотки. В итоге холестерин-акцепторные, или антиатерогенные свойства, у оксипЛПВП существенно ослабевают.

Окислительная модификация сывороточных липопротеинов всех классов является важным фактором формирования и усугубления гиперхолестеролемии. ЛПНП и ЛПВП поглощаются гепатоцитами посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза с помощью рецепторов для ЛПНП – ЛПНП-рецепторов. Рецептор распознаёт ЛПНП по присутствующему в их составе апо-В, в то время как ЛПВП – по апо-Е. Сродство ЛПНП-рецептора к апо-Е существенно выше. Окислительная модификация липопротеинов сопровождается нарушением нативной конформации их апопротеинов, что приводит к снижению сродства окисленных липопротеинов к ЛПНП-рецепторам. В итоге эффективность элиминации оксипЛПНП и оксипЛПВП печенью из кровотока снижается: частицы циркулируют в кровяном русле значительно дольше, чем в норме. Иными словами, снижение эффективности рецептор-опосредованного эндоцитоза в этих условиях способствует усилению атерогенного потока холестерина по кровяному руслу и ослабляет антиатерогенный поток.

РОЛЬ ОКИСЛЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИСФУНКЦИЙ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ

Формирование очагового атеросклеротического поражения сосудов протекает в виде нескольких последовательных стадий. В общем виде их можно представить следующим образом:

Стадия 1. Одним из основных факторов инициации атерогенеза является дисфункция эндотелия. Все начинается с разрыхления и исчезновения гликокаликса – защитного полисахаридного слоя на поверхности эндотелиоцитов. Клетки набухают, в их мембранах появляется патологическая проницаемость, плотные контакты между эндотелиоцитами разрушаются, что знаменует потерю барьерных свойств эндотелия. Уже на этой стадии процесса в эндотелиоцитах формируется окислительный стресс. Известно, что клетки эндотелия способны поглощать сывороточные ЛПНП двумя путями:

- рецептор-опосредованным эндоцитозом с последующей их деградацией в лизосомах
- путём транцитоза, когда эндотелиоциты «пропускают» ЛПНП через себя.

В условиях атерогенеза особое значение приобретает второй путь поглощения частиц, поскольку под действием продуктов реакций СРО внутри эндотелиоцитов происходит массивная окислительная модификация той доли ЛПОНП и ЛПНП, которые ещё не успели подвергнуться ей в кровотоке.

Стадия 2. Ранним проявлением дисфункции эндотелия является увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии, что облегчает активацию моноцитов и их прилипание к поверхности клеток эндотелия. Далее моноциты мигрируют через «бреши» между эндотелиоцитами, образующиеся вследствие ослабления межклеточных связей, и проникают в субэндотелиальное пространство, где превращаются в резидентные (тканевые) макрофаги. Роль хемоаттрактантов для моноцитов, в том числе, играют продукты процессов СРО в составе окси-ЛПНП и оксиЛПОНП, которые продолжают поступать в субэндотелий со всё большей интенсивностью. В этих условиях преобладающими частицами являются оксиЛПНП. Окисленные липопroteины начинают поглощаться макрофагами, которые обладают особым типом рецепторов, распознающих и связывающих именно окисленные частицы. Это, так называемые, «скавенджер»-рецепторы (рецепторы-мусорщики, от *англ.* scavenger – мусорщик или сборщик отходов), кото-

рые обеспечивают поглощение оксЛПНП в 9 раз быстрее, чем немодифицированных ЛПНП. В результате в макрофагах существенно возрастает содержание свободного холестерина и его эфиров. Критическая «перегрузка» макрофагов вызывает их гибель и трансформацию в пенистые клетки, которые становятся основой для формирования атеросклеротической бляшки.

Стадия 3. В интиму мигрируют гладкомышечные клетки, которые начинают активно пролиферировать. Меняется их фенотип, что выражается в появлении способности синтезировать и выделять в межклеточное пространство эластин, коллаген и протеогликаны. Эти явления усугубляют деструкцию эндотелия. В дополнение к этому возникает адгезия тромбоцитов к стенке сосудов. Процесс нарастает по мере увеличения числа разрушенных и отслоившихся эндотелиоцитов. Причина состоит в том, что под влиянием продуктов СРО липидов, источниками которых являются накапливающиеся оксЛПНП, в клетках эндотелия происходит ингибирование *простагландинсинтетазы*. Фермент катализирует синтез простагландина I₂, который в норме препятствует адгезии тромбоцитов на стенках сосудов. Далее на этих участках патологически измененной стенки сосуда формируется атеросклеротическая бляшка.

Таким образом, липопротеины, подвергнутые окислительной модификации, играют ключевые роли на каждой из стадий патогенеза дисфункций эндотелия сосудов.

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 И 2 ТИПА

Сахарный диабет (СД) представляет собой гетерогенную группу хронических заболеваний, вызывающих глубокие нарушения обмена веществ в организме. Одним из значимых и объединяющих признаков, является хроническое повышение концентрации глюкозы в крови больных - гипергликемия. Причинами этого явления могут быть:

- прекращение синтеза и секреции инсулина панкреатическими β-клетками (абсолютная инсулиновая недостаточность, СД 1 типа);
- неспособность тканей организма обеспечить полноценный метаболический ответ на регуляторные сигналы инсулина (инсулинорезистентность клеток, СД 2 типа).

Инсулин – главный гормон, регулирующий гомеостаз глюкозы в организме. Кроме того, инсулин оказывает множество других регуляторных эффектов, обеспечивающих, в том числе, адекватное протекание ряда жизненно важных процессов.

Выделяют три основных типа СД: сахарный диабет 1 типа (СД 1Т), сахарный диабет 2 типа (СД 2Т) и гестационный диабет.

Гестационный сахарный диабет, или диабет беременных женщин, формируется, чаще всего, во второй половине беременности и выражается в увеличении концентрации глюкозы в крови. Такой тип диабета встречается примерно у 10 % беременных и проходит после родов без лечения. Во время беременности в организме женщины происходит сложная эндокринная перестройка. В частности, увеличивается образование половых гормонов и кортизола, которые подавляют эффекты инсулина. Установлено, что гипергликемия более негативно влияет на здоровье плода, чем будущей матери. По этой причине важна своевременная диагностика и медикаментозная коррекция нарушений метаболизма на этом этапе беременности.

СД 1 и 2 типов относят к социально значимым заболеваниям, поскольку они широко распространены по всему миру и сопровождаются формированием множества тяжелых осложнений, которые становятся причиной ранней инвалидизации населения и сокращению продолжительности жизни. Эксперты Всемирной организации здравоохранения прогнозируют на ближайшее десятилетие дальнейший рост числа больных обоими типами СД.

Каждый из двух типов СД имеют специфическую и многофакторную этиологию. Несмотря на десятилетия изучения причин СД, до сих пор ряд аспектов этиологии остаются не выясненными. Несколько лучше обстоит вопрос с пониманием патогенетических звеньев этих заболеваний. В таблице 3 представлены этиопатогенетические отличия между СД 1 и 2 типа.

Таблица 3

Основные отличия этиопатогенеза между СД 1 и 2 типа

	СД, тип 1 инсулинзависимый, ювенальный, юношеский	СД, тип 2 инсулинонезависимый
Распространенность, % доля от всех случаев сахарного диабета	5–10 %	90–95 %
Возраст начала заболевания	Детско-юношеский период жизни. Обычно не старше 30–35 лет	От 40 лет и старше

Характер начала заболевания	Острое начало	Клинически проявляется постепенно, в течение нескольких лет
Риск наследственной передачи заболевания	Около 30–50%	Около 90%
Ведущий этиологический фактор	Аутоиммунное заболевание. Гибель до 90% β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы в результате действия антиел против собственных β -клеток	Системная инсулинорезистентность. Уменьшение чувствительности клеток организма к эффектам инсулина. Медленно прогрессирующая дисфункция β -клеток. На стадии декомпенсации может погибнуть до 50% β -клеток
Роль внешних факторов	Наибольшую провоцирующую роль играют вирусные заболевания и различные интоксикации	Избыточное, несбалансированное питание и низкая физическая активность, приводящие к алиментарному ожирению.
Синтез и секреция инсулина β -клетками	Практически полностью прекращается. Абсолютная инсулиновая недостаточность.	Долгое время не страдают. На начальной стадии заболевания секреция гормона компенсаторно усиливается. На стадии декомпенсации секреция инсулина снижается. Относительная инсулиновая недостаточность.
Масса тела	Норма или дефицит	Избыточная масса, обусловленная алиментарным ожирением.
Лечение	Обязательная гормонзамещающая терапия – ежедневные инъекции инсулина. Излечение невозможно.	Регулярный приём препаратов, корректирующих чувствительность тканей к инсулину, специфическая диета, лечебная физкультура. На стадии декомпенсации заболевания может потребоваться введение небольших доз инсулина. Возможна ремиссия заболевания.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС – ОБЩЕЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ЗВЕНО ПАТОГЕНЕЗА САХАРНЫХ ДИАБЕТОВ 1 И 2 ТИПА

Наряду со специфическими механизмами патогенеза для каждого из типов сахарного диабета, имеется общее звено – окислительный стресс. Различной степени дефицит сигнализации инсулином, имеющий место при обоих типах диабета, обеспечивает одно общее следствие – хроническую гипергликемию. В рамках современной парадигмы патогенеза СД 1 и 2 типа, именно гипергликемия служит «триггером», то есть инициирующим фактором, который запускает окислительный стресс в организме больных и поддерживает его в дальнейшем, усугубляя тяжесть заболевания. Именно в этой связи в современной диабетологии появился новый термин «глюкотоксичность». Если механизмы гипергликемии в каждом из двух типов СД имеют вполне определенную специфику, то окислительный стресс – явление неспецифической природы. Он обеспечивает универсальные механизмы патогенеза обоих типов сахарного диабета.

Учитывая тему лекции, мы ограничимся рассмотрением только тех биохимических механизмов, которые ответственны за активацию окислительного стресса при сахарном диабете.

Инсулин – главный анаболический гормон организма человека и животных, в том числе, стимулирующий создание энергетических запасов. Гормон оказывает множество регуляторных эффектов практически на все стороны клеточного метаболизма. Глюкоза является одним из основных энергетических субстратов, в котором в различной степени нуждаются все типы клеток организма. При этом, глюкоза критически важна для биоэнергетики клеток центральной нервной системы (ЦНС) и эритроцитов. В мембранах клеток, образующих гематоэнцефалический барьер, отсутствуют белки-транспортеры длинноцепочечных жирных кислот, что исключает участие окисления липидов в синтезе АТФ в нейронах и нейроглии. Зрелые эритроциты лишены митохондрий, в связи с чем единственным источником АТФ для них является гликолиз. Помимо этого, лишь в строго определённых типах клеток транспорт глюкозы из крови зависит от инсулина. Это определяется присутствием в разных типах клеток разных изоформ глюкозного транспортера (ГЛЮТ).

Так, **независимый от инсулина транспорт глюкозы** в клетки осуществляют:

- ГЛЮТ 1 – эритроциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, в том числе, эндотелиоциты гематоэнцефалического барьера;

- ГЛЮТ 2 – гепатоциты и β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы. Обладает относительно низкой аффинностью по сравнению с ГЛЮТ 1, что позволяет ГЛЮТ 2, помимо глюкозы, транспортировать фруктозу и галактозу.

Эти транспортеры постоянно присутствуют в клеточной мембране и опосредуют облегченную диффузию глюкозы.

Инсулин-регулируемый транспорт глюкозы (зависимый от инсулина) опосредует ГЛЮТ 4, который функционирует в клетках скелетных мышц, миокарде и в адипоцитах (клетках белой жировой ткани). При базальной концентрации инсулина в крови мембрана вышеперечисленных типов клеток остаётся непроницаема для глюкозы, поскольку ГЛЮТ 4 находятся в цитоплазме клеток в составе специфических везикул. Повышение концентрации инсулина в ответ на приём пищи, приводит к взаимодействию гормона с рецепторами на поверхности адипоцитов и миоцитов. Активация рецептора инсулина запускает внутриклеточный сигнальный путь, который, в конечном итоге, активирует белок AS160, что и обеспечивает перемещение ГЛЮТ 4 содержащих везикул из цитоплазмы в клеточную мембрану и встраивание в неё глюкозных транспортеров. Облегченная диффузия глюкозы становится возможной и продолжается до тех пор, пока концентрация инсулина в крови не снизится до базальных значений. При этом происходит диссоциация комплекса инсулин-рецептор, внутриклеточный сигнальный путь инактивируется, что заставляет ГЛЮТ 4 покидать клеточную мембрану, включаться в состав везикул и перемещаться в цитоплазму. Клеточная мембрана вновь становится непроницаема для глюкозы.

Скелетные мышцы и жировая ткань обладают высокой метаболической активностью, которая требует больших энергозатрат, а их суммарная масса составляет у здорового взрослого человека в среднем 60–65% от массы тела. Обе ткани получают глюкозу посредством зависимо-го от инсулина транспорта (ГЛЮТ 4). Таким образом, в условиях дефицита сигнализации инсулином, гипергликемия формируется, главным образом, за счет нарушения извлечения глюкозы из кровотока этими двумя тканями.

Как абсолютная (СД 1Т), так и относительная недостаточность инсулина (СД 2Т) запускает множественные нарушения всех аспектов

тканевого метаболизма. Они становятся важными факторами патогенеза диабета и усугубления состояния организма больного, что приводит ко множеству тяжелых осложнений, таких, как: атеросклероз, артериальная гипертензия, ретинопатия, почечная недостаточность и многих других.

РОЛЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ В ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 И 2 ТИПА

Выше было отмечено, что общим следствием дефицита сигнализации инсулином при обоих типах СД является хроническая гипергликемия. Таким образом, кровь с высокой концентрацией глюкозы в первую очередь взаимодействует со стенкой сосудов, вызывая дисфункции эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток. Всё начинается с перегрузки этих клеток глюкозой. Причиной состоит в том, что транспорт глюкозы из крови в цитоплазму этих клеток опосредуется инсулин независимым ГЛЮТ 1. Поступление избыточного количества глюкозы становится пусковым фактором, который по нескольким различным, но действующим одновременно механизмам, индуцирует окислительный стресс в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках. Можно выделить ряд основных процессов, участвующих, в конечном итоге, в индукции окислительного стресса в клетках сосудистой стенки:

1. Хроническая гипергликемия, активно нарушающая клеточный метаболизм, приводит к дисфункции митохондрий. Усиление окисления глюкозы вызывает увеличение отношения концентраций $\text{НАДН}_2/\text{НАД}^+$ в матриксе митохондрий. Это, в свою очередь, повышает образования супероксидного анион-радикала кислорода ($^*\text{O}_2^-$) на уровне убихинона и, особенно, III комплекса дыхательной цепи. В конечном итоге, эти явления приводят к подавлению биоэнергетических функций митохондрий. Аналогичные процессы происходят в сосудах поджелудочной железы. Усиленный поток АФК из сосудистой стенки ингибирует стимулируемую глюкозой секрецию инсулина β -клетками островков. Окислительный стресс в поджелудочной железе при СД 2Т вносит важный вклад в запуск апоптоза заметной части β -клеток островков Лангерганса у пациентов с декомпенсированной формой заболевания. Таким образом, при СД 2Т дисфункции митохондрий рассматривают в качестве первичного фактора, запускающего окислительный

стресс, который не только повреждает β -клетки островков поджелудочной железы, но и активно участвует в формировании резистентности к инсулину периферических тканей. Кроме того, изначально сравнительно низкая активность антиоксидантных ферментов в β -клетках, обуславливает их слабую устойчивость к цитотоксическому действию АФК.

2. Хроническая гипергликемия стимулирует неферментативное гликирование молекул различных белков и липидов с образованием гетерогенной группы химически высокоактивных соединений, которые получили название **конечные продукты гликирования (КПГ)** (advanced glycation end products). В состав этой группы продуктов входит широко известный в практике клинической биохимии гликированный гемоглобин. Гликирование происходит как в кровотоке, так и в цитоплазме эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток. КПГ обладают выраженной способностью модифицировать биомолекулы, что приводит к нарушению их биологических функций. КПГ, образующиеся внутри клеток, способны выходить в межклеточное пространство. Там экзо- и эндогенные КПГ накапливаются в существенных количествах, активно участвуя в модификации ЛПНП, что впоследствии существенно облегчает их окислительную модификацию, а также взаимодействуют с рецепторами КПГ (РКПГ) на поверхности эндотелиоцитов, гладкомышечных клеток, мононуклеарных фагоцитов и других клеток. Активация РКПГ участвует в активации *НДФН-оксидазы-1 (NOX1)*, что способствует дополнительному образованию АФК в клетках и усугублению тяжести окислительного стресса.

3. Хроническая гипергликемия стимулирует окисление глюкозы в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках, что приводит к повышению внутриклеточного содержания глицероальдегид-3-фосфата. Этому способствует ингибирование активности *глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы* повышенными концентрациями АФК в цитоплазме. Увеличение доступности глицероальдегид-3-фосфата стимулирует синтез *de novo* 1,2-диацилглицерола (1,2-ДАГ). Установлено, что повышение внутриклеточного содержания 1,2-ДАГ приводит к активации девяти из пятнадцати изоформ *протеинкиназы C (ПКС)*. В свою очередь, ПКС активирует *NOX1*. Таким образом, хроническая гипергликемия способствует усилению образования АФК внутри клеток, в результате поддержания высокой активности *NOX1*. Основными активаторами этой изоформы *НАДФН-оксидазы* являются КПГ, действующие посредством РКПГ, и *ПКС* (*ПКС-зависимая активация NOX1*).

4. Хроническая гипергликемия существенно повышает внутриклеточную концентрацию глюкозы в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках. В результате в клетках активируется **полиоловый метаболический путь**, в котором глюкоза сначала восстанавливается до сорбитола, а затем сорбитол конвертируется во фруктозу (рис. 42).

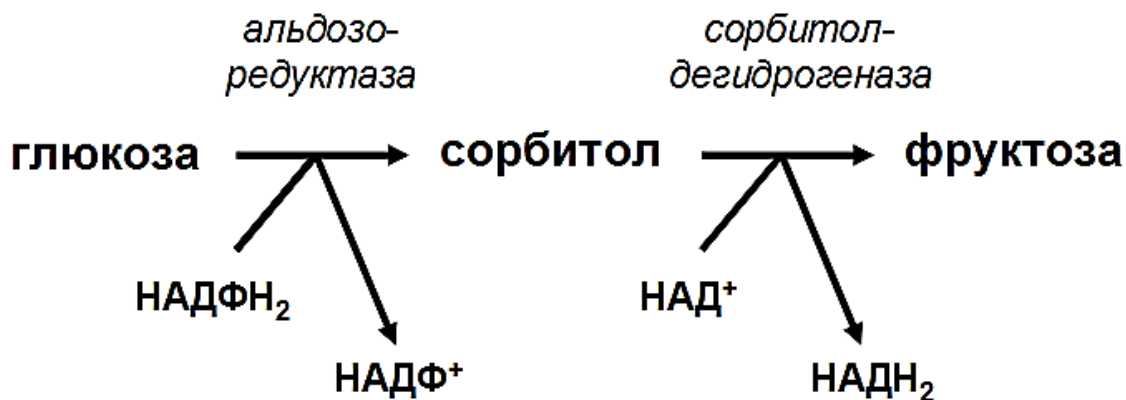


Рис. 42. Схема полиолового метаболического пути

На рисунке 42 показаны три механизма участия активированного хронической гипергликемией полиолового пути в индукции окислительного стресса:

- Высокая активность *альдозоредуктазы* существенно снижает концентрацию НАДФН, который необходим для функционирования *глутатионредуктазы*. Этот фермент играет ключевую роль в процессе регенерации восстановленного глутатиона из его окисленной формы ($GSSG \rightarrow 2GSH$). Восстановленный глутатион является главным элементом антиоксидантной системы клетки и её редокс «буфера». В условиях гипергликемии до 30% внутриклеточной глюкозы утилизируется в полиоловом пути. В результате значительно уменьшается внутриклеточное содержание НАДФН и, как следствие, снижается концентрация восстановленного глутатиона. Способность клетки противостоять действию оксидантов существенно ослабевает.

- В процессе окисления сорбитола до фруктозы кофактор *дегидрогеназы* ($НАД^+$) восстанавливается. Повышенные количества НАДН $Н^+$ начинают окисляться в дыхательной цепи митохондрий, что приводит к усилению образования ею супероксидного анион-радикала кислорода.

- Активация полиолового пути приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации фруктозы в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках. Оказалось, что фруктоза и её метаболит

фруктозо-6-фосфат обладают более высокой гликирующей активностью, чем глюкоза.

Таким образом, активация полиолового метаболического пути создает в клетке ещё более благоприятные условия для образования повышенного количества КПП. Эти продукты выходят в межклеточное пространство, активируют РКПП на мембранах других клеток, что способствует формированию в них окислительного стресса. Таким образом, с некоторыми оговорками, можно утверждать, что «первичным локусом» окислительного стресса при обоих типах СД являются клетки сосудистого русла (эндотелиоциты и гладкомышечные клетки), которые вынуждены первыми реагировать на хроническую гипергликемию. Из этих клеток АФК и другие оксиданты поступают в кровь, способствуя формированию системного окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ослабление функциональной активности системы антиоксидантной защиты клетки любого генеза, приводит к формированию окислительного стресса, в рамках которого цитотоксические эффекты одновременно оказывают АФК и АФОА. Одновременно с этим, в силу повышения концентрации соединений – оксидантов, в клетках формируется сдвиг редокс гомеостаза, что нарушает ход множество метаболических процессов, в том числе тех, которые обеспечивают жизнедеятельность клеток. Этому противостоит многокомпонентная защитная система, стабилизирующая редокс гомеостаз. В этой системе ведущую роль играет система глутатиона: восстановленный глутатион и фермент *глутатионредуктаза*, благодаря которому происходит восстановление окисленного глутатиона.

При окислительном стрессе повреждающее действие АФК, АФОА и различных СР в живых системах направлено на все основные клеточные мишени: белки, нуклеиновые кислоты, мембранные липиды и липидный компонент сывороточных липопротеинов.

Окислительный стресс является значимым патогенетическим фактором множества тяжелых и социально значимых заболеваний, в первую очередь, таких, как атеросклероз и сахарный диабет 1 и 2 типа.

При атеросклерозе, гиперхолестеролемию тесно сопряжена с повышением содержания продуктов СРО липидов в клетках стенок артерий и появлением в кровяном русле окисленных липопротеиновых частиц: оксЛПОНП, оксЛПНП и оксЛПВП. Активная окислительная модификация липопротеинов протекает в печени, в кровяном русле (под

влиянием АФК, выделяемых активированными нейтрофилами, макрофагами и моноцитами), а также с непосредственным участием претерпевших существенные дисфункции эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток артерий. Окисленные липопротеины проникают в субэндотелиальный слой артериальной стенки через «бреши» в межклеточных контактах эндотелиоцитов, поглощаются там макрофагами, которые, не выдерживая повышенной нагрузки, гибнут с образованием пенистых клеток, дающих впоследствии основу для формирования атеросклеротических бляшек и сужению сосудистого просвета. Помимо этого, окислительный стресс нарушает нормальный транспорт холестерина по сосудистому руслу, что способствует усугублению тяжести патологического процесса.

Сахарные диабеты 1 и 2 типов имеют разную этиологию, но у этих заболеваний есть общий неспецифический патогенетический фактор – окислительный стресс. Общим следствием дефицита сигнализации инсулином является хроническая гипергликемия. При обоих заболеваниях первичным локусом формирования окислительного стресса, по-видимому, являются эндотелиоциты и гладкомышечные клетки артерий, которые первыми начинают испытывать «перегрузку» глюкозой в силу того, что у них поглощение глюкозы из крови опосредуется независимым от инсулина транспортером ГЛЮТ 1. Существенное повышение внутриклеточной концентрации глюкозы в этих клетках, обеспечивает индукцию нескольких различных метаболических сдвигов, которые, в конечном итоге, инициируют и усиливают окислительный стресс.

Лекция 4

ПАТОХИМИЯ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДА

В человеческом организме моноциты составляют 3–11% от всей лейкоцитарной массы. Несмотря на небольшое количество, они участвуют в ряде ключевых этапов неспецифического иммунного ответа, а также оказывают опосредованное влияние на специфический иммунный ответ.

Созревание моноцита начинается под действием специфических индукторов в костном мозге на уровне общего миелоидного предшественника с последующим развитием в клетки моноцитарной линии и их выходом в периферическую кровь с дальнейшей миграцией в ткани либо депонированием в селезенке. Основным индуктором моноцитопоза является моноцитарный колониестимулирующий фактор (М-КСФ, Csf-1), в меньшей степени интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), лимфотоксин- $\alpha 1\beta 2$, fms-подобная тирозинкиназа 3 (Flt3). Формирование клеток миелоидного ряда из костномозговых предшественников и их дальнейшее функционирование происходят под контролем основного транскрипционного фактора runt related transcriptional factors 1 (RUNX1). Последний, в свою очередь, контролирует синтез гемопоэтического транскрипционного фактора PU.1 из семейства транскрипционных факторов ETS, который руководит основными процессами организации генома и транскриптома моноцитов и макрофагов в целом.

Моноциты мобилизуются из костного мозга или селезенки по механизму хемотаксиса в ответ на воздействие хемокинов и цитокинов периферической крови. Наличие на поверхности хемокинового CCR2, рецептора для главного хемоаттрактанта моноцитов (monocyte chemoattractant protein 1, MCP1), определяет способность этих клеток как выходить из костного мозга в кровеносное русло, так и проникать из циркуляции в ткань. Присутствие CCR2 на поверхности моноцитов различных субпопуляций выражено в разной степени: данный рецептор экспрессирован, в основном, на моноцитах, относящихся к классической и промежуточной субпопуляциям (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика основных субпопуляций моноцитов человека

	Классические моноциты	Промежуточные моноциты	Неклассические моноциты
Отношение фракций среди моноцитов.	85–90%	4–5%	10–15%
Основные поверхностные маркеры	CD14++CD16–	CD14++CD16+	CD14+CD16++
Дополнительные поверхностные маркеры	CCR2+, CC32++,CD64++, CD163++,CD204+, рецептор ИЛ6 (IL6R++), хемокиновые рецепторы: фрактакина (CX3CR1+), CXCR4+	CCR2+, CC32+,CD64++, CD163++,CD204+, IL6R++, хемокиновые рецепторы: фрактакина (CX3CR1++), CXCR4++	CCR2+, CC32+,CD64+, CD163+, CD204++, IL6R+, хемокиновые рецепторы: фрактакина (CX3CR1++), CXCR4+
Отличительные особенности	Высокая фагоцитарная активность, активная миграция по MCP1/MCP1-рецепторному градиенту в воспаленные ткани, высокий уровень миелопероксидазной активности и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность.	Высокий уровень экспрессии рецепторов ангиогенеза.	Высокий уровень экспрессии главного комплекса гистосовместимости 2 (HLA-DR), миграция по MCP1-независимому пути преимущественно за счет фрактакина (CX3CR1), в основном в тканях без воспаления, предположительно поддерживает целостность тканей, более вероятный предшественник дендритных клеток

Функции	Фагоцитоз; «уборка» некротического дебриса; выделение активных форм кислорода и металлопротеаз для эпителиально-мезенхимального ремоделирования; продукция провоспалительных цитокинов.	Фагоцитоз; ангиогенез; противовоспалительная активность.	Коллагенизация, заживление, противовоспалительные эффекты.
Продукция цитокинов	Высокий уровень продукции фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа, TNF α), ИЛ-1бета, MCP1 и ИЛ-6.	Низкий уровень продукции цитокинов.	Высокий уровень продукции ФНО-альфа (TNF α), ИЛ-1бета, ИЛ-6 и интерлейкина 12 (ИЛ-12).

A.S. Jaipersad (2014) предполагает активное участие CCR2-положительных клеток в процессе неоангиогенеза при формировании атеросклеротической бляшки. Известно, что миграция моноцитов обеспечивается группами генов, экспрессия которых характерна как для клеток в спокойном состоянии, так и генами, активирующимися в процессе воспаления. В экспериментах *in vitro* изменения экспрессии в процессе диапедеза затрагивали гены взаимодействия с эндотелиальными клетками: ген белка, связывающего эпидермальный фактор роста (EGFBR4), E-селектин, фибронектин-1, тканевый ростовой фактор (CTGF), васкулярную молекулу клеточной адгезии-1 (VCAM-1), эфрин A1, тромбомодулин; гены адгезии и миграции: тканевая транглутаминаза-2, фактор хемотаксиса моноцитов (CCL2, MCP-1), матриксная металлопротеиназа-1 (MMP-1), гомологичный белок семейства Ras B (rhoB); гены, обеспечивающие фагоцитоз: IL-1 β , тканевая транглутаминаза-2, липополисахарид-ассоциированный протеин-2, кавеолин-1, CD74 (гамма-цепь главного комплекса гистосовместимости II класса), CD64 (Fc-рецептор к мономерным иммуноглобулинам IgG), молекула клеточной адгезии 2 (ICAM-2). Из них экспрессия максимально выражена у CCL2 (MCP-1) и IL-3 (CCL7) – двух наиболее мощных факторов хемотаксиса моноцитов. Последний факт

свидетельствует о том, что мигрирующие клетки обладают способностью привлекать другие моноциты, так как могут секретировать хемоаттрактанты. Однако, в процессе миграции моноцитов, полученных из крови здоровых доноров, не отмечена активация генов, осуществляющих их дальнейшую дифференцировку в макрофаги или дендритные клетки. По-видимому, дифференцировка моноцитов не активируется одним процессом миграции, а требует дополнительных стимулов.

Вышедшие в периферическую кровь и циркулирующие моноциты представляют собой неоднородный пул клеток, отличающихся по своим фенотипическим и функциональным свойствам. Первые данные о гетерогенности популяции моноцитов в физиологических условиях появились в 1980-х гг. В 2010 г. международной группой экспертов, входящих в состав International Union of Immunological Societies (IUIS), при поддержке Всемирной организации здравоохранения была утверждена официальная классификация, основанная на оценке молекул CD14 (рецептора к липополисахариду бактериальной стенки) и CD16 (компонента рецепторного комплекса к IgG). Согласно классификации, были выделены три группы: $CD14^{++}CD16^{-}$ – классические, $CD14^{++}CD16^{+}$ – промежуточные и $CD14^{+}CD16^{++}$ – неклассические моноциты, каждая из которых имеет свои фенотипические и функциональные особенности. Известно, что патологический процесс, например, инфекции, сердечно-сосудистые заболевания, действие глюкокортикоидов сопровождаются изменением количественного соотношения субпопуляций моноцитов в периферической крови, что, вероятно, может служить диагностическим маркером. Результаты транскриптомного анализа разных субпопуляций моноцитов неоднозначны. Так, исследователь J. Cross выявил схожесть экспрессионного профиля классических и промежуточных моноцитов. Однако, по результатам двух других исследований, напротив, совпадают профили экспрессии генов промежуточной и неклассической субпопуляций. По мнению K.L. Wong, выявленное противоречие объясняется способностью моноцитов к пластичному переходу из одного состояния в другое, и, как следствие, лабильностью экспрессионного профиля клеток. Некоторые исследователи полагают, что клетки неклассической группы являются более зрелой стадией моноцитопоэза.

Наличие рецептора к фракталкину CX3CR1 определяет способность моноцитов поддерживать целостность эндотелия и гомеостаз сосудистой стенки в целом. CX3CR1-положительные моноциты оказы-

вают противовоспалительный эффект и осуществляют процессы заживления, CX3CR1-отрицательным клеткам отводится роль эффекторов воспалительного процесса. Одной из наиболее важных субпопуляций моноцитов при онкологических заболеваниях являются клетки, экспрессирующие рецептор ангиопоэтина 2 (моноциты Tie2+). Эти проангиогенные моноциты рекрутируются в спонтанные и индуцированные опухоли и стимулируют ангиогенез по принципу паракринной регуляции. По мнению S.B. Coffelt и соавт. (2010), моноциты Tie2+ уже в циркуляции являются препрограммированными для осуществления проангиогенных функций, что проявляется в повышенном уровне экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 (ММР9), фактора роста эндотелия сосудов альфа ((VEGF-A)), циклооксигеназы 2 (COX-2) и белков семейств Wnt (-Wnt5a). В экспериментальных моделях рака молочной железы у мышей была показана способность моноцитов Tie2+ стимулировать ангиогенез опухоли, а в опухолях молочной железы количество моноцитов Tie2+ положительно коррелировало со степенью васкуляризации злокачественного узла. В периферической крови онкологических больных моноциты Tie2+ входят в группу так называемых васкулярных лейкоцитарных клеток (VLC), которые отличаются повышенной продукцией индукторов васкуляризации группы VEGF. При раке яичника большинство клеток этой группы составляют моноциты Tie2+. Способность моноцитов Tie2+ стимулировать ангиогенез опухоли определяет их прогностическую ценность. Показано, что повышение инфильтрации опухоли Tie2+ связано с появлением метастазов рака молочной железы, а повышение количества моноцитов Tie2+ в периферической крови у больных раком молочной железы в ассоциации с повышением на них экспрессии рецептора с тирозинкиназной активностью, активируемый сигнальным белком VEGF1 (VEGFR-1) и увеличением экспрессии ангиопоэтина-2 и плацентарным фактором роста 1 (PlGF) в опухоли, отрицательно коррелировало с длительностью безрецидивной выживаемости. У больных раком почки увеличение инфильтрации опухоли моноцитами Tie2+ положительно коррелировало с размером опухоли, распространенностью процесса и выраженностью метастазирования. Повышенный уровень моноцитов Tie2+ в опухоли толстого кишечника наблюдался даже при применении анти-VEGF-препаратов в совокупности со стандартной схемой химиотерапии. Известно, что при глиобластомах инфильтрирующие моноциты Tie2+ ассоциированы с инвазивными

глиобластомами и локализуются на периферии опухоли, плотность инфильтрации предложено использовать в качестве маркера резистентности опухоли к антиангиогенной терапии. В литературе представлены разные мнения по поводу того, входят ли Tie2⁺ моноциты в субпопуляцию клеток CD14⁺ клеток. Субпопуляция моноцитов CD14⁺Tie2⁺ выявлена при раке яичников и толстой кишки. У больных колоректальным раком количество Tie2-рецепторов на моноцитах CD14⁺ статистически достоверно было выше аналогичного показателя у здоровых доноров. Однако, существует мнение, что моноциты Tie2⁺ являются отдельной популяцией клеток. Существует гипотеза о том, что моноциты, находясь в периферической крови, могут быть подвержены дистантному воздействию тех же индукторов, как показано в экспериментах *in vitro*. В ответ на воздействие они могут формировать фенотип, подобный макрофагам, поляризоваться по типу макрофагов, которые способствуют васкуляризации опухолевой ткани, образованию метастазов, иммуносупрессии, либо активировать стволовые опухолевые клетки. Связь моноцитов, циркулирующих в крови, и макрофагов, реализующих свою функцию в ткани, наиболее вероятно опосредована феноменом неспецифической иммунологической памяти. Этот механизм заключается в том, что моноциты под действием системных факторов, появляющихся в циркуляции при наличии локального воспаления, приобретают определенный эпигенетический профиль, в частности за счет механизмов метилирования, который оказывает влияние на их дальнейшую дифференцировку в очаге патологического процесса. Наиболее изучен данный феномен при контакте эффекторов неспецифического иммунитета с активаторами бактериального происхождения. Существуют данные об изменении эпигенетического статуса моноцитов при воздействии липопротеинов низкой плотности и повышенном уровне глюкозы в периферической крови. Участвует ли данный механизм в поляризации моноцитов при заболеваниях, сопровождающихся воспалением, на сегодняшний день не выяснено.

Макрофаги являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы. Многообразие функций и вовлечение в разнообразные физиологические и патологические реакции организма, в том числе в воспаление и злокачественный рост, обусловлено таким свойством клеток моноцитарно-макрофагального звена, как пластичность. Пластичность макрофагов – это способность клеток изменять свой фенотип и функциональную активность под влиянием различных факто-

ров внутренней и внешней среды, в частности, микроокружения. Пластичность макрофагов проявляется в процессе поляризации – обретения определенного функционального статуса. Изучение роли макрофагов в феномене воспаления позволило открыть два функционально противоположных состояния данной клеточной популяции M1- и M2-поляризованные макрофаги, реализующих оппозитные активности цитотоксичности и регенерации.

В основе поляризации лежит каскад молекулярных событий, начинающихся со связывания индуктора с соответствующим рецептором, с последующим внутриклеточным преобразованием сигнала через активацию молекулярных мессенджеров, цитоплазматических и ядерных, индукцией экспрессии генов, перестройкой метаболизма клетки, аранжировкой поверхностных молекул, секрецией цитокинов и, в целом, изменением функционального статуса клетки. Молекулы, вовлеченные в осуществление каждого из перечисленных этапов, являются потенциальными маркерами принадлежности макрофагов к M1- или M2-поляризации.

При воздействии провоспалительных стимулов, например, при взаимодействии интерферона гамма (IFN γ) с соответствующим рецептором IFN- γ R или липополисахарида (ЛПС) с TLR4, в макрофагах активируются IRF/STAT-канонические пути передачи сигналов. Данный каскад вовлекает следующие факторы транскрипции: NF- κ B, STAT1, STAT3, AP-1, SREBP-1 и HIF1 α , AP-1, PU.1, CCAAT/энхансер-связывающий белок α (C/EBP- α), а также регуляторный фактор интерферона 5 (IRF5), что приводит к M1-поляризации. Активация данных транскрипционных факторов запускает экспрессию таких функциональных молекул, как iNOS, COX-2, CD80, CD86 и MHC-II, и секрецию воспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 и IL-23.

Взаимодействие IL-4 и IL-13 с рецепторами IL-4/IL-13 активируют транскрипционный фактор STAT6, который, в свою очередь, запускает транскрипцию генов, типичных для поляризации M2, например, рецептора маннозы (Mrc), резистин-подобного белка α и хитины типа 3 (CHI3L3). Интересно, что STAT6 координирует и взаимодействует как с PPAR γ , так и с Крюппел-подобным фактором 4 (KLF4), членом семейства белков, которые вносят вклад в функциональную активность макрофагов. KLF4 взаимодействует со STAT6, индуцирует гены M2 (Arg-1, Mrc1, Fizz1, PPAR γ) и ингибируют гены M1 (TNF α , Cox-2, CCL5, iNOS) через секвестрацию коактиваторов, необходимых для активации NF- κ B. Ядерные рецепторы PPAR γ и PPAR δ контролируют

подмножества генов, ассоциированных с активацией M2-макрофагов и с окислительным метаболизмом. KLF2 регулирует активацию макрофагов путем ингибирования активности NF-κB/HIF-1α. IL-4 также индуцирует активность c-Myc в макрофагах человека, которая контролирует гены активации M2 (Scarb1, Alox15 и Mrc1), а также активацию STAT6 и PPARγ.

IL-10 активирует STAT3-опосредованную экспрессию генов (Il-10, TGFB1, Mrc1), связанных с M2-подобным фенотипом.

STAT-опосредованная активация макрофагов регулируется членами семейства SOCS. IL-4 и IFN-γ (последний в сочетании со стимуляцией TLR) активируют SOCS1 и SOCS3, которые, в свою очередь оказывают ингибирующее действие на STAT1 и STAT3, соответственно.

Ядерный фактор NF-κB играет важную и амбивалентную роль в M1/M2-поляризации. Несмотря на то, что активация NF-κB при взаимодействии соответствующего лиганда с TLR приводит к продукции медиаторов воспаления, связанных с M1-макрофагами, этот же ядерный фактор активирует генетическую программу, необходимую для разрешения воспаления и поляризации M2-OAM. Более того, индукция гомодимеров p50 NF-κB необходима для поляризации M2 *in vitro* и *in vivo*.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ M1/M2-МАКРОФАГОВ

В зависимости от типа поляризации макрофаги проявляют различную метаболическую активность. Активация сигнальных путей, связанных с M1-поляризацией, вызывает метаболическое перепрограммирование клеток в сторону гликолиза, пентозофосфатного пути и синтеза жирных кислот.

Главной особенностью провоспалительных макрофагов является индукция гликолиза за счет повышенной регуляции транспортера глюкозы (GLUT1), который опосредует поглощение глюкозы. Сверхэкспрессия GLUT1, члена семейства GLUT, в макрофагах связана с повышенным гликолизом и промежуточными продуктами пентозофосфатного пути, которые индуцируют продукцию активных форм кислорода (АФК) и экспрессию провоспалительных медиаторов, таких как TNFα и IL-6. GLUT в макрофагах контролируется HIF1α, который регулирует экспрессию генов, кодирующих гликолитические ферменты, а также медиаторы воспаления.

Было показано, что гликолитический фермент **пируваткиназа М2 (PKM2)** индуцирует экспрессию IL-1 β за счет активности HIF1 α . Гликолиз, опосредованный PKM2, способствует активации воспаления путем модуляции фосфорилирования за счет эукариотического фактора инициации трансляции 2 альфа-киназы 2 (EIF2AK2) в макрофагах. Активация гликолиза в М-1 макрофагах не только вырабатывает АТФ, но также поддерживает **пентозофосфатный путь (PPP)**. PPP способствует воспалительным реакциям макрофагов, генерируя аминокислоты для синтеза белка, рибозу для нуклеотидов и NADPH для производства **АФК** с помощью NADPH-оксидазы. Укороченный цикл трикарбоновых кислот рассматривается как метаболическая особенность макрофагов М1, приводящая к накоплению цитрата и сукцината. Повышенный синтез **ацетилкоэнзима А (ацетил-КоА)** из цитрата удовлетворяет биосинтетические потребности воспалительных макрофагов, включая синтез жирных кислот, липидов и простагландинов. Сукцинат связан с провоспалительной функцией макрофагов М1. Индуцированный LPS сукцинат в макрофагах усиливал продукцию IL-1 β за счет стабилизации HIF-1 α . Сукцинат может косвенно стабилизировать HIF-1 α посредством индукции АФК.

Метаболизм М2-поляризованных макрофагов характеризуется усиленным процессом окислительного фосфорилирования (OXPHOS), окислением жирных кислот, глутаминолизом, катаболизмом триптофана с высвобождением кинуренина и синтезом полиаминов. Цикл трикарбоновых кислот в М2-макрофагах интактен и обеспечивает поставку субстратов для дыхательной цепи переноса электронов. Повышенное потребление М2 макрофагами глутаминотриптофана отражает относительно высокие уровни экспрессии как переносчиков глутаминотриптофана, так и метаболических ферментов, что наблюдается (как *in vitro*, так и *in vivo*) на моделях опухолей мышей и первичных ТММ человека. Сообщается, что в *in vitro* моделях глутамат-аммиачная лигаза (GLUL) поддерживает поляризацию М2, катализируя превращение глутамата в глутамин. Таким образом, ингибирование GLUL способствует реполяризации М2-подобных макрофагов в М1-подобные, что сопровождается повышением гликолиза и образованием сукцината. Данный факт указывает на существование метаболического взаимодействия между метаболизмом глюкозы и глутаминотриптофана в регуляции функций макрофагов. Окисление жирных кислот является ключевым метаболическим процессом М-2 макрофагов. Ингибирование окисления жирных кислот обработкой этиноксидом подавляло активацию пирин-связывающего

домена-3 (NLRP3) и последующую секрецию IL-1b и IL-18 в макрофагах человека и мыши. Было показано, что окисление жирных кислот необходимо для индуцированной пальмитатом активации воспаления NLRP3, который включает митохондриальные АФК.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ M1- И M2-МАКРОФАГОВ

Поляризация макрофагов сопровождается экспрессией маркерных молекул, позволяющих классифицировать клеточные популяции по типу поляризации. Большинство маркерных молекул связано с реализуемой функцией, характерной для типа поляризации клетки.

CD68 и CD11b являются общими маркерами макрофагов. CD68 рассматривается как член семейства скавенджер-рецепторов, он значительно повышен в макрофагах, отвечающих на воспалительные стимулы. CD68 способен связывать модифицированные ЛПНП, фосфатидилсерин и апоптотические клетки, а также может быстро перемещаться между плазматической мембраной и эндосомами. CD11b регулирует клеточную адгезию и миграцию лейкоцитов, хотя миграция может происходить только в присутствии субъединицы CD18. Помимо участия в различных реакциях адгезии, CD11b является рецептором компонента C3bi, который опосредует поглощение чужеродных частиц.

К специфичным маркерам M1-макрофагов относят рецептор HLA-DR и индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS) при воспалительных процессах, а так же молекулы CD80, CD86, CD64, CD16, CD32, YKL-40 (CHI3L1). Данные маркеры выполняют различные функции. HLA-DR играет роль в представлении пептидов, полученных из внеклеточных белков, Т-клеткам. iNOS является ферментом, участвующим в продукции важного провоспалительного цитотоксического агента оксида азота (NO), который защищает хозяина от различных патогенов путем инактивации и уничтожения инфекционных агентов. CD80 и CD86 располагаются на поверхности антигенпрезентирующих клеток и отвечают за передачу сигналов Т-клеткам, когда они взаимодействуют со своими лигандами CD152 и CD28, соответственно. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) представляют собой рецепторы Fc-γ (FcγR), которые опосредуют фагоцитоз, высвобождение медиаторов воспаления и стимуляцию иммунного ответа в макрофагах. YKL-40 (CHI3L1) – белок, относящийся к семейству хитиназоподобных, усиливает ангиогенез, индуцируется интерфероном γ.

CD163 и CD206 являются основными маркерами для идентификации макрофагов M2. CD163 относится к членам семейства скавенджер-рецепторов, богатых цистеином (SRCR), для комплексов гаптоглобин-гемоглобин. Но совсем недавно было показано, что CD163 является маркером макрофагов M2 только в сочетании с фактором транскрипции CMAF, таким образом, CD163 не может считаться маркером M2 при использовании в качестве уникального маркера. CD206 или рецептор маннозы (MRC1) участвует в эндоцитозе, фагоцитозе и иммунном гомеостазе, способствуя удалению чужеродных гликопротеинов из организма. Недавние исследования показали, что высокая экспрессия скавенджер-рецептора класса А (CD204) наблюдается на M2-подобных макрофагах. CD204 специфически экспрессируется на макрофагах и действует как паттерн-распознающий рецептор, способный связываться с большим количеством лигандов.

К маркерам M2-макрофагов также относят белки: MMP-9, SIGLEC1, Stabilin-1, YKL-39, ZEB1. MARCO является скавенджер-рецептором с коллагеновой структурой, который опосредует опсонин-независимый фагоцитоз [94]. Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9) играет важную роль в функционировании иммунных клеток, является основным MMP, продуцируемым макрофагами человека. Делеция гена MMP-9 способствует привлечению эозинофилов и клеток Th2 в легкие во время воздействия аллергена. SIGLEC1 (CD169) или связывающий сиаловую кислоту иммуноглобулиноподобный лектин 1 был описан как маркер субпопуляции макрофагов, выделенной из костного мозга, лимфатических узлов, печени и селезенки. Эти клетки обладали способностью связывать эритроциты. Молекула CD169 сильно экспрессируется макрофагами, обнаруженными в подкапсульном синусе и мозговом веществе (М) лимфатических узлов и маргинальной зоне в селезенке. Stabilin-1 (RS1) общий лимфатический эндотелиальный и сосудистый эндотелиальный рецептор-1 (CLEVER-1) действует как внутриклеточный сортирующий рецептор, который направляет хитиназоподобные белки SI-CLP и YKL-39 на секреторный путь. SI-CLP и YKL-39, в свою очередь, регулируют рекрутирование моноцитов и ангиогенез. Stabilin-1 опосредует внутриклеточную сортировку и транспортировку по секреторному пути хитиназоподобных белков, связанных с воспалением и ремоделированием тканей. ZEB1 представитель семейства белков цинкового пальца, наиболее известен тем, что управляет эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT) в раковых клет-

ках, что способствует прогрессированию опухоли. Ключевым индуктором эпителиально-мезенхимального перехода в раковых клетках является транскрипционный фактор ZEB1, который экспрессируется злокачественными клетками на инвазивном фронте карциномы. ZEB1 наделяет раковые клетки проинвазивным и стволовидным фенотипом и определяет худший клинический прогноз при большинстве видов рака.

Аргиназа 1 (Arg1) и DECTIN-1 также являются фенотипическими индикаторами для выявления макрофагов M2. Arg1 - метаболический фермент, который катализирует гидролиз L-аргинина до мочевины и орнитина. Активность Arg1 в миелоидных клетках нарушает эффективный иммунитет против внутриклеточных патогенов, таких как *Mycobacterium tuberculosis* и *Toxoplasma gondii*, усугубляет рост опухоли, подавляя функцию Т-клеток, и ограничивает вызванное Т-клетками воспалительное повреждение тканей, подавляя функции эффекторных Т-клеток и способствуя активации регуляторных Т-клеток. DECTIN-1 играет важную роль в противогрибковом врожденном иммунитете. DECTIN-1 экспрессируется на фагоцитах и является специфическим рецептором для β -глюканов.

ЦИТОКИНЫ КАК МАРКЕРЫ M1 И M2-МАКРОФАГОВ

Цитокины и хемокины являются сигнальными молекулами, которые так же важны для жизнедеятельности организма, как гормоны и нейромедиаторы. Эти молекулы участвуют в регуляции различных процессов, начиная от местного и системного воспаления и заканчивая клеточной пролиферацией, хемотаксисом и восстановлением тканей. В зависимости от типа активации, макрофаги способны продуцировать различного рода сигнальные молекулы.

M1-макрофаги продуцируют ряд провоспалительных цитокинов, который включает в себя IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 и IL-23, TNF- α и IFN I типа, а также секретируют следующие хемокины: CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13 и CXCL16; CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL15, CCL11, CCL19, CCL20, CX3CL1. Хемокины, обладающие провоспалительными свойствами, продуцируются клетками в первую очередь для рекрутирования лейкоцитов в место возникновения инфекции или повреждения. Хемокины индуцируют в лейкоцитах экспрессию β 2-интегрина (LFA-1), который блокирует циркуляцию данных клеток и способствует диапедезу через эндотелий.

М2-макрофаги способны к продукции следующих цитокинов и хемокинов: IL-13, CCL1, CCL2, CCL13, CCL14, CCL17, CCL18, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26 и IL-1R, IGFR. Помимо выше перечисленного, М2-макрофаги продуцируют IL-8, хемоаттрактантный белок моноцитов-1 (MCP-1), CXCL-10, воспалительный белок макрофагов (MCP) - 1 β и CCL5, для привлечения нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов в противовоспалительном или регуляторном ответе. Противовоспалительные цитокины имеют решающее значение для координации клеточно-опосредованного иммунного ответа и играют важную роль в модуляции иммунной системы. Противовоспалительные цитокины обычно регулируют рост, активацию клеток, ремоделирование матрикса, регенерацию, ангиогенез, дифференцировку и возвращение иммунных клеток к местам инфекции с целью контроля и уничтожения внутриклеточных патогенов, включая вирусы.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ М1- МАКРОФАГОВ

Активация провоспалительных макрофагов М1 *in vitro* путем воздействия на них LPS усиливает гликолиз и подавляет OXPHOS. Хотя гликолиз менее эффективен для производства АТФ, чем OXPHOS, было высказано предположение, что переключение на процессы гликолиза играет важную роль для быстрой продукции молекул АТФ и образования промежуточных продуктов биосинтеза, необходимых для синтеза воспалительных цитокинов.

Метаболические факторы, способствующие дифференцировке М2 макрофагов

Гипоксия является важным фактором, влияющим на функциональный профиль макрофагов. В условиях гипоксии макрофаги проявляют низкую фагоцитарную способность, повышенную экспрессию CD206, CD40, а также повышенную продукцию VEGF, поддерживающую ангиогенез.

Индукцируемые гипоксией факторы HIF-1 α и HIF-2 α по-разному экспрессируются в М1- и М2-поляризованных макрофагах и регулируют индуцибельные NOS2 (М1) и аргиназу 1 (М2), соответственно.

Цитостатики как фактор поляризации макрофагов

Цитостатические агенты, используемые в терапии злокачественных новообразований, оказывают выраженное воздействие на функциональный профиль макрофагов. Направленность данного воздействия

зависит от используемого средства, его дозы, режима, а также комбинации с другими препаратами. Так доцетаксел способствовал дифференцировке первичных моноцитов в провоспалительные M1-макрофаги. Моноциты, обработанные доцетакселом, демонстрировали повышенную секрецию IL-8 и IL-1 β . Комбинация паклитаксела с низкими дозами циклофосфамида приводила к накоплению макрофагов с противоопухолевой активностью. Циклофосфамид, использованный в монорежиме, увеличивал продукцию провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-12 и снижал продукцию противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β в перитонеальных макрофагах мышей *in vivo*. Однако, применение комбинации циклофосфамида, паклитаксела и доксорубина в экспериментальных моделях рака легких (LLC1s) и метастатического рака молочной железы (MMTV-PyMT) приводило к значительному увеличению количества CD206⁺опухолеассоциированных макрофагов. После химиотерапии M2-макрофаги накапливались в васкуляризованных областях опухоли, обогащенных хемокином CXCL12, что в свою очередь вызывало реваскуляризацию и рецидивирование опухоли.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия: учебник для студентов медицинских вузов; под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 786 с.
2. Кольман, Я. Наглядная биохимия: пер с англ. / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – 469 с.
3. Литвинова, Н.А. Патогенные точечные мутации митохондриальной ДНК / Н.А. Литвинова, А.С. Воронкова, В.С. Сухоруков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. – № 2. – С. 29–34.
4. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.1. – 694 с.
5. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.2. – 636 с.
6. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.3. – 448 с.
7. Стахеева, М.Н. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии / М.Р. Патышева [и др.]. // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №18 (1). – 76–83.
8. Угольник, Т.С. Наследственные митохондриальные заболевания: учеб.-метод. пособие для студентов 3 курса медико-диагностического факультета медицинских вузов / Т.С. Угольник, И.В. Манаенкова. – Гомель, 2012. – 28 с.
9. Gifford V, Itoh Y. MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochem Soc Trans.* 2019 Jun 28;47(3):811-826. doi: 10.1042/BST20180363. Epub 2019 May 7. PMID: 31064864; PMCID: PMC6599156.
10. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development.* 2007; 134 (15): 2709–2718.
11. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:207-23. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.004. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25794647.
12. McCaw TR, Inga E, Chen H, Jaskula-Sztul R, Dudeja V, Bibb JA, Ren B, Rose JB. Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance. *Oncologist.* 2021 Apr;26(4):e608-e621. doi:

- 10.1002/onco.13627. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33284507; PMCID: PMC8018325.
13. Schauer D., P., Reiter C., Jahn N., Zajc P., Buchberger E., Bachleitner-Hofmann T., Bergmann M., Stift A., Gruenberger T., Brostjan C. Intermediate monocytes but not TIE2- expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e44450. DOI: 10.1371/journal.pone.0044450.
14. Srivastava M., Jung S., Wilhelm J., Fink L., Bühling F., Welte T., Bohle R.M., Seeger W., Lohmeyer J., Maus U.A. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J. Immunol*. 2005; 175 (3): 1884–1893. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1884
15. Thuault S, Ghossoub R, David G, Zimmermann P. A Journey on Extracellular Vesicles for Matrix Metalloproteinases: A Mechanistic Perspective. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 20;10:886381. doi: 10.3389/fcell.2022.886381. PMID: 35669514; PMCID: PMC9163832.
16. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.
17. Shi Z, Yuan S, Shi L, Li J, Ning G, Kong X, Feng S. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Prolif*. 2021 Mar;54(3):e12992. doi: 10.1111/cpr.12992. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33506613; PMCID: PMC7941236.
18. Kim C, Kim B. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*. 2018 Aug 4;10(8):1021. doi: 10.3390/nu10081021. PMID: 30081573; PMCID: PMC6115829.

Учебное издание

Людмила Викторовна Спирина,
Дмитрий Иванович Кузьменко,
Марина Николаевна Стахеева,
Гелена Валерьевна Какурина,

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ: ПАТОХИМИЯ, ДИАГНОСТИКА

ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ

В 2-х частях. Часть 2

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Гончаров С.Б.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 31.01.2023

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 8,6. Авт. л. 5,6.

Тираж 100 экз. Заказ № 4

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru