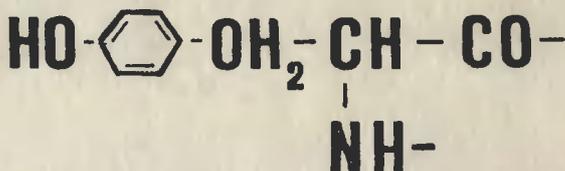


57
ХОХЛ

А. С. ХОХЛОВ
Ю. А. ОВЧИННИКОВ



химические регуляторы биологических процессов

1969 · СЕРИЯ



БИОЛОГИЯ

23

А. С. ХОХЛОВ,
член-корреспондент АН СССР,
Ю. А. ОБЧИННИКОВ,
член-корреспондент АН СССР

Химические регуляторы биологических процессов

(Беседы о биоорганической химии)

57

Хохл

57.04
X86

ХОХЛОВ Александр Степанович (1916 г. р.) в 1941 г. окончил Московский институт тонкой химической технологии, кандидат с 1949 г. и доктор химических наук с 1960 г. В 1964 г. Александр Степанович избран членом-корреспондентом АН СССР.

В 1945—1952 гг. А. С. Хохлов учился в аспирантуре, а затем работал в Институте биологической и медицинской химии, в 1952—1954 гг. — заведующий химической лабораторией Института экспериментальной и клинической онкологии, в 1954—1959 гг. — заведующий отделом химии Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков, с 1959 г. и по настоящее время — заведующий лабораторией и заместитель директора по научной части Института химии природных соединений АН СССР.

Александром Степановичем опубликовано (большой частью в соавторстве с сотрудниками) более 150 работ (книг, статей, авторских свидетельств) по различным вопросам химического и биохимического изучения биополимеров (главным образом веществ белково-пептидной природы) и биорегуляторов: антибиотиков, гормонов, синтетических и природных противоопухолевых веществ и других типов природных соединений. Он автор ряда обзоров и книг, из которых монография «Химия антибиотиков» выдержала 3 издания.

А. С. Хохлов — член бюро Отделения биохимии, биофизики и химии физиологически активных веществ АН СССР и председатель научного совета по проблемам биоорганической химии.

ОВЧИННИКОВ Юрий Анатольевич (1934 г. р.) в 1957 г. окончил химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, кандидат с 1961 г. и доктор химических наук с 1966 г. В 1968 г. Юрий Анатольевич избран членом-корреспондентом АН СССР.

В 1957—1960 гг. Овчинников — аспирант кафедры органической химии химического факультета МГУ. С 1960 г. — младший, затем старший научный сотрудник, в настоящее время — заведующий лабораторией и заместитель директора по научной части Института химии природных соединений АН СССР.

Ю. А. Овчинниковым опубликовано более 120 научных трудов по различным вопросам биоорганической химии, прежде всего химии и физико-химии пептидно-белковых веществ.

704749



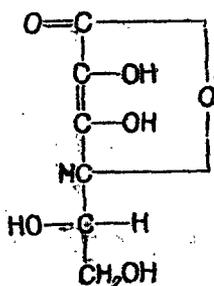
МЕЖДУ СЦИЛЛОЙ И ХАРИБДОЙ (вместо предисловия)

Повременн вскрывать причины
С угрюмой важностью лица.
Прочти хотя б до половны,
Авось — прочтешь и до конца.

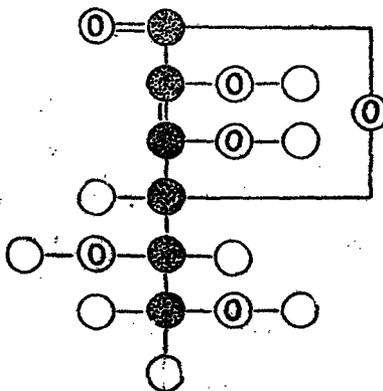
А. Твардовский

Книги пишут для того, чтобы их читали. Каждый автор надеется, что написанная им книга найдет своих читателей, которые прочтут ее, и (что греха таить!) она им понравится. Автор пытается рассказать читателям о том, что кажется ему интересным, важным, новым, что волнует его; ему хочется увлечь читателя своей областью работы, своими поисками и раздумьями. Сделать это, к сожалению, не всегда удается, особенно при рассмотрении сложных вопросов современной науки, так как здесь автора (и читателей), подобно Одиссею со спутниками, подстерегают одновременно две опасности: с одной стороны, пританцлась примитивность изложения, а с другой стороны, грозит непонятность текста. Эти опасности очень серьезны и не всегда удается удачно миновать их. Очень велики они и при рассмотрении актуальных вопросов современной биоорганической химии, где дело идет о строении и превращениях очень сложных веществ, описать которые, не используя соответствующих терминов химического языка, крайне трудно. Нам, в частности, кажется, что нельзя полностью избежать сложных химических формул, нередко отпугивающих читателя. После долгих колебаний мы остановились на обычной символике, принятой в органической химии. Мы решили, что основы этого языка (изображение атома углерода латинской буквой С, атома водорода — буквой Н, кислорода — О, азота — N, связи атомов — черточкой, двойной связи — двумя черточками и т. д.) достаточно знакомы по школьному курсу всякому читателю со средним образованием. Нам кажется, что этот язык не менее нагляден, чем изображение тех же атомов какими-нибудь вновь выдуманными или заимствованными у алхимиков значками (например, черный кружок — атом углерода, светлый кружок — атом водорода и т. д.), как это иногда делается в научно-популярных книгах

по химии. Так, изображение формулы витамина С (аскорбиновой кислоты) в обычной форме не менее наглядно, чем изо-



бражение этого же соединения, например, в таком виде:



Конечно, когда речь пойдет о сложных пространственных особенностях строения некоторых из рассматриваемых веществ, мы в очень ограниченном числе случаев будем использовать рисунки или фотографии пространственных моделей, но в большинстве случаев мы ограничимся обычными структурными формулами. Поскольку все ферменты, многие гормоны, антибиотики и другие биорегуляторы представляют собой вещества белково-пептидной природы и состоят из остатков аминокислот, мы при рассмотрении их строения будем использовать общепринятую международную символику. При этом вместо изображения группы атомов, соответствующей данному аминокислотному остатку, мы будем использовать его символ (являющийся, как правило, сокращением латинского названия аминокислоты). Для справок мы приводим в таблице 1 расшифровку всех этих обозначений.

Пользуясь этими сокращениями, можно очень наглядно

изобразить строение даже довольно сложных соединений, подчеркивая, например, отличия между двумя близкими соединениями. Так, в главе о гормонах мы будем говорить, что в организмах различных животных образуются очень сходные по действию и строению гормоны вазопрессины, отличающиеся лишь строением одной аминокислоты: у свиньи вазопрессин содержит лизин, у человека и других животных — вргинин.

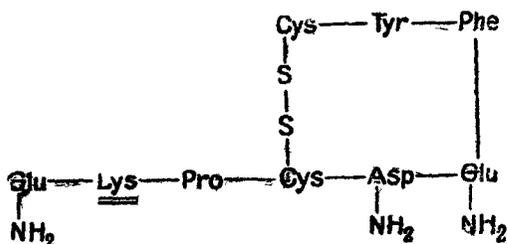
Развернутые и сокращенные формулы этих гормонов приведены ниже.

Таблица I

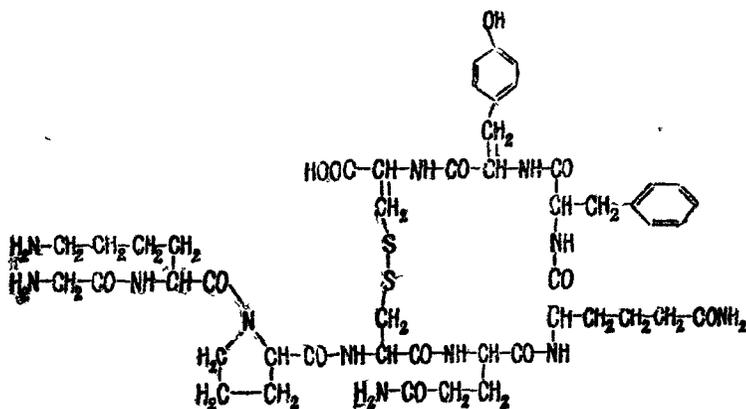
Сокращенные обозначения остатков главных аминокислот

Сокращенное обозначение остатка	Название аминокислоты	Строение остатка аминокислоты
1	2	3
Ala	Аланин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$
β -Ala	β -Аланин	$- \text{HN} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CO} -$
Arg	Аргинин	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{NH} \\ - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$
Asp	Аспарагиновая кислота	$\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$
Asp — NH ₂	Аспарагин	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$
Cys	Цистеин	$\begin{array}{c} \text{HSCH}_2 \text{ CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$
S — Cys	Цистин	$\begin{array}{c} \text{NH} - \\ \\ \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \end{array}$
S — Cys		$\begin{array}{c} \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \\ \\ \text{NH} - \end{array}$

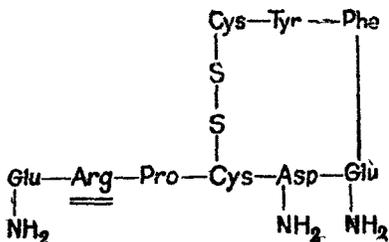
Сокращенное написание той же формулы:



Лизин-вазопрессин (вазопрессин свиньи)



Сокращенное написание той же формулы:



Как нам кажется, читатель сразу же согласится, что при сокращенном написании легче подчеркнуть сходство и различие отдельных веществ, проще описывать их особенности. Еще ярче достоинства сокращенной записи проявляются при веществах, содержащих много аминокислотных остатков.

При всей нашей убежденности в пользе и простоте химических формул мы все же охотно допускаем, что среди читателей найдутся такие, которые совсем не хотят смотреть на

химические формулы, интересуясь в то же время общими вопросами, рассматриваемыми в книге. Они хотят найти данные о том, что такое химические регуляторы биологических процессов, какое влияние они оказывают на жизнь, что дает нам их изучение. Учитывая интересы таких читателей, авторы сделали попытку излагать все вопросы, так сказать, в двух тональностях. Там, где это представлялось возможным, мы стремились дать самые общие представления об излагаемых вопросах, обходясь совсем без химических формул. Для конкретизации и углубления вопроса приводятся и разбираются химические формулы. Мы надеемся, что это позволит читателям разной подготовленности и разного подхода к этой книге прочесть ее — нужно либо читать ее всю подряд, либо пропускать места, набранные мелким шрифтом. Конечно, в этом случае многие важные вопросы будут излагаться крайне упрощенно и недостаточно глубоко, но, как надеются авторы, ни в одном случае не будет той степени упрощения, когда вопрос оказывается изложенным просто неправильно. Насколько мы справились с этой нелегкой задачей, просим судить читателей. Мы будем очень благодарны всем за отзыв, советы и пожелания. Они помогут и нам, и другим авторам при работе над подобными научно-популярными книгами по смежным вопросам.

Авторы

ВВЕДЕНИЕ

Многообразие и взаимосвязь биорегуляторов

Никто не обнимет
необъятного!

Козьма Прутков

Современный этап развития науки характеризуется двумя внешне противоположными, но внутренне связанными тенденциями. С одной стороны, исключительно быстрый рост объема научной информации ведет ко все большему раздроблению науки, появлению все более узких специальностей. В настоящее время редко какой химик может сказать, что он занимается, например, неорганической, физической или органической химией, не уточнив ту более узкую область этой науки, в которой он конкретно работает (химия непредельных соединений, химия гетероциклических соединений или даже химия индола и т. д.). Этот процесс отражен в шутовском афоризме, что в настоящее время ученый каждой специальности начинает все больше и больше знать о все более узкой области науки и при продолжении этого процесса скоро будет знать все ни о чем. Одновременно с процессом дифференциации науки идет и другой процесс — сращивания, казалось бы, очень далеких областей исследования, вследствие чего на границе различных отраслей науки появляются новые научные дисциплины, идейно и методически связанные с породившими их науками, но быстро обретающие свою самостоятельность. Можно указать на быстрое развитие таких пограничных научных дисциплин, как кибернетика и биоиника, рождение математической лингвистики и т. д. В еще большей степени наблюдается процесс проникновения методов и принципов одних наук в другие, комплексное изучение вопросов, еще недавно традиционно относимых к какой-то одной отрасли науки. В последние годы особенно интенсивно идет процесс проникновения математики, физики и химии в биологические науки, в познание тайн живой материи. В свою очередь, происходит проникновение биологических методов и принципов в физику и химию. Это взаимное обогащение наук, ранее казавшихся очень далекими, открывает широкие перспективы в познании таких процессов жизнедеятельности, к которым всего лишь 10—15 лет назад, казалось, не было

никаких подходов. Прогресс в познании многих важнейших биологических процессов обусловлен успехами химии в изучении двух классов веществ, непосредственно связанных с процессами жизнедеятельности. Первые из них — так называемые *биополимеры* — представляют собой те вещества, из которых в основном построены все организмы — от вирусов и бактерий до деревьев и человека. Биополимеры — высокомолекулярные вещества (с молекулярным весом от нескольких тысяч до нескольких миллионов), построенные обычно из большого числа однотипных звеньев (мономеров). Так, белки построены в основном из большого числа аминокислот, нуклеиновые кислоты состоят из многократно повторяющихся нуклеотидов (которых известно всего лишь около десяти), полисахариды являются продуктами соединения (конденсации) большого числа простых углеводов (моносахаридов). Имеются и более сложные биополимеры (например, нуклеопротеиды, липопротеиды и т. д.), которые состоят из большого числа мономеров различного типа, а нередко содержат остатки и других веществ — липидов (вещств, близких к жирам), различных природных пигментов и т. п. Такие основные процессы жизнедеятельности, как передача наследственных признаков, рост организмов, их старение, патологические состояния и т. д., тесно связаны с образованием и изменениями биополимеров. Превращения биополимеров и составляют материальную основу большинства биологических процессов. Успехам в изучении белков, нуклеиновых кислот и, в меньшей степени, других полимеров посвящены сотни популярных книг и статей, опубликованных в последние годы.

Меньше освещены в популярной литературе успехи в изучении другого класса биологически важных природных веществ — *биорегуляторов*, под влиянием которых в значительной мере протекают разнообразные процессы в живых организмах. Эти регуляторы очень разнообразны по своим функциям, по характеру действия, по месту образования и т. д. Их систематическое изучение началось в самом конце прошлого века, и за сравнительно короткое время создано несколько разделов биологии и медицины, в различных аспектах занимающихся выяснением их действия и возможностей использования.

Как известно, в организме человека и животных имеются специальные органы (обычно очень небольшие по размеру) — железы внутренней секреции, которые вырабатывают и направляют в кровь высокоспециализированные соединения — *гормоны*. Нарушения работы этих желез приводят к серьезнейшим заболеваниям, уродствам или даже к смерти. Изучением их деятельности, выяснением влияния гормонов на организм, возможностями их использования занимается специальная наука — *эндокринология*.

Важнейшую роль в жизни человека и животных имеют регуляторы другого типа — *витамины*, которые не могут образовываться в организме человека или животного в достаточном количестве и поэтому должны вводиться извне, вместе с пищей. Их недостаток (а в некоторых случаях и их избыток) приводит к нарушению нормальной работы организма, тяжелым заболеваниям и даже смерти. Изучением витаминов занимается *витаминология*.

Самую многочисленную и самую важную группу биорегуляторов составляют *ферменты* (энзимы) — биокатализаторы, управляющие разнообразными процессами, протекающими во всех организмах. Ферменты в большом числе содержатся в каждой живой клетке, обеспечивая возможность обмена веществ, т. е. самую основу жизни. Изучением ферментов, вопросами их распространения в природе, получения и действия занимается *энзимология*. В последнее время выяснилось, что эти три главных типа биорегуляторов — гормоны, витамины, ферменты — тесно связаны между собой, их взаимодействие обеспечивает нормальное функционирование организма.

В различных органах животных вырабатываются и другие природные факторы, так или иначе регулирующие жизнь данного животного или группы животных, но не являющиеся ферментами, гормонами или витаминами. К ним можно отнести многообразные соединения, в значительной мере влияющие на взаимоотношения различных животных одного или разных видов, например вещества, привлекающие особей другого пола (половые аттрактанты), вещества, отпугивающие врагов, токсины, служащие химическим орудием охоты, и многие другие. В последнее время соединения этого рода, регулирующие взаимоотношения между животными, получили обобщающее название — *телергоны*. Можно привести и другие примеры природных биорегуляторов, но рассмотрение всех их в одной небольшой книге представляется невозможным, тем более что по некоторым из этих вопросов (например, о телергонах) недавно были опубликованы специальные научно-популярные книги.

Помимо упомянутых биорегуляторов, образуемых, как правило, самим организмом и выполняющих в нем те или иные регуляторные функции, важное значение для человека имеют также химические регуляторы биологических процессов иного рода. Это те химические соединения, обычно отсутствующие в организме, которые человек сознательно использует для изменения течения биологических процессов. Такие вещества могут быть выделены из других природных источников (где они иногда выполняют совсем иные функции) и внесены в организм человека, животного, растения или микроба для изменения протекающих в них нормальных или патологических про-

цессов (антибиотики, алкалоиды, другие природные лекарственные препараты). Важные регуляторы могут быть созданы человеком и использованы им для своих целей — в ряде случаев они много сильнее и избирательнее, чем находящиеся в природе; к ним относятся многочисленные синтетические лекарственные соединения, препараты, применяемые в животноводстве и растениеводстве, и т. д.

Как видно из этого краткого перечня, существует громадное число очень разнообразных биорегуляторов, которые, конечно, нельзя описать в одной книге.

Поэтому мы надеемся в этой небольшой брошюре показать читателю особенности некоторых важных типов биорегуляторов, познакомить с методами изучения этих веществ, рассказать о возможностях их практического использования. Мы хотим также попытаться дать представления, в каких направлениях идут дальнейшие исследования в этой области. При этом мы будем исходить из одного общего принципа — при описании любого биорегулятора мы будем стремиться прежде всего рассматривать его как вещество, рассказывать о его химических особенностях в тесной связи с его биологическими функциями. Такое комплексное изучение биологически важных веществ является характерной особенностью современного этапа науки, типичной чертой новой отрасли естествознания — биоорганической химии. С позиций этой науки и будут рассматриваться выбранные нами для рассказа разнообразные биорегуляторы.

Глава I

ТРУДНЕЙ, ЧЕМ ДОБЫЧА РАДИЯ (очистка биологических регуляторов)

Поэзия—
та же добыча радия,
В грамах добыча,
в год труды.
Изводишь
единого слова ради,
тысячи тонн
словесной руды.

В. В. Маяковский

В 1898 году произошло научное событие, во многом предопределившее последовавший затем переворот в естествознании. Мария и Пьер Кюри открыли и выделили новый чудесный элемент — радий. Получение первых чистых образцов солей радия было подлинным научным подвигом, потребовавшим титанической работы. Как теперь известно, в одной тонне урановой смоляной руды, использованной Кюри, содержится всего лишь 140 мг радия. Для получения 100 мг чистой соли этого нового элемента Марии Кюри с сотрудниками пришлось вручную переработать несколько тонн исходной руды. Получение радия произвело колоссальное впечатление на современников и на последующие поколения, стало образцом трудоемкого извлечения вещества, присутствующего в малых количествах. Однако если сравнить этот ставший классическим пример очистки с более поздними исследованиями по получению в чистом виде природных биорегуляторов, станет ясно, насколько сложнее новые задачи. Основные трудности связаны даже не с тем, что эти вещества нередко содержатся в исходном сырье в еще меньших количествах, чем радий в руде. Конечно, низкое содержание, например, биотина в куриных яйцах, когда для получения первых 1,1 мг чистого витамина пришлось обработать 250 кг сухих яичных желтков, или гормона с таким длинным и сложным названием, как 11-дезоксипро-17 α -оксикортикостерон (содержание которого на 1 голову крупного рогатого скота не превышает 0,013 мг), само по себе очень затрудняет их накопление. Однако главные трудности связаны все же с двумя другими обстоятельствами. Во-первых, в отличие от элемента радия (который не разрушается ни при каких химических воздействиях) все рассматриваемые биологические регуляторы представляют собой

сложные органические соединения, отличающиеся, как правило, малой устойчивостью. Многие из них настолько легко разрушаются, что приходится их очищать в очень мягких условиях, избегая повышенных температур, действия кислот или щелочей, иногда даже приходится работать в отсутствие кислорода воздуха. Для выделения биологических регуляторов обычно используют на тех или иных стадиях различные высокоэффективные приемы разделения (разные виды хроматографии, противоточное распределение, многократные перекристаллизации и др.). Примеры очистки разных биологических регуляторов будут приведены ниже.

Другим обстоятельством, очень осложняющим очистку природного биологического регулятора по сравнению с очисткой радия, является необходимость специфических, подчас очень сложных и капризных методов определения их количества во фракциях. Когда велось выделение радия, на всех стадиях очистки можно было определить его количество по его очень сильной специфической радиоактивности. Последняя строго пропорциональна содержанию радия в пробе. На нее не оказывают влияния ни превращение радия в различные соли, ни присутствие посторонних веществ. Совершенно иная ситуация обычно имеет место при очистке природного биорегулятора. Как правило, новый биорегулятор привлекает к себе внимание потому, что предполагается, что он является причиной какого-то биологического явления, т. е. он интересен своей специфической биологической активностью. Новый гормон изучается потому, что предполагается, что он оказывает то или иное влияние на организм. Новый антибиотик привлекает внимание тем, что он способен избирательно подавлять какой-то опасный микроорганизм. Противоопухолевое вещество должно угнетать развитие опухолей и т. д.

На первый взгляд какая разница, что измерять — радиоактивность или биологическое действие. Однако в действительности между этими двумя определениями имеется очень много существенных различий. Биологическое действие того или иного вещества (даже совершенно чистого) зависит от ряда факторов, многие из которых трудно учесть: порода животных, их диета, время года, условия содержания и т. д. Еще сложнее испытание не вполне очищенных препаратов, получаемых на начальных и промежуточных стадиях работы: обычно в них, помимо искомого соединения, содержатся и другие биологически активные вещества, обладающие сходным с искомым соединением или противоположным действием, причем по мере очистки меняется их влияние на общую картину. Кроме того, при большинстве биологических методов испытания требуется очень длительное время — иногда каждое определение продолжается по нескольку дней, недель или даже месяцев. По всем этим причинам результаты биоло-

гических испытаний обычно очень переменны, и определенные выводы можно сделать лишь после проведения целой серии аналогичных опытов.

Нередко приходится вместо главного биологического явления, из-за которого вещество привлекло к себе внимание исследователей, брать какое-либо иное, более просто наблюдаемое и регистрируемое явление. Например, при изучении андрогенных гормонов зачастую используется такой тест, как почернение клюва у воробья. Поэтому не надо удивляться, когда вы слышите, что в течение длительного времени ученые занимаются такой, казалось бы, смешной проблемой, как тщательное изучение периода почернения воробьиного клюва.

Прежде всего надо рассказать о типичных приемах определения различных биорегуляторов — ферментов, витаминов, гормонов, антибиотиков, противораковых препаратов и т. д.

Ферменты, которые подробно рассматриваются в следующей главе, представляют собой высокоспецифические катализаторы белковой природы. Их важнейшая особенность — способность ускорять строго определенный тип превращений. Как правило, эту специфическую особенность ферментов и кладут в основу их определения. Обычно их определение ведут путем измерения или количества вещества, которое изменяется под влиянием фермента (т. е. субстрата фермента), или количества вещества, образующегося под его влиянием. Чистота препаратов фермента определяется, как правило, числом условных единиц фермента в 1 мг исследуемого препарата. Например, за единицу амилазы — фермента, расщепляющего крахмал, принимают такое количество его, которое расщепляет 1 мл однопроцентного водного раствора растворимого крахмала (до стандартного уменьшения окраски с йодом) за 30 мин при 40°. Наиболее чистые образцы фермента, полученного из сенной палочки (*Bacillus subtilis*), содержат 27 000—27 500 таких единиц на 1 мг белка.

В случае новых витаминов (которым посвящена глава 3) обычные методы их определения основаны на том физиологическом действии, которое оказывает данный витамин на подопытных животных. Чтобы выявить действие данного витамина, необходимо длительное время поддерживать большую группу животных на диете, содержащей все необходимые питательные вещества (белки, жиры, углеводы) и все витамины, кроме изучаемого. Затем сравнивают патологические явления, наблюдаемые у животных, совсем не получающих изучаемого витамина, и те же значительно ослабленные явления у животных, получающих большие или меньшие количества витамина. На основе этих испытаний устанавливают единицу витамина. Затем в процессе очистки витамина определяют число его единиц на 1 мг препарата. В качестве примера можно указать, что витамин B₆ (пиридоксин) часто оценивается в

крысиных единицах. За одну крысиную единицу принимают то минимальное количество пиридоксина, которое необходимо давать крысе, чтобы предотвратить развитие авитаминоза на специальной экспериментальной диете. В настоящее время установлено, что одна крысиная единица соответствует 10 μ витамина (т. е. 0,01 мг).

Аналогично велось определение другого витамина — рибофлавина (В₂). Крысиная единица рибофлавина равна такой суточной дозе этого витамина, которая в продолжение 28 дней обеспечивает на стандартной среде прирост веса тела молодых крыс в среднем на 10 г в неделю. Читателю, несомненно, ясно, насколько трудоемка работа по такому тестированию этого витамина. Естественно, по мере изучения каждого вещества разрабатываются более простые (обычно химические или физико-химические) методы их определения.

Еще сложнее определение активности гормональных препаратов (о них подробнее рассказывается в главе 4). В отличие от витаминов, которые не образуются в животном организме (так что при их определении необходимо лишь тщательно исключить попадание изучаемого витамина извне), гормоны вырабатываются определенными органами подопытного животного (его эндокринными железами). Поэтому чтобы определить количество гормона по его действию на животных, у последних нужно удалить (или разрушить) соответствующую железу. Например, определение гормона роста (соматотропного гормона) обычно производится на крысах, у которых оперативным путем удален или разрушен гипофиз (гипофизэктомированные крысы). Гипофиз находится под большими полушариями и у крысы примерно равен 1—2 мм в диаметре. При удалении (или разрушении) гипофиза ни в коем случае нельзя затронуть другие части мозга, иначе животные погибнут или картина отсутствия гормона будет осложнена другими факторами. Гипофизэктомированным самкам крыс вводятся различные количества препарата, содержащего гормон роста, и определяют, в какой мере эти количества влияют на рост хряща большой берцовой кости (тибиатест). Ширина хрящевой зоны (которую для облегчения замера окрашивают в черный цвет азотнокислым серебром и гипосульфитом натрия) прямо пропорциональна логарифму количества введенного препарата. В настоящее время за единицу соматотропного гормона принимают 1 мг стандартного препарата.

При очистке антибиотиков их определение обычно сравнительно просто; оно ведется, как правило, по их способности угнетать соответствующие микроорганизмы (грамположительные бактерии: золотистый стафилококк, сенную палочку, желтую сардину; грамотрицательные бактерии: сальмонеллы, бруцеллы или же дрожжи, грибы и т. д.). Существует несколько

ко общепринятых методик определения угнетающего действия. По одному из них (метод серийных разведений) в ряд пробирок с питательной средой, засеянной спорами, прибавляют все уменьшающиеся (обычно в два раза) количества антибиотика, оставляют их в термостате на 18—72 часа и определяют то граничное разбавление, при котором микроорганизмы не могут развиваться. Другой распространенный метод (метод диффузии в агар) заключается в том, что на поверхность питательного агара с засеянными спорами соответствующего тест-микроба помещают полые цилиндры (или в агаре вырезают соответствующие цилиндрические лунки), в которые на-

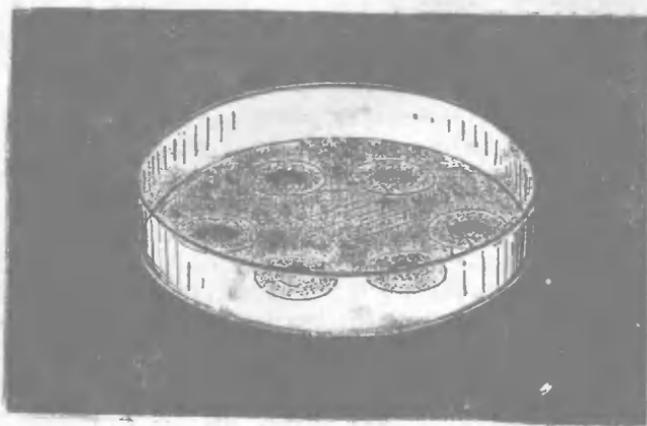


Рис. 1. Метод диффузии в агар.

ливают раствор испытуемого антибиотика различной концентрации. Антибиотик диффундирует (проникает) в окружающую среду, вызывая образование вокруг цилиндра (или лунки) круглых зон, в которых отсутствует рост микробов (рис. 1). По величине зон угнетения судят о количестве антибиотика.

Весьма сложной задачей является определение природных противораковых веществ. Обычно их определяют по угнетающему действию, которое они оказывают на развитие перививных опухолей животных (мышей, крыс, хомяков и др.). В результате длительных исследований найдены и поддерживаются во многих лабораториях мира такие виды опухолей животных, которые, будучи перевиты (под кожу, внутримышечно или иным путем) определенному виду животных, быстро развиваются, достигают больших размеров и через довольно определенный период времени приводят животных к гибели. Для определения нового противоопухолевого вещества обычно вначале подбирают чувствительную к нему пере-

вивную опухоль. Затем большой группе подопытных животных прививают ее. Часть животных оставляют в качестве контроля, другой части через несколько суток после перевивки вводят вещество (обычно по одному разу в день в течение 1—2 недель) в различных дозах. Затем животных забивают, вырезают у них опухоли и определяют их средний вес. По тому, насколько уменьшился вес опухоли у животных, которым вводили изучаемый препарат, определяют необходимое количество. Легко понять, что если ведется сложная многостадийная очистка нового противоопухолевого вещества, то определение степени его очистки на каждой стадии является при таких методах определения очень трудоемким и недостаточно точным. Поэтому обычно стремятся на самых ранних этапах работы найти какой-либо иной признак, коррелирующий с противоопухолевой активностью (действие на какой-либо микроорганизм, характерная окраска или спектр поглощения). В текущей работе ведут определение по этому признаку, время от времени проверяя, действительно ли усиливается по мере очистки его противоопухолевое действие.

Использование перевивных опухолей вызывает большие осложнения и в дальнейшей работе. Если ведется очистка какого-либо нового витамина или гормона, то ко времени получения его в чистом виде уже накапливается определенный опыт, позволяющий судить, в каких случаях следует пытаться его применять. Сходным образом при получении нового антибиотика уже в общем известно, на возбудителей каких заболеваний он действует и в каких случаях его следует испытывать.

Совсем иначе обстоит дело в случае противоопухолевых веществ, действующих на ту или иную перевивную опухоль. Даже когда вещество уже получено в чистом виде, причем оно обладает очень сильным подавляющим действием на определенную перевивную опухоль и не действует на другую, это не дает еще оснований предполагать, при какой форме раковой болезни человека он может быть эффективным. Все изучение нужно практически начинать заново.

Приведенные выше примеры (далеко не охватывающие всего разнообразия приемов контроля биорегуляторов) служат дополнительным свидетельством глубоких различий в свойствах веществ, выполняющих в организме регуляторные функции, и недостаточности каких-то общих подходов при работе с ними. Еще ярче это многообразие биорегуляторов выступает при ознакомлении с основными приемами очистки, используемыми при их изолировании.

Подавляющее большинство методов очистки требует, чтобы очищаемое вещество на определенной стадии находилось в растворе. Поэтому одним из первых этапов практически всех методик очистки является перевод вещества в рас-

твор — растворение (когда вещество вместе с сопровождающим его примесями полностью переходит в раствор) или экстракция (когда из обрабатываемого объекта переходят в данный растворитель лишь некоторые вещества). В качестве растворителей или экстрагентов используют воду, водные растворы солей, кислот или щелочей, а также спирт, ацетон, эфир и иные многочисленные органические растворители. Такие биорегуляторы, как ферменты, белковые и полипептидные гормоны, многие антибиотики (например, стрептомицин), практически не растворимы в органических растворителях; для их растворения (экстракции) приходится использовать воду и водные растворы. Другие биорегуляторы (стероидные гормоны, многие витамины, антибиотики и другие соединения) почти нерастворимы в воде, но легко растворимы в том или ином органическом растворителе. Выбор растворителя для извлечения биорегулятора из природного сырья, в котором он находится (органы или ткани животного, растительные или микробные клетки, культуральная жидкость¹ и т. д.), имеет очень важное значение. Растворитель должен по возможности полно извлекать интересующее нас вещество, в меньшей степени растворяя сопровождающие примеси. В то же время он, естественно, не должен разрушать или изменять изучаемое вещество. При очистке сложных природных веществ, в частности биорегуляторов, приходится учитывать то обстоятельство, что на растворимость вещества очень сильно влияет наличие примесей, поэтому растворимость одного и того же соединения в процессе очистки может сильно изменяться; как правило, чистые вещества значительно менее растворимы, чем малоочищенные. В некоторых случаях такие различия очень велики; например, противотуберкулезный антибиотик дигидрострептомицин в форме его не вполне очищенного хлоргидрата очень легко растворим в метиловом спирте, образуя густой окрашенный раствор с концентрацией около 1 г/мл. Однако если из такого раствора выкристаллизовывается чистый хлоргидрат дигидрострептомицина, он уже практически не растворяется в метиловом спирте.

Растворимость многих биорегуляторов в воде (в частности, тех, которые являются кислотами или основаниями) сильно зависит от pH (от кислотности) — как правило, органические кислоты легко растворяются в водных растворах, имеющих слабощелочную реакцию, так как они образуют растворимые соли; напротив, они не растворяются при кислом значении pH. Их растворимость в органических растворителях противоположна. Это и позволяет провести значительную очистку таких веществ, экстрагируя, например, подкисленный водный раствор органическим растворителем, а затем отделенный от

¹ Среда, на которой проводилось выращивание микроорганизмов.

воды раствор в органическом растворителе водным раствором щелочи (или буферным раствором со слабощелочным значением рН).

Затем можно вновь подкислить водный раствор и проэкстрагировать тем же или иным органическим растворителем, беря каждый раз уменьшающееся количество экстрагента. Этим путем удастся сильно сконцентрировать и очистить нужное соединение. Такой прием лежит, в частности, в основе производственных методов очистки хорошо известного антибиотика пенициллина, точнее, бензилпенициллина (подробнее см. главу 5).

Конечно, при этом нужно очень тщательно следить за условиями обработки, так как, например, даже небольшое увеличение кислотности или щелочности, повышение температуры, замедление процесса экстракции могут привести к полному разложению вещества. Производственная очистка пенициллина стала возможной лишь после тщательного изучения процесса экстракции и разработки специальных экстракторов, позволяющих проводить все операции очень быстро.

При очистке веществ белково-пептидной природы (в частности, ферментов), которые растворимы лишь в воде и водных растворах, нередко используют приемы, основанные на уменьшении их растворимости при прибавлении к водным растворам солей или смешивающихся с водой органических растворителей. Увеличивая концентрацию соли (например, сернокислого аммония или поваренной соли) в воде, можно осадить те или иные из растворенных веществ. Таким путем удастся значительно очистить ферменты от сопровождающих веществ, так как нередко изучаемое вещество осаждается при другой концентрации соли, чем примеси (дробное осаждение). Повторяя такой процесс с небольшими модификациями (осаждение при разных значениях рН и при различной концентрации солей), обычно удается получить концентраты фермента (или другого биорегулятора) высокой степени очистки, но содержащие значительные примеси солей. Последние удаляют посредством диализа (при котором низкомолекулярные вещества проходят через полупроницаемую пленку, например из целлофана, и удаляются, а высокомолекулярные остаются) или путем гельхроматографии (в последнее время), что значительно быстрее.

Во многих случаях вещества, имеющие кислотные или основные группировки, можно концентрировать или очищать с помощью ионообменной хроматографии. Ионообменные смолы, используемые в этом процессе, можно, грубо говоря, рассматривать как высокомолекулярные нерастворимые в воде кислоты (такие смолы служат для связывания катионов и носят название «катионитов») или высокомолекулярные основания («аниониты»). Если через слой катионита («высокомоле-

кулярной кислоты») пропустить раствор, содержащий смесь нейтральных соединений (например, сахаров) и веществ, содержащих основные группы, то нейтральные вещества пройдут, не задерживаясь, а основания образуют с катионитом соли и задержатся в колонке. Если затем через колонку пропустить раствор другого основания (минеральной щелочи, органического основания), то очищаемое вещество будет вытесняться и выходить из колонки. Таким путем можно достигнуть его значительной очистки и концентрирования.

Таковыми приемами, как экстракция, осаждение и ионный обмен, или путем последовательного применения этих приемов обычно удается выделить интересующее нас вещество в виде довольно активного концентрата. Конечно, на каждом этапе очистки необходимо тщательно определять, не потерялась ли биологическая активность и насколько повысилась чистота препарата.

Как правило, таких приемов очистки оказывается недостаточно для получения биорегулятора в гомогенном (совершенно чистом) состоянии. Для дальнейшей очистки может быть использован целый ряд более тонких методов, разработанных или сильно усовершенствованных за последние годы. Так, на основе способа очистки путем экстракции веществ из раствора в одном растворителе другим, не смешивающимся с ним растворителем, изложенного выше на примере пенициллина, был разработан новый высокоэффективный способ отделения веществ от сопутствующих им сходных примесей, называемый методом противоточного распределения. Его суть заключается в следующем. Подбирается такая пара несмешивающихся между собой растворителей (например, водный буферный раствор с определенным значением pH и какой-либо органический растворитель — диэтиловый эфир, этилацетат и т. д.), чтобы при внесении изучаемого вещества оно распределялось более или менее равномерно между обоими растворителями (более тяжелым и более легким); обычно такую пару растворителей называют тяжелой и легкой фазами. Можно, например, подобрать такую систему растворителей, чтобы при встряхивании изучаемого вещества в делительной воронке около половины его находилось в верхней фазе, а другая половина в нижней фазе. Если затем эти фазы разделить и каждую из них встряхнуть с другим растворителем, то вновь произойдет распределение. Причем вещество, загрязненное близкими примесями, несколько иначе распределяется между двумя растворителями. При многократном перераспределении (несколько сот или тысяч раз) удается разделить даже очень близкие вещества. Конечно, делать сотни или тысячи экстракций вручную невозможно, поэтому для таких исследований созданы специальные приборы (рис. 2), позволяющие проводить распределение между двумя растворителями автомати-

чески. Обычно результаты противоточного распределения изображают графически, откладывая по одной оси номера ячеек (трубок), а по другой — долю вещества в ячейке. Например, эритромицин (формула $C_{37}H_{62}O_{13}$) и эритромицин В (формула $C_{37}H_{67}O_{12}$) — очень близкие антибиотики. Их различие заключается лишь в том, что один из них содержит на один атом кислорода больше. Хотя физические и химические

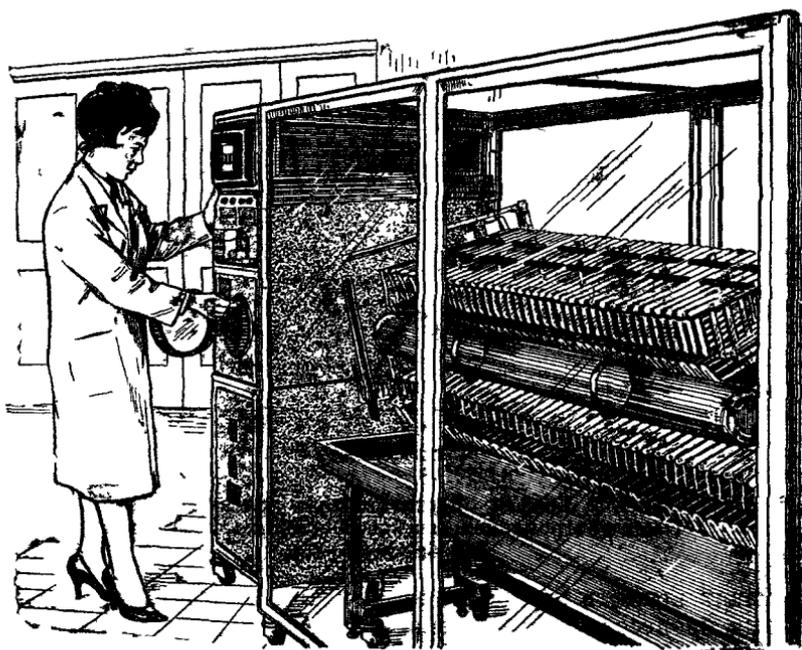


Рис 2. Прибор для противоточного распределения.

свойства их чрезвычайно похожи, тем не менее они легко разделяются методом противоточного распределения (рис. 3).

При очистке биорегуляторов, как и других природных соединений, очень большую роль играют различные виды хроматографии. Этот метод был открыт в начале нашего столетия русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом, который и предложил название «хроматография». В течение долгого времени этот метод недооценивался, но затем началось его широкое применение и бурное развитие. За последние годы создано много его модификаций. При чтении специальной химической и биологической литературы непрерывно сталкиваешься с такими терминами, как адсорбционная хроматография, распределительная хроматография, ионообменная хроматография, бумажная хроматография, газовой-жидкостная

хроматография, гель-хроматография, тонкослойная хроматография и т. д. Каждому виду хроматографии посвящаются специальные монографии, созываются конференции и съезды, рассматривающие как теоретические основы указанных методов, так и их практическое приложение. Конечно, в нашей небольшой книге мы не имеем возможности коснуться всех этих вопросов, а ограничимся лишь некоторыми примерами. Все виды хроматографии имеют общую основу — разделение

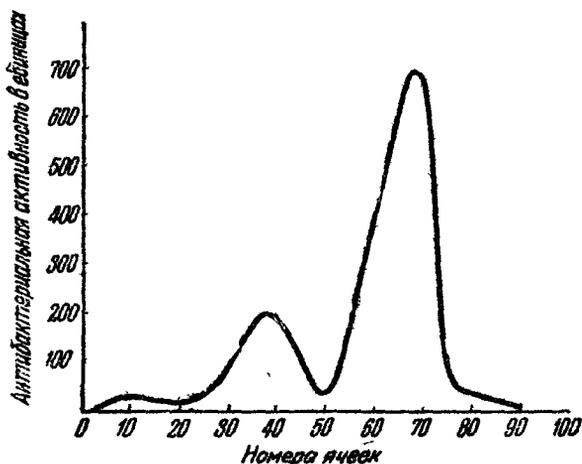


Рис. 3. График противоточного распределения смеси эритромицина (ячейки 30—50) и эритромицина В (ячейки 60—80).

близких веществ осуществляется путем многократного повторения процесса разновременной задержки веществ на каком-либо материале. В *адсорбционной хроматографии* (которая, собственно говоря, и была разработана М. С. Цветом) вещества разделяются благодаря различной способности поглощения (адсорбирования) на таких материалах с большой внутренней поверхностью, как окись алюминия. Если взять длинную стеклянную трубку, заполнить ее специально подготовленной окисью алюминия и пропустить через нее раствор смеси веществ в каком-либо малополярном растворителе, то вещества из раствора адсорбируются¹. Затем, промывая колонку тем же растворителем (или более полярным), можно вызвать их десорбцию. При этом сравнительно небольшие различия в строении веществ могут очень сильно влиять на легкость десорбции вещества — одни из них будут десорбироваться (элюироваться) с колонки очень легко, другие более

¹ Адсорбция — поглощение какого-либо вещества поверхностью другого вещества. Абсорбция — поглощение всем объемом вещества.

трудно, для их вымывания (десорбции, элюции) из колонки нужно пропустить большой объем растворителя или взять более полярный растворитель. Адсорбционная хроматография играет особенно большую роль при очистке сравнительно низкомолекулярных веществ, хорошо растворимых в органических растворителях (стероидных гормонов, витаминов, антибиотиков и т. д.). Например, почти все стероидные гормоны из коры надпочечников (кортикостероиды) были выделены с использованием адсорбционной хроматографии.

Для очистки водорастворимых высокомолекулярных соединений, например ферментов, белковых гормонов и т. д., большое значение имеют в настоящее время ионообменная хроматография и гельхроматография.

Ионообменная хроматография — развитие того простого метода ионного обмена, о котором говорилось выше как о методе отделения ионогенных веществ от нейтральных. Ионообменная хроматография проводится на таких же полимерных ионообменных смолах, но более тщательно подготовленных (полученных по строго определенной методике из очень чистого сырья, с одинаковой величиной зернения и т. д.). В таких условиях можно проводить разделение близких веществ, используя сравнительно небольшие различия в свойствах разделяемых соединений. Одно из очень важных для биоорганической химии приложений ионообменной хроматографии — количественный аминокислотный анализ, производимый на специальных автоматических анализаторах. При этом благодаря строгой стандартности всех операций каждая аминокислота всегда элюируется в определенный момент (см. рис. 4, где в качестве примера указано разделение основных аминокислот и аммиака). Измеряя объем пика каждой аминокислоты, можно количественно определить соотношение различных аминокислот в данном образце (т. е. провести аминокислотный анализ).

Для ионообменной хроматографии ферментов и других высокомолекулярных веществ в настоящее время часто используются ионообменники на основе целлюлозы, в которую искусственным путем введены кислотные группы (карбоксиметилцеллюлоза, КМ-

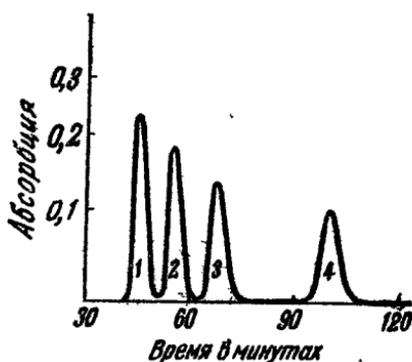


Рис. 4. Хроматографический анализ основных аминокислот на автоматическом анализаторе аминокислот. 1 — лизин, 2 — гистидин, 3 — аммиак, 4 — аргинин.

целлюлоза) или основные группировки (диэтиламиноэтилцеллюлоза, ДЭАЭ-целлюлоза). В этих случаях вытеснение исследуемого соединения ведут обычно раствором соли повышающейся концентрации (создают градиент концентрации), причем различные вещества элюируются при строго определенной концентрации соли (рис. 5). Антибиотики-стрептотрицины имеют очень сходное строение, но содержат различное число остатков аминокислоты β -лизина. В этом случае легче всех вытесняется соединение, содержащее один остаток β -лизина (стрептотрицин F), затем соединение с двумя остатками β -лизина (стрептотрицин E) и т. д. Ионообменная хромато-

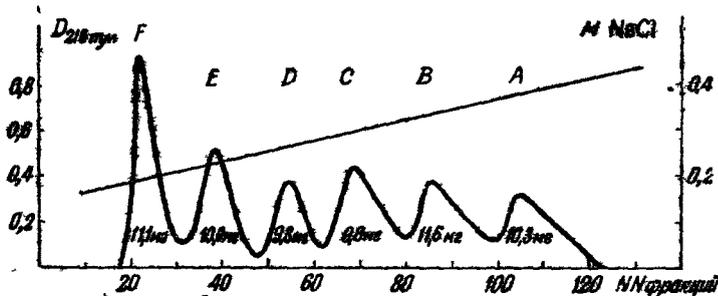


Рис. 5. Ионообменная хроматография смеси стрептоцидинов.

графия на карбоксиметилцеллюлозе настолько четко воспроизводится, что этот метод можно использовать для количественного анализа смеси стрептотрицинов. В то же время разделение стрептотрицинов другими методами из-за их лабильности и близости свойств представляет очень сложную задачу.

При очистке высокомолекулярных биорегуляторов (в особенности ферментов) очень большое значение быстро приобрела гельхроматография, позволяющая быстро разделять вещества в зависимости от их молекулярного веса. Как показывает название, хроматографию ведут на специальных гелях (гели агара, полиакриламидные гели и др.). Наиболее часто используют для этих целей специальные декстрановые гели, выпускаемые под названием «Сефадекс». Принцип гельхроматографии состоит в следующем. Сухую гелевую массу дают набухнуть в воде (или каком-либо водном буферном растворе) и набухшим гелем заполняют колонку. Зерна геля свободно проиццаемы для воды и низкомолекулярных веществ (солей, аминокислот, моносахаридов, но непроницаемы (или частично проиццаемы) для веществ с высоким молекулярным весом. Если на такую колонку с гелем нанести пробу, содержащую раствор смеси трех веществ, то будет происходить их разде-

ление (рис. 6). Низкомолекулярные вещества (изображенные на рисунке мелкими точками) будут свободно диффундировать как в воду между частицами геля, так и в сами частицы (изображенные светлыми кружками). Молекулы высокомолекулярного соединения (изображенные крупными черными точками) не смогут проникнуть внутрь частиц геля и будут двигаться вместе с объемом воды между частицами, т. е. значительно быстрее низкомолекулярных веществ. Поведение веществ со средним молекулярным весом будет промежуточным — они будут лишь частично проникать в частицы геля.

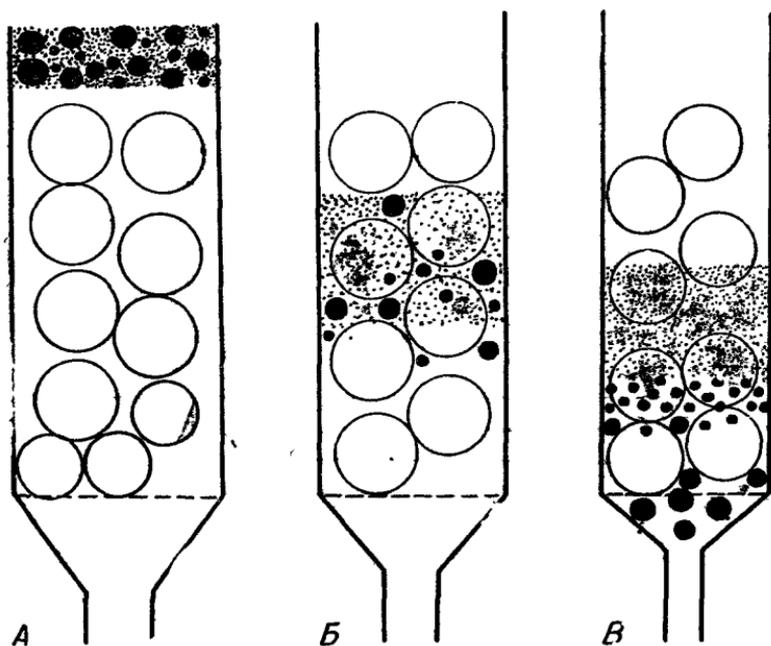


Рис. 6. Принцип гельхроматографии.

Таким образом, они будут отставать от высокомолекулярных веществ, но обгонять низкомолекулярные. Если колонка достаточно длинна, то произойдет полное разделение трех веществ (рис. 7) — в первую очередь из нее выйдет раствор высокомолекулярного вещества, затем вещества со средним молекулярным весом, а затем низкомолекулярные вещества. Поскольку при гельхроматографии условия очистки очень мягкие, этот метод быстро нашел широкое применение.

При очистке и в особенности при проверке гомогенности выделенного препарата очень большое значение имеют раз-

личные электрофоретические методы, основанные на движении изучаемого вещества в каком-то носителе под влиянием электрического тока. В качестве носителей часто применяют бумагу, крахмальный гель, полиакриламидный гель и другие пористые материалы.

Обычно выделение и очистка нового биорегулятора являются сложной задачей, при решении которой используются самые разнообразные методы и их комбинации. В качестве характерного примера современной методике довольно сложной очистки ниже приведен способ изолирования фермента аргиназы, способного расщеплять аминокислоту аргинин (Сору, 1965). Ее получают из культуры бактерий *Staphylo-*

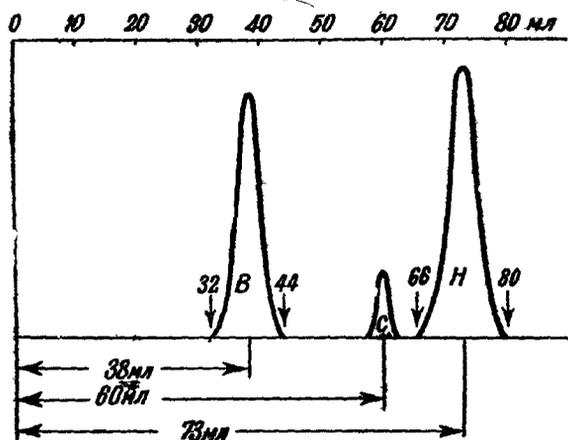


Рис. 7. График разделения веществ при гельхроматографии.

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк). Микроорганизм выращивают в течение 24 часов при 37° на питательной среде с агаром. Затем бактериальные тела отделяют, несколько раз тщательно промывают раствором соли и водой, после чего высушивают многократной промывкой ацетоном.

Полученные сухие клетки суспендируют в воде или растворе хлористого марганца и оставляют на 24 часа для аутолиза (самопереваривания). Неразрушившиеся клетки отделяют центрифугированием, а фермент осаждают путем прибавления четырех объемов ацетона. Выпавший осадок отделяют и высушивают. Затем его растворяют в небольшом объеме солевого раствора и очищают гельхроматографией на сефадексе G-25. Каждую фракцию проверяют на содержание белка и аргиназную активность, мерой которой является ко-

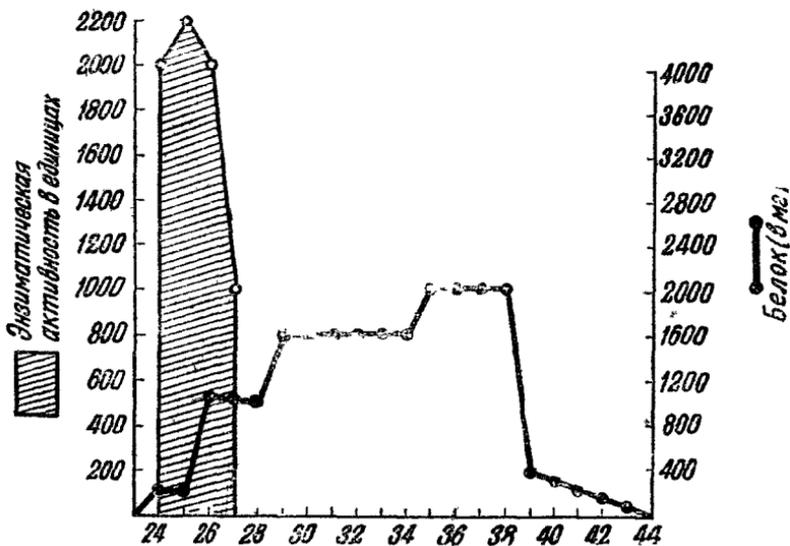


Рис 8 Очистка фермента гельхроматографией.

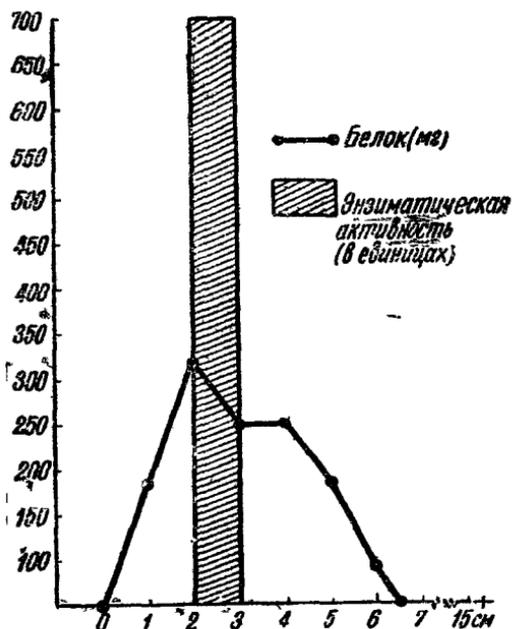


Рис 9. Очистка ферментов электрофорезом.

личество мочевины, отщепляемой в стандартных условиях от аргинина. Результаты этой стадии очистки графически изображены на рис. 8. Основная масса фермента выходит довольно узкой фракцией, отделяясь от большого количества сопровождающих белков. Полученную фракцию очищают далее электрофорезом на другом геле — сефадекс G-200 (результаты представлены на рис. 9). При этом происходит дальнейшая очистка фермента от посторонних белков. Выделенный препарат далее очищают путем кристаллизации, которая происходила при осторожном прибавлении к его водному раствору холодного ацетона. При последующем изучении различными методами полученная кристаллическая аргиназа оказалась гомогенной.

Глава 2

САМЫЕ СОВЕРШЕННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ (ферменты)

Жизнь есть способ существования
белковых тел.

Ф. Энгельс.
Диалектика природы

Химия изучает превращения различных веществ. Такие превращения, порой самые удивительные и неожиданные, непрерывно происходят вокруг нас в живой и неживой природе и используются человеком для получения новых веществ с ценными свойствами. Если мы хотим научиться управлять этими превращениями, нас должен интересовать не только их конечный результат, т. е. образующееся новое вещество, но и то, как эти превращения происходят, какова природа и механизм лежащих в их основе химических реакций.

Одной из важнейших характеристик любой химической реакции является ее скорость, и хорошо известно, что многие химические реакции осуществляются мгновенно, а другие требуют очень длительного времени. Достаточно вспомнить, что взрыв происходит в тысячные доли секунды, сильная кислота разъедает прочную ткань за несколько минут, железо под действием влаги и воздуха покрывается ржавчиной через несколько часов, а процесс образования каменного угля из древесины длится миллионы лет.

Человечество нашло пути к ускорению многих химических превращений, используя для этого высокую температуру, повышенное давление и другие факторы, и создало на этой основе мощную химическую индустрию. Решающую роль здесь сыграло сделанное около двух столетий назад открытие способности некоторых веществ резко ускорять разнообразные химические превращения и осуществлять их в более мягких условиях, не вступая, как это казалось тогда, в протекающую химическую реакцию и вызывая этот поразительный эффект лишь своим присутствием в реагирующей смеси. Эти вещества-волшебники получили название *ускорителей* или *катализаторов*. Хотя механизм действия многих катализаторов и до настоящего времени еще не совсем ясен и интенсивно изучается, тем не менее внедрение катализаторов ознаменовало

собой новый этап в развитии химической науки и привело к перевороту в важнейших областях химической технологии.

Та исключительная легкость и избирательность, с которой природа, как бы играючи, осуществляет удивительные превращения веществ в живом организме, как оказалось, также связана с существованием особых биологических катализаторов, называемых *ферментами* или *энзимами*. Слово «фермент» происходит от латинского термина «fermentatio», что означает брожение, закваску. Хотя явления брожения и переваривания были известны с глубокой древности, достаточно ясные представления о существовании ферментов как особых веществ сложились лишь к концу XVIII — началу XIX столетия.

В 1814 году петербургский химик К. Кирхгоф обнаружил, что разбавленные кислоты способны превращать крахмал в сахар, и этот процесс резко ускоряется в присутствии какого-то вещества, содержащегося в ячменном солоде. Впоследствии (1833 г.) это вещество получило название «диастаза» и одно время все ферменты называли «диастазами». Практически в эти же годы знаменитый шведский химик Берцелиус, впервые четко сформулировавший понятие о катализе как ускорении химической реакции, заметил аналогию между ферментативным превращением сахара при дрожжевом брожении и каталитическими процессами; на этой основе он предположил, что ферменты являются биологическими катализаторами. Поэтому будет правильно сказать, что современное учение о ферментах и наука о каталитических превращениях веществ имеют общие истоки и развивались, по существу, одновременно, дополняя и обогащая друг друга. Все это лишь подчеркивает значение ферментов как уникальных биорегуляторов.

После открытия К. Кирхгофа появились многочисленные данные о том, что ферменты распространены чрезвычайно широко — в желудочном соке был обнаружен пепсин, в соке поджелудочной железы было доказано наличие трипсина, в горьком миндале — фермента эмульсина и т. п. Однако прошло почти целое столетие, прежде чем удалось выделить ферменты в индивидуальном состоянии. На развитие работ по выделению и очистке ферментов в тот период роковое влияние оказала неудачная попытка такого всемирно признанного авторитета, как Луи Пастер, выделить из живых дрожжевых клеток фермент брожения. Отсюда родилось мнение, что ферменты как самостоятельные химические вещества вообще не существуют и ферментативная активность является каким-то особым атрибутом живой клетки.

Наверное, таинственную завесу с ферментов не удалось бы сбросить еще долгие годы, если бы, как это часто бывает в науке, эта проблема не получила неожиданного решения. В 1897 году немецкому ученому Бухнеру потребовалось получить небольшое количество очищенного белка для терапевти-

ческих целей. Для этого он разрушал дрожжевые клетки, растирая их с кварцевым песком, а затем отжимал их под большим давлением. По счастливому стечению обстоятельств Бухнер установил, что полученный им сок, не содержащий живых клеток, обладал способностью сбраживать сахар, другими словами, содержал в своем составе какие-то ферменты. Надо отметить, что аналогичные опыты проводились в тот же период русской исследовательницей М. Манассеиной. Так был открыт путь для изучения ферментов как химических веществ.

Правда, вопрос о том, что представляют собой ферменты по своей химической природе, удалось решить лишь в 20-х годах нашего столетия. Выдающийся немецкий химик Вильштеттер выполнил в 1922—1928 годах серию работ по получению чистых ферментов из различных тканей и органов животных, но не сумел установить, к какому классу веществ принадлежат эти ферменты. В 1926 году Дж. Самнер получил первый кристаллический фермент (уреазу), а несколько позднее Д. Нортропу в результате блестящих исследований удалось выделить в чистом виде ряд протеолитических (т. е. расщепляющих белки) ферментов и однозначно доказать, что они являются специфическими белками. Установление белковой природы ферментов явилось достижением огромной научной значимости и заложило основу современной химии этих важнейших веществ.

Биологическая роль ферментов необычайно велика, и в этом отношении с ними не могут сравниться все остальные биорегуляторы живого организма, вместе взятые. Нет ни одного процесса жизнедеятельности, который обходился бы без участия тех или иных ферментов.

Функции ферментов исключительно разнообразны. С ними связаны все превращения живой материи, от них зависит распад одних веществ в организме и образование новых. Переваривание и усвоение пищевых продуктов, прежде всего белков, жиров, углеводов, невозможно без участия ферментных систем. С другой стороны, синтез белков, нуклеиновых кислот, липидов, гормонов и других веществ в организме также представляет собой совокупность ферментативных реакций. Все функциональные проявления живого организма — дыхание, двигательные движения, нервно-психическая деятельность, размножение и т. д. — непосредственно связаны с работой соответствующих ферментных систем. Ферменты ответственны и за такие функции, как транспорт различных веществ и ионов через биологические мембраны. Совокупность ферментативных реакций, строго локализованных в пространстве и происходящих в определенный интервал времени, и составляет существо того, что мы называем жизнедеятельностью, жизнью. Именно в этом глубокий смысл изречения Фридриха Энгельса, приведенного в эпиграфе к этой главе,

Нет никакой возможности в этой маленькой книжке перечислить все известные ферменты или даже наиболее важные из них. В живой клетке, в различных органах и тканях организма непрерывно функционируют тысячи различных белков-ферментов. Порой они осуществляют превращения веществ, которые не удастся провести человеку вне живого организма даже при использовании всего арсенала современных технических и энергетических средств, человеку, который научился использовать энергию ядерного распада и покорил космическое пространство. Причем ферменты не только способны осуществлять самые удивительные превращения веществ, но и делают это исключительно легко, при обычных температурах и давлении, с необычайной полнотой и завершенностью и поразительно короткими сроками.

Нежный зеленый кустарник с непринужденностью превращает инертный углекислый газ в множество органических веществ, и в этом отношении с ним не может сравниться даже самый современный химический завод. Живая клетка за 1—2 минуты синтезирует огромные макромолекулы белков и нуклеиновых кислот, в то время как синтез даже относительно простой пептидной цепочки в лаборатории требует многих месяцев, не говоря уже об еще не решенной человечеством проблеме искусственного синтеза сложнейших биополимеров. Эти удивительные процессы происходят в живых организмах под действием и при непосредственном участии ферментов. Поэтому познание природы действия ферментов и детального механизма ферментативных реакций является одной из самых важных задач современной науки, естествознания в целом, и имеет огромное значение для дальнейшего прогресса человечества.

Если мы ставим своей задачей изучение ферментов, мы должны прежде всего выяснить: в чем своеобразие этих веществ, что отличает их от обычных катализаторов? Первое, что бросается в глаза, — это высокая специфичность, избирательность ферментативного действия.

Специфичность действия ферментов

Если мы рассмотрим какую-либо простую химическую реакцию, например, образование аммиака из водорода и азота, то эта реакция осуществляется в промышленности с помощью самых различных катализаторов. Одни катализаторы здесь менее эффективны, другие обладают наибольшей эффективностью и применяются очень широко, но важно подчеркнуть то, что одна реакция может ускоряться несколькими катализаторами. С другой стороны, ряд катализаторов (на

пример, платина и ее соединения) способен ускорять самые различные реакции, совершенно не похожие одна на другую.

Несколько по-иному обстоят дела в случае ферментов. Можно с достаточным основанием утверждать, что каждый данный фермент действует лишь на вполне определенное вещество или на вполне определенный тип химической связи и, напротив, индифферентен к другим веществам или связям. Именно поэтому ферменты способны осуществлять одновременно тысячи разнообразных превращений веществ в живом организме, направляя их по строго определенному пути в соответствии с единым и четким планом. Например, живая клетка с локализованными в ней различными ферментами представляет собой саморегулирующуюся систему, и эта стройность и согласованность работы аппарата живой клетки определяется прежде всего высокой специфичностью действия каждого фермента, способного выполнять строго определенную биологическую функцию.

Избирательность действия различных ферментов позволяет разделить их на несколько групп как по характеру тех объектов, к которым они проявляют наибольшее сродство, так и по характеру выполняемой ими функции. Это дает возможность навести известный порядок во всем многообразии ферментов и создать основу для их классификации.

Одну из наиболее многочисленных групп ферментов составляют так называемые *гидролазы*, т. е. ферменты, ускоряющие реакцию гидролиза — расщепления сложных органических соединений с участием воды. В частности, к этой группе относятся уже упомянутые ранее протеолитические ферменты — *протеиназы* и *пептидазы*, вызывающие расщепление белков (протеинов) и полипептидов по амидным связям с присоединением молекулы воды.

Из широко известных протеиназ следует прежде всего упомянуть пепсин, входящий в состав желудочного сока и способствующий перевариванию в желудке поступающих с пищей белков. В кишечнике млекопитающих дальнейшее расщепление белков осуществляется другой протеиназой — трипсином, выделяемым поджелудочной железой. В некоторых растениях, например, в млечном соке плодов дынного дерева, встречается еще одна протеиназа — папаин, способный расщеплять многие растительные белки. Все эти протеиназы расщепляют только амидные связи белков, но важно отметить, что действуют они избирательно на различные по своей природе амидные связи и весьма чувствительны к тем химическим группировкам, которые находятся по соседству с амидными связями. В частности, существуют даже особые протеиназы и пептидазы (так называемые аминокпептидазы и карбоксипептидазы), которые расщепляют лишь амидные группировки, находящиеся на конце полипептидной или бел-

ковой цепи. Таким образом, каждая протеиназа обладает ярко выраженной специфичностью, и только их совместное одновременное или последовательное действие обеспечивает полное расщепление белков в живом организме.

К группе гидролаз относятся и широко распространенные *эстеразы* — ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление разнообразных сложных эфиров. Под действием некоторых эстераз (иногда называемых липазами) в организме происходит распад жиров (липидов) на глицерин и свободные жирные кислоты. Очень важные функции выполняют так называемые холинэстеразы, обеспечивающие быстрое расщепление особого вещества — ацетилхолина, ответственного за передачу нервных импульсов. Ацетилхолин нужен организму на весьма короткое время для передачи эстафеты нервного возбуждения и должен быть немедленно разрушен, так как его накопление приводит к тяжелым отравлениям; эту функцию и выполняет фермент холинэстераза.

С помощью некоторых гидролаз осуществляется и расщепление углеводов (полисахаридов) на более простые сахара; эти гидролазы обычно называют *гликозидазами*, так как они участвуют в расщеплении гликозидных связей полисахаридов. Например, под действием одной из гликозидаз (инвертазы) молекула обычного свекловичного (тростникового) сахара, употребляемого нами в пищу, присоединяя воду, распадается с образованием двух простых сахаров — виноградного (глюкозы) и плодового (фруктозы). В слюне человека содержится другая гликозидаза — амилаза (птиалин), катализирующая распад крахмала на более простые углеводы — декстрины и солодовый сахар (мальтозу). К числу гликозидаз можно отнести и содержащийся в большом количестве в яичном желтке лизоцим, под влиянием которого расщепляются углеводы (хитины), входящие в состав клеточных оболочек.

Наконец, гидролазами можно считать и различные *нуклеазы*, способствующие расщеплению нуклеиновых кислот. Так, широко известная рибонуклеаза, являющаяся одним из наиболее простых белков-ферментов, гидролизует полимерную рибонуклеиновую кислоту (РНК) вблизи от ее звена, несущего пиримидиновое основание. Нуклеазы играют важную роль в биосинтезе белков.

Следующую большую группу составляют ферменты, катализирующие разнообразные реакции биологического окисления и восстановления и, следовательно, связанные с процессами дыхания и брожения; эти ферменты объединяются под названием *оксидоредуктаз*. К ним относятся различные *дегидрогеназы* (процесс дегидрирования — отщепление молекулы водорода), *оксидазы* (окисление), *пероксидазы* (окисление с участием перекиси водорода), *гидроксилазы* (введение в органические соединения гидроксильных группировок) и другие

ферменты. Большинство такого рода ферментов сосредоточено в клеточных органеллах-митохондриях, которые являются своего рода маленькими энергетическими установками живой клетки и обеспечивают протекание процессов дыхания. К этой группе ферментов относят и каталазу — фермент, катализирующий распад перекиси водорода на воду и кислород. Любопытно отметить, что этот же процесс ускоряется ионами железа, однако удельная активность каталазы примерно в 10^{10} раз выше, что еще раз подчеркивает уникальный характер действия ферментов.

Некоторые ферменты катализируют в биологических системах перенос различных группировок с одного вещества на другое в процессе разнообразных трансформаций органических веществ; такие ферменты носят название *трансфераз*. Сюда относятся переносчики метильных групп (*метилтрансферазы*), различных ацильных групп (*ацилтрансферазы*), фосфатных группировок (*киназы*) и др. Особое значение имеют трансминазы, с помощью которых осуществляется превращение различных кетокислот в аминокислоты и обратно.

Имеются и другие группы ферментов, катализирующих различные превращения веществ в живом организме; они известны под названием *лиаз, изомераз, лигаз* и т. п. и также отличаются высокой специфичностью.

Специфичность действия ферментов, однако, не ограничивается только их ярко выраженным предрасположением к определенным типам веществ или к осуществлению определенной химической реакции. Поразительным свойством любого фермента является его исключительная чувствительность к пространственному строению, очертаниям молекулы того соединения, на которое он воздействует (такое соединение в энзимологии называют *субстратом*). Еще в конце прошлого столетия выдающийся немецкий химик Эмиль Фишер высказал мысль о близком стерическом соответствии между ферментом и его субстратом и сформулировал столь часто встречающееся сейчас изречение, что фермент подходит к субстрату, как ключ к замку; впоследствии эта идея нашла известное экспериментальное подтверждение.

Такая *стереоспецифичность* ферментативного катализа особенно наглядно проявляется при действии ферментов на оптически активные вещества. Известно, что молекулы некоторых веществ, содержащие элементы асимметрии, способны существовать в двух формах, относящихся одна к другой, как предмет к своему зеркальному отображению (аналогично правой и левой рукам). Все физические и химические свойства пары таких веществ совершенно одинаковы, и они отличаются между собой лишь тем, что одно вещество вращает плоскость поляризации света влево (в кристалле или в растворе), а другое — вправо.

Вращение плоскости поляризации света и есть оптическая активность, регистрируемая специальными приборами — поляриметрами, а пара веществ, вращающих плоскость поляризации в противоположные стороны, называется оптическими изомерами или оптическими антиподами. Без поляриметра различить эти вещества невозможно. А вот ферменты способны четко различать эти вещества и даже используются в химии для разделения на антиподы, поскольку они вступают во взаимодействие лишь с одним оптическим изомером и совершенно безразличны к его антиподу. Это и есть стереоспецифичность ферментативного действия, которую можно объяснить следующим образом.

Если мы рассмотрим участок фермента, к которому подходит субстрат, то этот участок является асимметричным и, грубо говоря, соответствующим по своим очертаниям молекуле асимметрического субстрата. Пусть, например, такой участок напоминает собой перчатку для правой руки. Тогда очевидно, что с ним может вступать во взаимодействие лишь субстрат, похожий на правую руку (вспомним ключ и замок), а для субстрата с формой левой руки такая возможность исключается. Конечно, в случае фермент-субстратных взаимодействий отношения являются значительно более сложными, но их принципиальный характер вполне отражается в приведенном примере.

Действительно, все протеиназы расщепляют лишь полипептидные и белковые цепи, построенные из остатков оптически деятельных аминокислот определенной конфигурации (так называемых L-изомеров, вращающих плоскость поляризации света в строго определенном направлении), но совершенно не действуют на полипептиды, содержащие те же аминокислотные остатки противоположной конфигурации (D-изомеры, вращающие плоскость поляризации в обратном направлении). Аналогично ферменты алкогольного брожения сбраживают лишь правовращающие формы виноградного или плодового сахара (в данном случае D-изомеры) и совсем не затрагивают антиподы этих сахаров. *Стереоспецифичность является уникальным свойством ферментов и отличает их от всех других обычных катализаторов.*

Есть еще одна особенность ферментативного действия. Как известно, многие химические реакции могут быть обратимыми: если какое-либо вещество подвергается распаду, то в определенных условиях продукты этого распада могут вступать во взаимодействие с образованием исходного вещества. Так, при электролизе воды образуются кислород и водород, которые в специальных условиях способны вступать в реакцию между собой, давая первоначальное соединение — воду. Если говорить о ферментативных реакциях, то ферменты катализируют как прямую, так и обратную реакции. В частности, хи-

молтрипси может как расщеплять белки, так и снова сшивать образованные фрагменты в молекулу белка; однако эти ферментативные превращения осуществляются в различных условиях. Таким образом, ферменты выполняют не только разрушительную, но и созидательную функцию, в зависимости от насущных потребностей организма, и это лишь подчеркивает специфичность и многогранность их биологического действия.

Специфичность действия ферментов, ее причины и пути реализации являются величайшей загадкой природы, которая долго не находила своего решения. Лишь в последнее десятилетие удалось установить, что высокая специфичность ферментативных процессов связана с уникальным химическим строением фермента, заключена в удивительной архитектуре его молекулы с неповторимым и исключительно рациональным размещением в ней различных реакционноспособных группировок. Поэтому познание строения ферментов открывает путь к разгадке механизма их каталитического действия.

Строение ферментов

Все ферменты являются белками. Белки представляют собой линейные полимеры, точнее, сополимеры, построенные из связанных между собой остатков аминокислот. В состав большинства белков входят 20 важнейших аминокислот — глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, фенилаланин, тирозин, триптофан, цистеин, цистин, метионин, пролин и оксипролин; их химические формулы и обозначения приведены в таблице на стр. 5. Молекула каждой аминокислоты (1) достаточно проста и обязательно содержит две реакционноспособные группировки — одну, обладающую основными свойствами (аминогруппа $\text{H}_2\text{N}-$) и другую, имеющую кислотные свойства (карбоксильная группа — COOH),



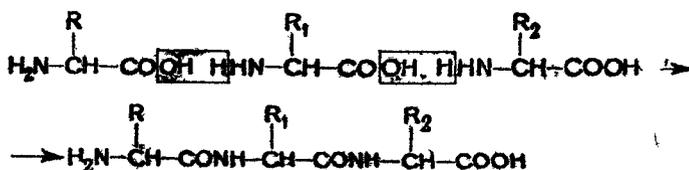
(1)

Боковая цепь R может быть достаточно инертной (например, углеводородным радикалом) или содержать дополнительные функциональные группировки. Практически все аминокислоты, входящие в белки, являются оптически активными соединениями в силу асимметрии их строения и относятся к L-ряду.

Тот факт, что все белки и, в частности, ферменты, построены из аминокислот, доказывается путем расщепления белков

под действием крепких кислот; при этом образуется смесь аминокислот, которые могут быть разделены и идентифицированы различными методами.

Отдельные аминокислоты соединяются между собой за счет отщепления молекулы воды, образуя длинные цепи, например:



В такой цепи аминокислоты связаны между собой группировкой $-CONH-$, которая называется амидной или *пептидной связью*, а вся цепочка носит название *пептида*. Именно так и построены белки, являющиеся, таким образом, полипептидами. В природе встречаются как короткие пептиды, содержащие до десяти аминокислотных остатков, так и высокомолекулярные белки, насчитывающие в цепочке сотни аминокислот.

Естественно, возникает вопрос, как из 20 одних и тех же аминокислот можно построить все многообразие белков (ферментов) при условии, что каждый белок будет отличаться от другого. Оказывается, все дело заключается в том, в каком порядке аминокислоты связываются между собой; так как аминокислоты отличны одна от другой, но нетрудно сосчитать, что число возможных последовательностей должно быть фантастически большим. Здесь уместно привести аналогию с буквами и словами. В русском алфавите всего 32 буквы, а их сочетания в слова и предложения являются основой неповторимого по своему богатству русского языка, не говоря уже о возможности и других, бессмысленных, сочетаний отдельных букв. Таким образом, молекула белка представляет собой в первом приближении полипептидную цепочку из остатков аминокислот, расположенных в строго определенной, несущей смысл, последовательности; это называется *первичной структурой* белка или фермента.

Выяснение последовательности аминокислотных остатков в белковой цепи представляет собой очень сложную и трудоемкую задачу, решение которой возможно лишь на основе использования комплекса специальных методов. Прежде всего расщепляют белок на сравнительно короткие фрагменты путем разрыва лишь некоторых амидных связей; для этой цели используют избирательные энзиматические или химические методы. Полученные полипептидные фрагменты разделяют и определяют последовательность аминокислотных остатков в

каждом из них. Это достигается специальными приемами, позволяющими последовательно отщеплять аминокислоты с конца пептидной цепи и проводить их четкую идентификацию.

В последнее время для определения первичной структуры коротких пептидов используют не только химические, но и физические методы, в частности масс-спектрометрию. Принцип этого метода заключается в том, что молекула соответствующим образом подготовленного пептида, находящаяся под действием высокой температуры и глубокого вакуума в газовой фазе, в специальной камере масс-спектрометра подвергается энергичной бомбардировке электронами, распадаясь при этом на положительно заряженные осколки. Эти осколки, несущиеся с огромной скоростью, попадают в магнитное поле и отклоняются в нем на определенную величину в зависимости от их массы и заряда, а затем фиксируются специальным коллектором и регистрируются на бумажной ленте в виде масс-спектра. Последний представляет собой серию пиков разной интенсивности, отвечающих массам образующихся при распаде пептида фрагментов. В случае пептидов такой распад происходит преимущественно по наиболее лабильным амидным связям с отщеплением отдельных аминокислотных остатков и, читая масс-спектр, можно судить о последовательности этих остатков в пептидной цепи.

Легко понять, что знание структуры даже всех пептидов, образовавшихся при расщеплении исследуемого белка, еще не позволяет установить его строение, поскольку неизвестно, каким образом соединяются эти пептиды между собой. Иначе говоря, от отдельных букв (аминокислот) мы уже перешли к словам, но еще не знаем того текста, который образуется их комбинацией. Поэтому всегда оказывается необходимым подвергнуть белок вторичному частичному расщеплению, но уже по другим амидным связям и снова выяснить строение образовавшихся фрагментов. Тогда из структуры этих новых фрагментов мы можем выявить места «стыковки» пептидов, образовавшихся при первоначальном расщеплении белка и таким образом расшифровать его полную структуру. Формально анализ первичной структуры белков чем-то напоминает разгадку кроссворда, но каждый шаг здесь требует огромного внимания, времени и труда, и поэтому на полное выяснение последовательности аминокислотных остатков в сложных белках иногда затрачивается несколько лет.

Характерно, однако, что далеко не все белки-ферменты представляют собой простую цепочку из аминокислот, соединенных амидными связями. Например, в некоторых, даже сравнительно простых белках (рибонуклеаза, инсулин и др.) мы обнаруживаем и иной тип связей — так называемые дисульфидные связи, представляющие собой два соединенных друг с другом атома серы ($S - S$), образующиеся при связыв-

вании двух остатков аминокислоты цистеина. Дисульфидные связи в белках обычно соединяют цистеиновые остатки, расположенные в пептидной цепи далеко друг от друга, и, таким образом, молекула белка оказывается как бы дополнительно «сшитой».

Далее, в состав молекулы многих ферментов могут входить, кроме аминокислот, другие сложные органические соединения, принимающие участие в акте ферментативного катализа и обычно называемые *кофакторами* или *коферментами*. Часто коферменты связаны с белковой частью молекулы фермента прочной связью; напротив, в некоторых случаях они вступают во взаимодействие и связываются с ферментом лишь в процессе ферментативной реакции. Существенно подчеркнуть, что у многих ферментов кофакторами являются широко известные витамины (см. главу 3), в частности витамины B₁,

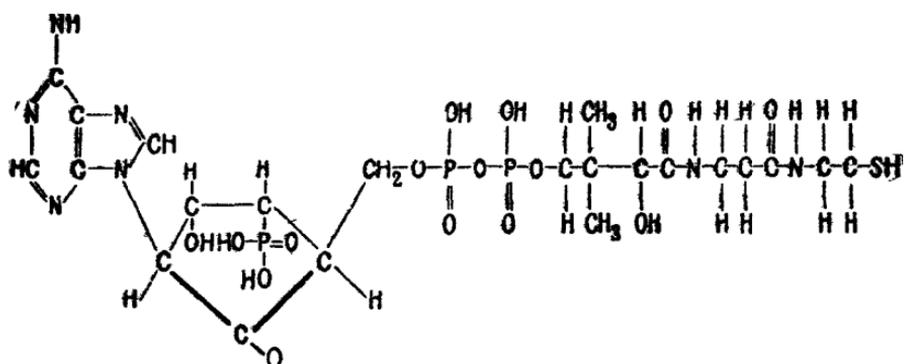


Рис. 10. Строение кофермента А.

B₂, B₆ и B₁₂, биотин, пантотеновая кислота и др., что отчетливо характеризует важную функцию витаминов в живом организме. Кофакторами могут быть и ионы различных металлов — железа, меди, цинка, марганца, хрома и т. п.

Роль кофакторов в функционировании ферментов исключительно велика — они осуществляют перенос отдельных атомов и группировок (водорода, фосфатной группы и др.) в ходе ферментативного превращения, служат «связными» между отдельными родственными ферментами и обеспечивают их согласованную деятельность. Ионы металлов, иногда входящие в состав ферментов в виде специальной, простетической группировки, часто выполняют роль активаторов ферментов, переводящих фермент в каталитически активное состояние. В качестве примера приведем строение одного из важнейших в биологическом отношении кофермента — кофермента А (рис. 10).

Таким образом, первичная структура фермента представляет собой исключительно сложную и уникальную систему,

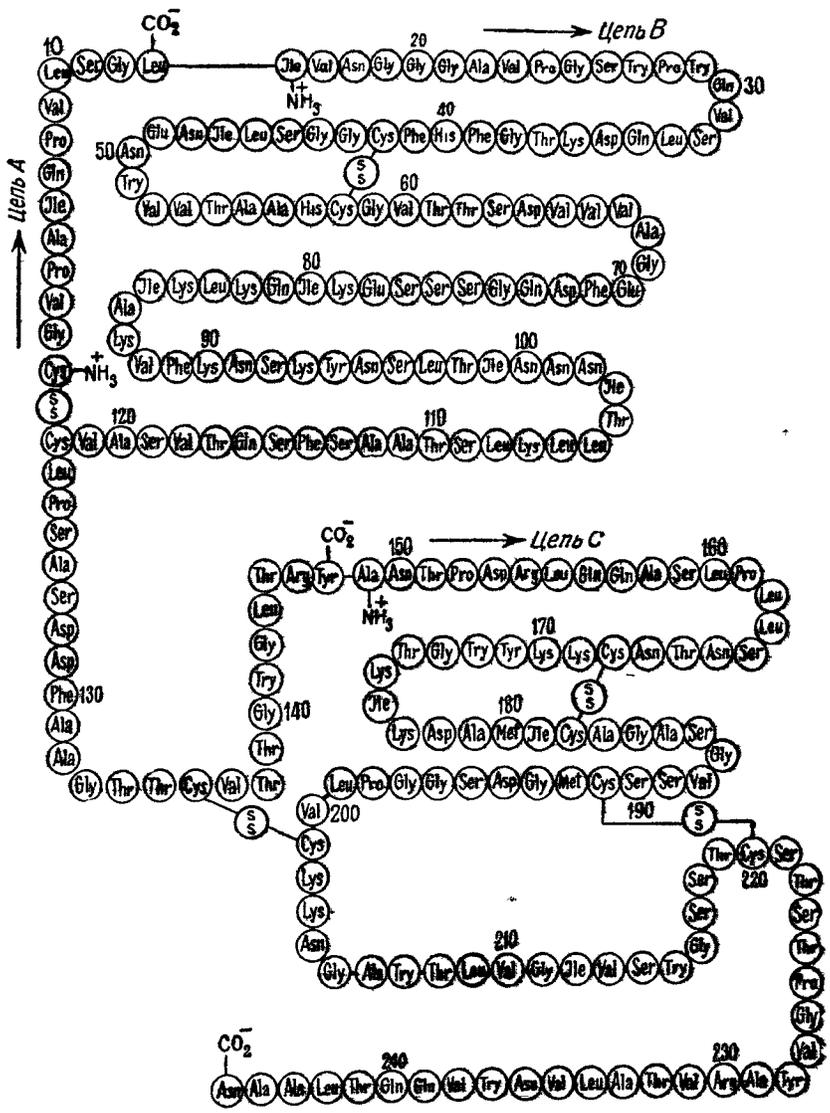


Рис. 11. Первичная структура фермента химотрипсина.

«скелет» которой — полипептидная цепь. Она является важнейшей характеристикой белков-ферментов и определяет их индивидуальность и многообразие. В настоящее время достоверно выяснена первичная структура лишь сравнительно небольшого числа ферментов. Так, пептидная цепь рибонуклеазы построена из 124 остатков аминокислот. На рис. 11 показана первичная структура другого, более сложного фермента — химотрипсина, построенного уже из 245 аминокислотных остатков; характерной чертой этой структуры является то, что она содержит не одну, а три полипептидные цепи, связанные между собой.

Первичная структура ферментов является необходимой, но не достаточной характеристикой их полного строения. Здесь важно отметить, что полипептидная система любого белка не представляет собой вытянутую цепочку, а специфическим образом уложена в пространстве, часто образуя достаточно сложную конструкцию. Одной из возможных форм свертывания полипептидной цепи является так называемая α -спираль (рис. 12); часто в белках встречается и β -структура, когда ассоциированные между собой изогнутые пептидные цепочки создают подобие складчатого листка (рис. 13). Есть и много других форм укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру, которую обычно называют *вторичной структурой* полипептидов и белков. Дальнейшее скручивание пептидной цепи с уже сформированной вторичной структурой (например, сворачивание α -спирали в компактный клубок, глобулу) приводит к следующей ступени структурной организации белков-ферментов, известной под названием *третичной структуры*. Наконец, отдельные белковые глобулы часто объединяются между собой в сложные ассоциаты или агрегаты — это уже *четвертичная структура* белков, построенная из нескольких отдельных субъединиц; такая структура свойственна многим ферментам.

Полипептидная цепочка белков-ферментов уложена в пространстве исключительно сложным образом, уникальным для каждого белка.

Трехмерная конфигурация белковой молекулы определяет всю специфичность и многогранность ее биологического действия. Знание этой конформации белка-фермента является обязательным условием для понимания его биологической функции и того способа, каким он эту функцию осуществляет. Интересно отметить, что эта пространственная организация молекулы белка в существенной степени определяется его первичной структурой, т. е. пространственный образ, свойственный молекуле каждого белка, точно «зашифрован» в последовательности аминокислотных остатков его пептидной цепи. Изменяется первичная структура — и соответственно резко изменяется конформация белковой молекулы. Этот вы-

вод, сделанный на основе большого экспериментального материала, представляется исключительно важным, поскольку вскрывает движущие силы, укладывающие полипептидную цепь в упорядоченную трехмерную систему.

Изучение пространственного строения белковой макромолекулы представляет собой одну из наиболее сложных и еще далеких от полного решения проблем химии ферментов. Прежде всего исследователю необходимо знать не только пространственную организацию фермента в какой-то определенный момент времени, но и выяснить, ка-

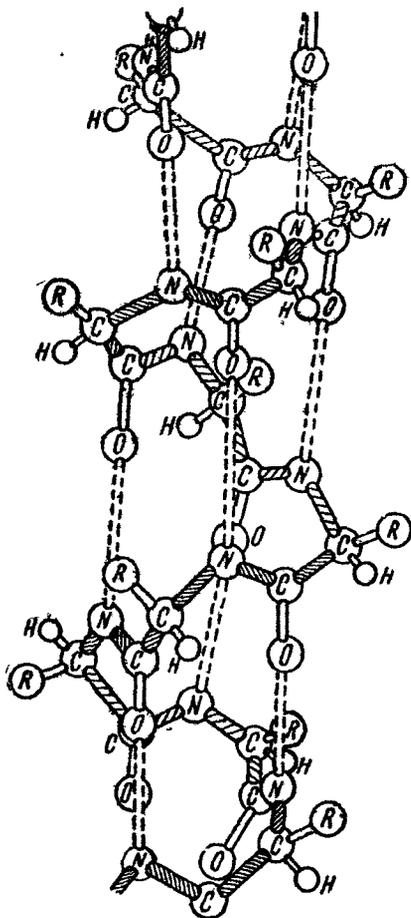


Рис. 12 Модель α -спирали полипептидов.

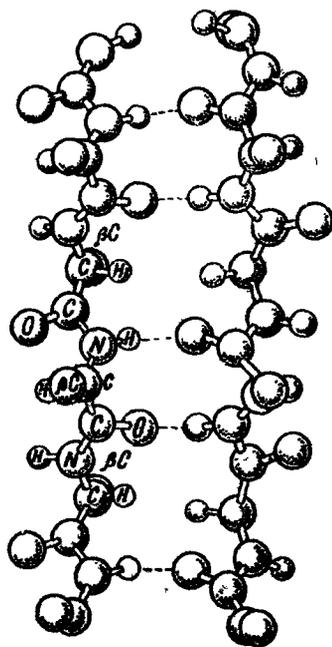


Рис. 13. Модель β -структуры полипептидов.

кие конформационные превращения происходят в процессе его функционирования, поскольку любой фермент представляет собой подвижную, динамическую систему и непрерывно видоизменяет свою архитектуру в процессе выполнения биологической функции. Не менее важно познать и природу сил и взаимодействий, заставляющих полипептидную цепь свер-

тываться в определенную трехмерную систему и стабилизировать эту систему в данных конкретных условиях. Сейчас уже удалось установить, что такими силами могут быть так называемые водородные связи, в образовании которых, с одной стороны, участвуют группировки, несущие реакционно-способный, «подвижный» атом водорода, а с другой стороны, группировки, проявляющие к этому атому повышенное сродство (водородные связи в химии обычно обозначают пунктиром, например, $\text{HN} \cdots \cdots \text{OC}$). Сюда относятся и электростатические, или ионные, взаимодействия между заряженными группами (притяжение разноименно заряженных группировок и отталкивание одноименных). Важное значение в химии ферментов имеют и так называемые гидрофобные силы, заключающиеся в агрегации, сближении углеводородных (жирных) боковых цепей аминокислот под влиянием выталкивающих их молекул воды. В различных условиях удельный вес тех или иных взаимодействий внутри белковой молекулы или между такими молекулами снижается или возрастает, становясь иногда доминирующим, и соответственно этому меняется пространственное строение белка.

Исследование пространственных, конформационных состояний полипептидных и белковых молекул проводится современными физическими и физико-химическими методами. Вполне понятно, что ценность любого из этих методов будет тем большей, чем точнее он позволяет определять пространственное строение белка-фермента, непосредственно связанное с выполняемой последним биологической функцией. Поскольку все ферменты являются асимметрическими системами, растворы которых вращают плоскость поляризации света, то здесь широко используют оптические методы. К ним относятся дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм, т. е. изменение оптических характеристик какого-либо соединения в зависимости от длины волны облучающего света. Для многих ферментов, особенно содержащих металлы, можно применить метод магнитной дисперсии, когда оптическая активность (новая, отличная от естественной) индуцируется сильным магнитным полем (это явление известно под названием эффекта Фарадея). При изменении пространственного строения белков-ферментов в растворе меняются и их оптические характеристики — кривые оптической дисперсии и кругового дихроизма, и на основании этого можно судить о характере происшедших изменений. Широкую популярность в химии ферментов завоевали различные спектральные методы, в частности метод ядерно-магнитного резонанса, регистрирующий поведение ядер некоторых атомов в исследуемом пептиде или белке при наложении сильного внешнего магнитного поля, а также методы инфракрасной и ультрафиолетовой спектроскопии и т. п.

Большие успехи в изучении пространственного строения ферментов достигнуты на основе метода рентгеноструктурного анализа, когда удается получить точный «рентгеновский снимок» фермента в кристаллическом состоянии. Введя в молекулу фермента какой-либо «тяжелый» атом (например, атом металла), хорошо «заметный» на рентгенограмме и используемый как центр отсчета, можно построить трехмерные модели ряда ферментов и таким образом как бы «увидеть» их реальные молекулы с точными координатами отдельных ато-

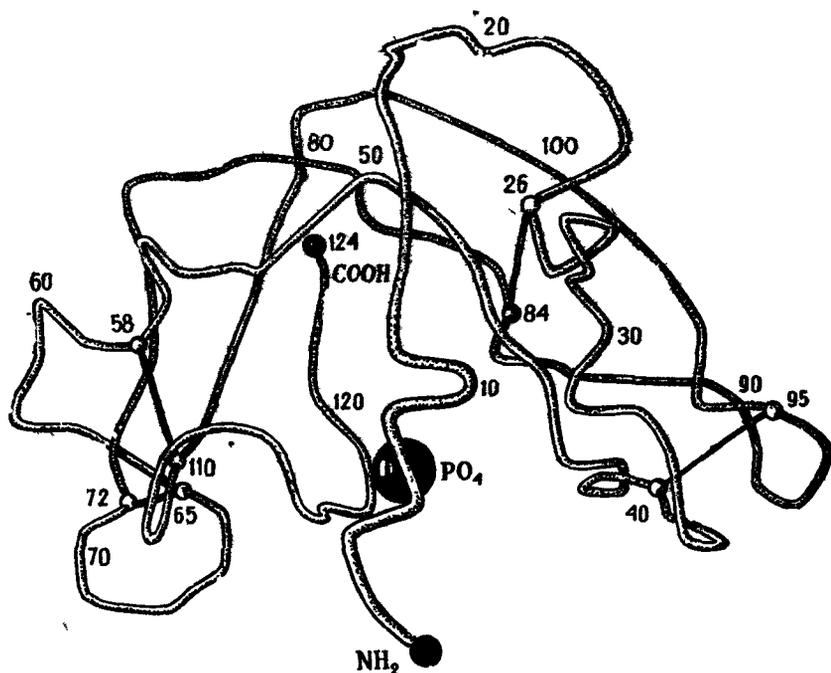


Рис. 14. Пространственное строение рибонуклеазы.

мов и группировок, правильным взаимным расположением различных элементов структуры и т. п. Конечно, мы еще не видим «живую» молекулу, то, как она видоизменяется и «дышит» в процессе ее функционирования, но мы уже достоверно можем судить о принципах ее строения и организации и лучше понимать, как она «работает». Поэтому достижения рентгеноструктурного анализа представляют собой выдающийся вклад в учение о ферментах, который пока не знает себе равных. Правда, такой анализ и расшифровка полной структуры молекулы белка в кристалле являются необычайно сложными и трудоемкими и часто требуют многих лет и титанических

усилий исследователей; достаточно упомянуть, что пока расшифрованы трехмерные структуры лишь небольшого (около 10) числа ферментов. Однако это лишь подчеркивает исключительную значимость полученных результатов.

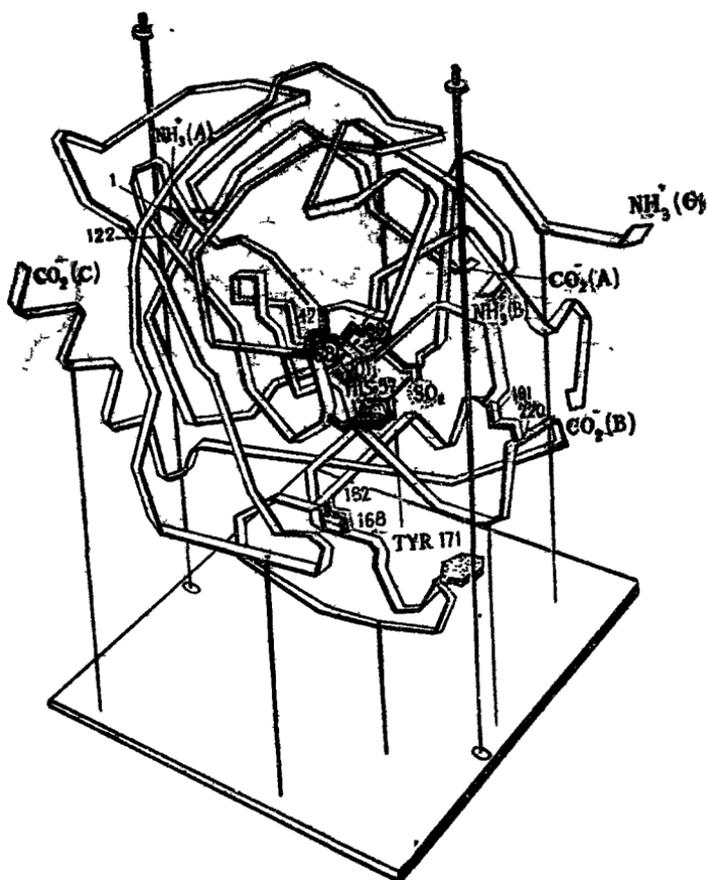


Рис. 15. Трехмерная модель химотрипсина.

В качестве примера приведем сравнительно недавно полученные на основе рентгеноструктурного анализа полные структуры ферментов рибонуклеазы (рис. 14) и химотрипсина (рис. 15). На этих рисунках светлые извилистые линии означают полипептидные цепи, а цифры — номера отдельных аминокислотных остатков, темные короткие линии, соединяющие участки пептидной цепи, представляют собой дисульфидные связи (например, между аминокислотными остатками 26

и 84 на рис. 14 и между 42 и 58 — на рис. 15). Видно также, что молекула химотрипсина состоит из трех скрепленных полипептидных цепей (обозначенных буквами А, В и С) со свободными концевыми группами (NH_3^+ и CO_2^-). На рис. 14 черный шарик означает «тяжелый» атом — атом фосфора. Приведенные рисунки наглядно демонстрируют сложность структуры ферментов.

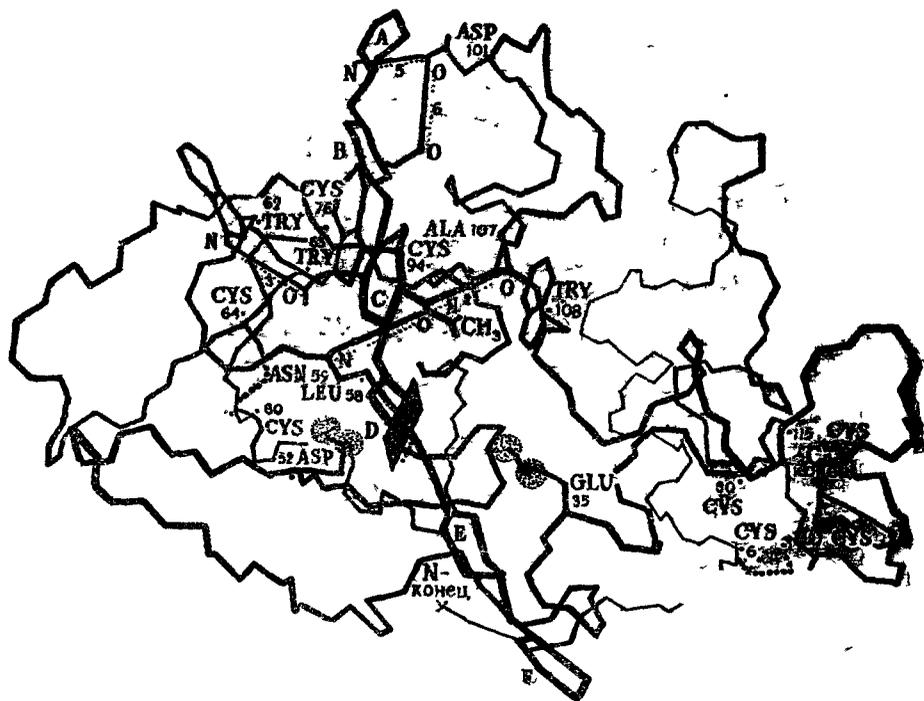


Рис. 16. Строение комплекса лизоцима с субстратом (ингибитором).

Успехи рентгеноструктурного анализа позволили продвинуться вперед в понимании того, как фермент осуществляет свою функцию. В этом отношении особенно ценной оказалась возможность получать «снимок» молекулы фермента в процессе функционирования, а именно — с включенной в него молекулой субстрата. Структура такого фермент-субстратного комплекса впервые была установлена на примере лизоцима, и он изображен в несколько упрощенном виде на рис. 16. Молекула субстрата, представляющего собой полисахарид, изображена черной жирной цепочкой, пересекающей фермент сверху вниз (каждый остаток сахара в цепи обозначен бук-

вами А, В, С, D, E и F). В пространстве структура этого комплекса выглядит таким образом, что субстрат «удобно» укладывается в лошину, расположенной между двумя связанными между собой «половинками» молекулы лизоцима. На основе этих уникальных данных, полученных английским ученым Д. Филлипсом, удается приоткрыть тайну того, как молекула фермента осуществляет каталитический акт, приводящий к специфическому расщеплению субстрата.

Мы рассмотрели в достаточно общих чертах химическое строение ферментов, различные ступени их структурной организации. Вооружившись этими знаниями, давайте попробуем понять, как фермент осуществляет свою биологическую функцию, каковы принципы его работы? Ученые еще работают над решением этой проблемы и в ней еще много «белых пятен», поэтому наше рассмотрение будет приближенным, в известной степени схематичным.

Как работают ферменты?

Как мы уже знаем, основная функция ферментов в живом организме — ускорение разнообразных химических превращений, в ходе которых осуществляется изменение, расщепление или синтез различных веществ-субстратов. Надо прежде всего отметить, что далеко не все ферменты находятся в тканях и клетках организма всегда в активном, реакционноспособном состоянии, что, раз и навсегда возникнув вместе с зарождением живого организма, молекула какого-либо фермента постоянно функционирует и не претерпевает никаких изменений. Как и все в живом мире, ферменты постоянно образуются и отмирают, и организм непрерывно обновляет свой «ферментный запас».

Ученые установили, что многие ферменты образуются из специфических предшественников, называемых *проферментами*, путем «активации» последних с помощью химических или ферментативных реакций. Проферменты, или неактивные формы ферментов, также представляют собой белки, обычно крупнее самих ферментов, но не способных осуществлять каталитическое превращение субстратов. По определенному сигналу, в определенный момент времени, когда в организме возникает потребность в данном ферменте, соответствующий профермент подвергается воздействию какого-либо химического агента или другого специфического фермента, и при этом «высвобождается» нужный активный фермент.

Например, в железах желудка содержится недействительная форма пепсина — так называемый пепсиноген, который под действием содержащихся в желудочном соке ферментов и со-

ляной кислоты превращается в активный пепсин. Аналогично из трипсиногена под действием фермента энтеропептидазы образуется трипсин, из химотрипсиногена (под действием трипсина) — химотрипсин и т. п. Активаторами ферментов могут быть не только другие ферменты и неорганические кислоты, но и различные металлы и другие элементы — кальций, магний, кобальт, хлор и др.

Часто акт активации заключается в отщеплении от молекулы профермента части его полипептидной цепи, играющей роль своеобразного «якоря», удерживающего фермент в неактивном состоянии (процесс активации может проходить в одну или несколько стадий — в последнем случае мы говорим о нескольких предшествениках). Например, при активации пепсиногена (молекулярный вес около 42 000) отщепляется приблизительно одна пятая часть его молекулы, и при этом наряду с активным пепсином образуются по меньшей мере шесть небольших пептидов.

Важная особенность явления активации проферментов состоит в том, что в ряде случаев она осуществляется тем же ферментом, который в результате этой активации образуется. Таким образом, весь процесс является аутокаталитическим и его скорость очень быстро возрастает (в частности, пепсиноген способен активироваться пепсином). Вся эта согласованная система активации ферментов — очень важное свойство живого организма, которое можно рассматривать как приспособление, предотвращающее самопереваривание тканей, вырабатывающих данные ферменты. Иначе трудно было бы себе представить, каким образом способны сосуществовать в живой клетке «волки и овцы» — ферменты и те субстраты, на которые они воздействуют.

Деятельность ферментов регулируется и другими факторами. Существуют особые вещества, которые способны специфическим образом прекращать работу фермента, инактивировать или «отравлять» его. Например, соли синильной кислоты (цианистый калий и др.) подавляют активность окислительно-восстановительных ферментов (цитохромоксидазы), что приводит к резкому торможению окислительных и дыхательных процессов в организме и практически мгновенной смерти. Некоторые фосфорорганические соединения (к числу которых относятся и так называемые «нервные газы») способны эффективно тормозить действие холинэстеразы и родственных ферментов. В частности, именно на этом свойстве основывается использование таких соединений в качестве мощных инсектицидов (средств против насекомых). Действие многих веществ, обладающих слезоточивыми или лакриматорными свойствами (хлорацетофенон и др.), также связано с поражением определенных ферментов (в частности дегидрогеназ). Наконец, действие некоторых лекарственных препаратов

обусловлено специфическим торможением ими ряда ферментативных систем, и эти явления изучает современная фармакология.

Вещества, способные специфически приостанавливать или прекращать работу ферментов, в энзимологии носят название *ингибиторов*. По характеру действия ингибиторы могут быть различными. Некоторые из них необратимо выводят фермент из строя, другие действуют лишь определенный период, и после их удаления деятельность фермента возобновляется. Не следует думать, что ингибиторы — всегда враги ферментов и живого организма. Очень часто они являются полезными регуляторами деятельности ферментов, «включая» и «выключая» их в определенные периоды и направляя их работу. В живой клетке находятся тысячи разнообразных ингибиторов, представляющих собой важнейшие в биологическом отношении вещества, которые обеспечивают согласованную деятельность всего ферментативного аппарата. Например, когда мы говорили о проферментах, то указывали, что в процессе активации пепсиногена от него отщепляются шесть пептидов; один из них, самый большой, является специфическим ингибитором пепсина, важным для функционирования этого фермента. Разнообразные ингибиторы — исключительно мощное орудие изучения ферментов, которое ученые широко используют в своих целях.

Упомянем еще и так называемые *антиферменты*. Известно, что если в организм (например, в кровь) ввести чуждый ему белок, то в качестве ответной реакции организм вырабатывает новый белок (его называют общим термином антитело), который специфическим образом воздействует на «пришельца» и прекращает его действие. Аналогичным путем в ответ на введение в организм ферментов, чуждых ему по природе, в нем образуются антиферменты. Антиферменты способны «снимать» действие соответствующих ферментов и быть их эффективными ингибиторами, являясь, таким образом, одним из средств регулирования деятельности ферментов.

Все изложенное позволяет составить представление о том, насколько сложен регуляторный механизм ферментативного действия. Очевидно, что функционирование всех рассмотренных регуляторов связано с их специфическим воздействием на молекулу фермента, и именно в уникальном строении и свойствах этой молекулы (или ансамбля молекул) надо искать объяснение не только поразительной специфичности и мощности ферментативного катализа, но и природы тех интимных процессов, которыми эта ферментативная активность регулируется. Попробуем сейчас в очень упрощенной форме рассмотреть функционирование фермента на молекулярном уровне.

Молекула фермента представляет собой белковое тело

сложной пространственной конфигурации. Не все участки этой молекулы равнозначны; напротив, деятельность каждого структурного элемента строго специализирована. Некоторые из функциональных группировок белка непосредственно участвуют в связывании субстрата и в осуществлении его превращений; совокупность таких группировок и участков фермента называют его «активным центром». Если полипептидную цепь, из которой построена молекула фермента, вытянуть в длинную линейную систему, то все группировки, принадлежащие к активному центру, могут оказаться разбросанными в разных звеньях цепи, порой отстоя друг от друга на значительном расстоянии. Напротив, функционирующая молекула белка свернута таким образом, что эти группировки оказываются пространственно сближенными, создавая исключительно благоприятную для взаимодействия с субстратом комбинацию реакционноспособных центров и групп. При этом следует подчеркнуть, что «активный центр» любого фермента не является какой-то статичной, застывшей системой, а, напротив, обладает лишь весьма относительной жесткостью, удивительным образом совмещая в себе оптимальное взаимное расположение отдельных разнородных функциональных группировок с их динамическими изменениями во времени и пространстве.

Неправильно было бы думать, что те участки молекулы фермента, которые не входят в «активный центр», не выполняют никаких функций и являются своего рода «балластом» — ведь природа не любит расточительства. Такие «периферийные» участки полипептидной цепи фермента ответственны за поддержание его специфической пространственной конфигурации, а следовательно, и за формирование «активного центра»; кроме того, с их помощью достигается вполне определенная локализация фермента в соответствующем районе живой клетки, его взаимодействие с различными структурными элементами этой клетки — клеточными оболочками, внутриклеточными мембранами и т. п.

С другой стороны, и в самом «активном центре» функции и назначения отдельных группировок строго специализированы. Сейчас уже очевидно, что в «активном центре» существуют определенные участки, которые непосредственно вовлечены в связывание субстрата и играют роль своеобразной «посадочной площадки»; эту область часто называют *контактной или «якорной» площадкой фермента*. Как уже отмечалось ранее, специфичность взаимодействия фермента с данным субстратом определяется в значительной мере тем, что по своим пространственным очертаниям контактная площадка очень напоминает молекулу субстрата или, как говорят энзимологи, комплементарна (соответственна) ей. Однако такую комплементарность отнюдь не следует понимать буквально

но, т. е. как взаимоотношение «замка и ключа», хотя таким сравнением очень часто пользовались, особенно на ранних этапах изучения ферментов. На самом деле эти взаимоотношения оказываются намного сложнее. В частности, удалось установить, что в процессе взаимодействия субстрат и фермент способны несколько видоизменять свои пространственные конфигурации, как бы «приоравливаться» друг к другу, обеспечивая большую эффективность взаимодействия. Гипотеза о таком «индуцированном» контакте в процессе образования фермент-субстратного комплекса была впервые высказана американским ученым Кошлендом и сейчас получила экспериментальное подтверждение.

Итак, первый акт ферментативной реакции — это связывание субстрата, его «удобное» размещение на молекуле фермента. Следующий акт — сама реакция. В «активном центре» фермента имеются реакционноспособные группировки, которые «атакуют» связанный субстрат (или субстраты, если их несколько) и осуществляют с ним то или иное химическое превращение. Совокупность таких реакционноспособных групп часто называют *каталитически-активным центром*, молекулы фермента. Воздействие таких групп на субстрат всегда является строго согласованным (кооперативным), синхронным и точно ориентированным в пространстве, и такая сопряженная атака обеспечивает исключительную скорость и полноту химических превращений.

Таким образом, нам уже становятся более или менее понятными причины необычайной эффективности ферментативного катализа и его преимущество по сравнению с обычным, небиологическим катализом. Они кроются в исключительно рациональном сочетании множества факторов, обеспечивающих протекание каталитического акта и обусловленных особенностями строения макромолекулы белка.

Прежде всего — это высокая степень сродства фермента с субстратом, резко повышающая вероятность образования фермент-субстратного комплекса. Если мы рассмотрим какую-либо обычную химическую реакцию между двумя веществами в растворе, то эффективность ее протекания будет зависеть от вероятности встречи, соударения молекул этих двух веществ в растворе. Чем больше концентрация реагирующих веществ, тем больше вероятность такой встречи, тем выше скорость реакции. Эффект направленного сближения фермента и субстрата в этом случае равносильен огромному увеличению концентрации реагирующих веществ и, следовательно, приводит к резкому ускорению превращения.

Во-вторых, это строго ориентированное размещение на ферменте реагирующих молекул субстратов и строго согласованное действие атакующих их реакционноспособных группировок. В фермент-субстратном комплексе активным группам,

осуществляющим реакцию, уже не надо «пристреливаться», они точно наведены на цель (субстрат) и их одновременный «залп» оказывается поэтому исключительно действенным.

Теперь, когда мы рассмотрели принципиальную схему работы фермента, нам уже легче понять и действие различных ингибиторов. Если ингибитор по своим пространственным очертаниям напоминает субстрат (а это так и случается), то он может занять на ферменте «место» субстрата. В этом случае фермент как бы «обманут», он вместо субстрата захватил его «двойника» и субстрат уже не может разместиться на занятом месте; следовательно, ферментативный акт оказывается невозможным.

Одни ингибиторы обладают небольшой агрессивностью — они лишь конкурируют с субстратом за место на «посадочной площадке», причем удерживаются на этой площадке не очень прочно. Если в окружении фермента находится много молекул таких ингибиторов, то субстрату трудно «протолкнуться» через их плотные ряды и вероятность его «приземления» исключительно низка; «посадочная площадка» практически все время занята ингибитором и ферментативная реакция исключается. Напротив, если число молекул субстрата и ингибитора, окружающих фермент, оказывается соизмеримым, то субстрату удается значительно чаще попадать на отведенное ему место; в этом случае реакция ферментативного превращения не прекращается, а лишь замедляется и ее скорость будет зависеть от количества добавленного ингибитора. Такого рода ингибиторы, не вступающие с ферментом в очень прочное взаимодействие и способные лишь «на время» занимать его контактную площадку, носят название *конкурентных ингибиторов*.

Напротив, другие ингибиторы значительно коварнее. «Уместившись» на контактной площадке, они вступают в химическое взаимодействие с отдельными функциональными группами каталитически активного центра, прочно связываются с ферментом и блокируют его; фермент оказывается выведенным из строя. Такие ингибиторы носят название *неконкурентных* или *необратимых*. Как мы уже отмечали, «природные» ингибиторы различного характера, присутствующие в живой клетке, способны специфическим образом регулировать каталитическую активность фермента.

Здесь целесообразно рассмотреть и еще один тип регуляторов действия ферментов. Существуют определенные вещества, которые влияют на ферментативный акт не прямо, т. е. путем внедрения на контактную площадку фермента или блокирования его каталитического центра, а опосредованно. Молекула такого вещества может специфически связываться с каким-то участком белка-фермента, формально удаленным от того центра, где разгрызается сам каталитический акт (на-

пример, с другой субъединицей белка). Однако это воздействие приводит к изменению всей пространственной конфигурации белковой молекулы и в том числе к изменению топологии функциональных группировок непосредственно в «активном центре». Другими словами, вызванный этой посторонней молекулой импульс как бы передается через все «тело» фермента и оказывает воздействие на тот район, где локализуется субстрат; в результате характер ферментативного процесса изменяется — он или ускоряется или замедляется. Такого рода вещества в энзимологии называются «аллостерическими» регуляторами (активаторами или ингибиторами), и они играют очень важную роль во многих ферментативных

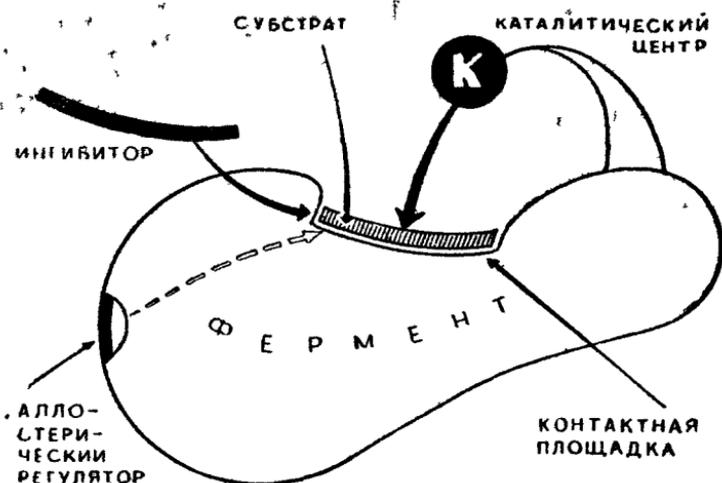


Рис. 17. Схема молекулы фермента

превращениях живого организма. В частности, «аллостерическим» регулятором может быть и сам продукт ферментативной реакции, т. е. продукт, образовавшийся в результате трансформации субстрата, — он может таким образом подать «сигнал» к окончанию реакции. Вообще говоря, реальные взаимоотношения между ферментом, субстратом, активаторами и ингибиторами необычайно сложны и еще далеко не полностью выяснены, но именно они определяют всю поразительную согласованность ферментативного механизма в живой клетке.

На рис. 17 чисто схематически изображена молекула фермента и показано размещение его отдельных функциональных центров и районов воздействия регуляторов,

Итак, фермент работает исключительно сложно и его деятельность регулируется множеством факторов. В то же время он представляет собой удивительно «умную» машину, яркий пример целесообразной деятельности живой природы. Фермент работает быстро, слаженно и неустанно — он воздействует на субстрат, осуществляет его превращение, затем «выбрасывает» продукты превращения и снова готов принять новую молекулу субстрата.

Вполне понятно, что человек хочет не только использовать эту «машину» в своих целях (этому он уже в значительной мере научился, и практическое применение ферментов мы встречаем повсюду в нашей жизни), но и уметь создавать искусственные катализаторы, работающие исключительно специфично и эффективно по образу и подобию ферментов. В этом направлении интенсивно работают ученые, и уже достигнуты первые успехи. Создание многофункциональных катализаторов с заданными свойствами, воспроизводящих принципы действия ферментов, ознаменует собой новый, величайший этап в развитии современной химии и химической технологии. Это еще раз говорит о важности изучения химии ферментов — уникальных биологических регуляторов,

Глава 3

НЕЗАМЕНИМЫЕ ДОБАВКИ К ПИЦЕ

(ВИТАМИНЫ)

Вместо ответа человек показал на свой рот, с усилием растянул вспухшие, почерпавшие губы, и Смок невольно отшатнулся.

— Цинга, — негромко сказал он Малышу, и большой кивком подтвердил диагноз.

— Еды хватает? — спросил Малыш.

— Ага, — отозвался человек с другой койки. — Можете взять. Еды полно.

Джек Лондон.
Ошибка господ бога

Рассказ Джека Лондона «Ошибка господ бога», в котором нарисована яркая картина того, как от истощения, вызванного цингой, погибает большая группа людей, имевших, казалось бы, достаточно пищи, и как многих из них удается спасти небольшими порциями свежего картофельного сока, был написан в 1911 году. Перечитывая сейчас этот рассказ, удивляешься, как ясно Джек Лондон видел причины цинги — отсутствие в консервированных продуктах, которыми питались заболевшие, какого-то вещества, которое находится в картофельном соке. В рассказе, однако, нет столь привычного нам сейчас слова «витамины». Это совершенно естественно, поскольку как раз в том же году была опубликована статья польского ученого Казимира Функа, в которой впервые был введен этот термин. Конечно, фактически изучение витаминов и вызываемых их отсутствием заболеваний (авитаминозов) началось значительно раньше. Так, можно указать, что русский ученый Н. И. Лунин в диссертационной работе, защищенной в 1880 году на Медицинском совете Юрьевского (Тартуского) университета, и в опубликованной в следующем году статье показал, что мыши быстро гибнут, если их кормить пищей, составленной из казеина, молочного жира, сахарозы и дистиллированной воды, но живут при питании молоком. Из этого он сделал вывод, что в молоке, помимо казеина, жира, молочного сахара и солей, содержатся еще другие вещества, незаменимые для питания.

Несколько позднее накопилось много данных о связи некоторых болезней с недостатком в пище определенных групп населения каких-то специфических веществ. Было выяснено,

что пищевой полиневрит (бери-бери, каккэ) связан с неполноценностью пищи. Например, при обследовании рациона 101 тюрьмы на островах Ява и Мадуро было обнаружено, что заболевание пищевым полиневритом, несомненно, стоит в прямой связи с питанием заключенных рисом, очищенным от оболочек. Применение экстракта из отрубей риса спасало больных.

Продолжением этих исследований явились работы К. Функа, который в 1911—1912 годах из рисовых отрубей и дрожжей получил высокоактивные препараты, обладающие в опытах на голубях очень сильной способностью задерживать полиневриты. Функ предположил, что он получил чистый витамин. Как выяснилось позднее, выделение чистого противоположного препарата оказалось очень сложной задачей и в препаратах Функа содержалось лишь около 0,03% действующего начала. Чистые препараты этого биорегулятора (получившего название аневриин или витамина В₁) были получены лишь через 20 лет. Однако работы Функа послужили началом исследований по очистке и химическому изучению витаминов, в результате которых в течение последующих 20—25 лет были получены в чистом виде и изучены почти все главные витамины.

Ниже будет рассказано о наиболее важных витаминах (А, В₁, В₂, В₆, РР, В₁₂, С, D, пантотеновой кислоте, фолевой кислоте, биотине).

Витамин А

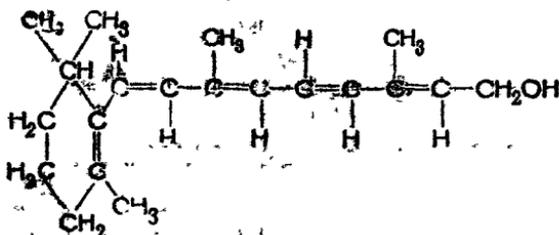
Имеется несколько веществ, обладающих сходными биологическими свойствами, которые обычно объединяют под названием витамин А. Наиболее важным из них является витамин А₁ (ретинол, аксерофтол), очень трудно кристаллизующееся соединение с т. пл. 62—64°. Долгое время основным источником получения витамина А₁ являлась печень морских рыб (трески, палтуса и др.); в ней накапливается витамин, образующийся, по-видимому, в планктонных организмах, которыми питаются рыбы.

Витамин А имеет важное биологическое значение. При его недостатке очень замедляется рост детей и молодых животных, развиваются дегенеративные изменения в нервной системе (в частности, в спинном мозгу и периферических нервах). Одним из первых признаков недостатка витамина А является нарушение зрения («куриная слепота», т. е. резкое падение остроты зрения при неярком освещении), затем может наступить ксерофтальмия (сухость глаза), могущая привести к полной слепоте.

В химическом отношении витамин А₁ и другие витамины этой группы представляют собой сильно ненасыщенные соединения, имеющие в молекуле длинную цепь стоящих черз

одну простых и двойных связей (сопряженную систему двойных связей). Эта особенность рассматриваемых соединений объясняет их малую устойчивость к окислению, а также их участие в процессах зрения.

Витамины A_1 (ретинол) содержит триметилциклогексеновое кольцо, связанное с тетраеновой группировкой, имеющей полностью трансконфигурацию. Строение витамина A_1 может быть выражено следующей формулой:



Изучение биологической активности близких к витамину A_1 соединений позволило установить, что его молекула очень специфична и небольшие изменения в строении приводят к сильному снижению или полной утрате специфического действия. Так, биологическая активность исчезает при изменениях скелета (например, при удалении метильных групп), при полном или частичном гидрировании, при удалении оксигруппы и других изменениях. Активность сохраняется при окислении спиртовой группы до альдегидной группы; образующийся при этом ретиналь входит в состав зрительного пурпура, превращения которого под влиянием света являются основой сумеречного зрения. Расходующийся ретиналь восстанавливается в сетчатке глаза за счет витамина A_1 и продуктов его превращения, поэтому одним из первых проявлений авитаминоза A является появление куриной слепоты.

С практической точки зрения очень важно, что в организме человека и животных витамин A_1 очень легко образуется из распространенного природного пигмента β -каротина, в больших количествах находящегося в некоторых овощах, например в свежей моркови. Поэтому для обеспечения животных витамином A_1 можно с успехом давать им каротин, который легко образуется также некоторые микроорганизмы, в частности гриб *Blakeslea trispora*. Таким образом, в настоящее время потребности в витамине A обычно покрываются двумя путями — либо путем химического синтеза самого витамина A_1 , либо путем микробного синтеза β -каротина.

Витамин B_1

В начале этой главы уже говорилось, что началом систематических исследований по очистке и химическому изучению витаминов явились работы Функа по получению высокоактивных препаратов, способных предотвращать и излечивать заболевание полиневритом. Это вещество было затем названо витамином B_1 (тиамином, аневрином). Вскоре было выяснено, что полученный К. Функом препарат содержит очень много

загрязнений, и потребовалось еще 20 лет, чтобы получить витамин В₁ в чистом виде. Основные этапы очистки этого вещества приведены в таблице 2.

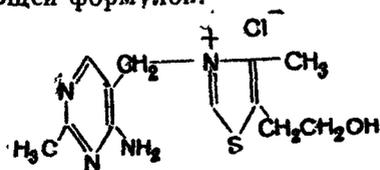
После многолетних исследований, связанных с изолированием витамина В₁ в чистом виде, его последующее химическое изучение развивалось неожиданно быстро. Уже в 1936 году две независимые группы исследователей полностью выяснили его строение, в том же году подтвержденное его синтезом.

В химическом отношении витамин В₁ представляет собой бициклическое четвертичное основание, содержащее тиазольную и пиримидиновую гетероциклические кольчатые группы-

Таблица 2
Основные этапы очистки витамина В₁

Год	Исследователи	Источник препарата	Примерное содержание витамина В ₁ в препарате, в %
1911	Функ	Рисовые отруби, дрожжи	0,03
1918	Абдерхальден	Дрожжи	0,06
1924	Зейдель	Дрожжи	0,12
1928	Книнерслей и Пнтерс	Дрожжи	8
1929	Гуха и Дреммонд	Зародыши пшеницы	25
1932	Виндаус и сотр.	Дрожжи	100

ровки (содержащие в цикле соответственно атомы азота и серы и два атома азота). Строение витамина В₁ может быть выражено следующей формулой:



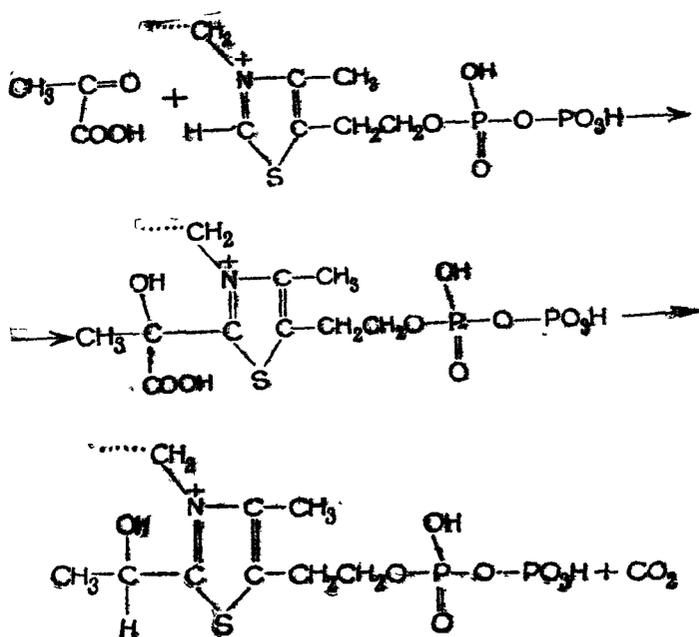
Наличие в молекуле витамина В₁ тиазольного цикла и аминогруппы привело к его распространенному химическому названию — тиамин; другое обычное название витамина В₁ — аневрин — связано с его важной ролью в предотвращении и лечении ряда расстройств нервной системы. Как уже было упомянуто в начале этой главы, открытие витамина В₁ явилось следствием изучения причин ряда тяжелых заболеваний нервной системы, развивавшихся у человека при условиях неполноценного питания (развитие бери-бери в тюрьмах Индонезии при питании заключенных так называемым «белым» или «полированным» рисом, лишенным оболочек, в которых содержится витамин В₁). Аналогичные заболевания (полиневриты) наблюдались и в других случаях, когда люди получали пищу с малым содержанием этого витамина.

Очень сходную картину В₁-авитаминоза можно получить у экспериментальных животных (голуби, крысы и др.), если их выдерживать некоторое время на диете, в которой отсутствует витамин В₁. При этом у животных (как и у человека) происходит постепенное ослабление мышц, затем наблюдаются распад нервных волокон и дегенеративные изменения в продолговатом и спинном мозгу. Витамин В₁ синтезируется рядом растений и микроорганизмов, вследствие чего они не нуждаются во введении витамина извне. Образование витамина В₁ микрофлорой желудка жвачных объясняет, почему у этих животных обычно не бывает признаков В₁-авитаминоза. Однако изучение механизма действия витамина В₁ показывает, что он необходим для жизнедеятельности всех живых организмов — от бактерий до человека.

В настоящее время витамин В₁ в больших количествах производят путем химического синтеза. Наиболее обычный метод синтеза заключается в создании отдельно тиазоловой и пиримидиновой частей молекулы с их последующей конденсацией. Довольно сложное строение витамина В₁ и многостадийность его синтеза стимулировали изыскание его более просто построенных аналогов с близким биологическим действием. При этом, однако, была установлена очень высокая специфичность его молекулы — почти все ее изменения приводили к очень сильной или даже к полной потере биологической активности. Лишь замена метильной группы в пиримидиновом кольце на этильную приводит к некоторому усилению активности. Ряд аналогов витамина В₁, имеющих лишь небольшие отличия в строении, являются его сильными антагонистами, например гомолог витамина В₁ (содержащий вместо оксиэтильной группировки несколько более длинную оксипропильную группировку), окситамиин (в котором аминогруппа пиримидинового кольца заменена на гидроксил), а также соединения, у которого вместо тиазольного цикла находится пиридиновый остаток с такими же заместителями.

В настоящее время значительно прояснилась биологическая роль витамина В₁. Установлено, что в форме пирофосфатного производного (тиаминпирофосфата, кокарбоксилазы), он входит в состав ряда важнейших ферментов, участвующих в обмене таких необходимых метаболитов, как пировиноградная кислота (СН₃СОСООН), кетоглутаровая кислота и другие кетокислоты. Например, витамин В₁ активно участвует в декарбоксилировании пировиноградной кислоты в уксусную кислоту; решающую роль играет при этом, очевидно, незамещенный водород тиазольного цикла. Этот процесс можно изобразить схемой, приведенной на стр. 63.

Получающееся α-оксиэтильное производное тиаминпирофосфата претерпевает дальнейшие изменения, зависящие от природы белковой части фермента. В случае декарбоксилазы



образуется ацетальдегид; при наличии пироватдегидрогеназы вначале имеет место окисление до ацетильного производного, которое затем распадается с переносом ацетильной группы на соответствующий субстрат и т. д. Таким образом, витамин В₁ оказался важнейшей составной частью ферментов, участвующих в метаболизме пировиноградной и других кетонислот. При отсутствии или недостатке витамина В₁ пировиноградная кислота не усваивается и накапливается в организме, что ведет к его отравлению и появлению вышеупомянутых расстройств (В₁-авитаминоз).

Витамин В₂ (рибофлавин)

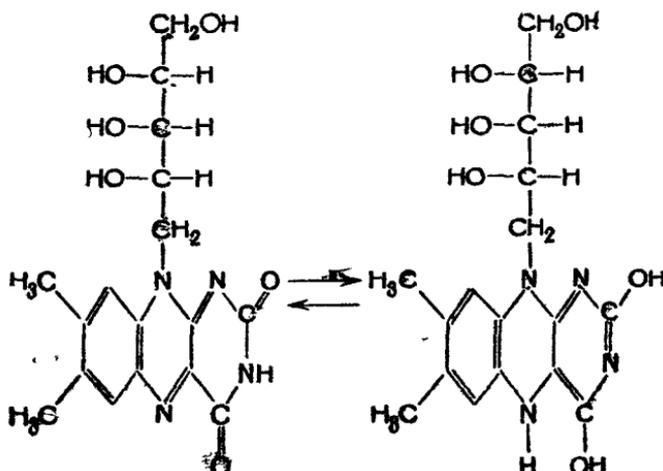
Изучение витамина В₂ с самого начала велось в тесной связи с изучением важной группы флавиновых ферментов, осуществляющих реакции дегидрогенизации и окисления. Первые не вполне очищенные препараты вещества, затем получившего название витамина В₂ (рибофлавина), были получены при расщеплении одного из ферментов этой группы. Вскоре было обнаружено, что полученное соединение широко распространено в природе и имеет очень большое значение для жизнедеятельности разнообразных организмов — бактерий, дрожжей, растений, животных и человека. Его отсутствие или недостача приводит к серьезным расстройствам и да-

же гибели животных, которые не способны его синтезировать. У человека первыми признаками арибофлавиноза (отсутствия этого витамина) является поражение кожи (в особенности лица, в частности в области губ). Появляются трещины, которые мокут и покрываются желтой коркой. Позднее развивается поражение глаз и кожи, сопровождающееся отпадением ороговевших чешуек. В дальнейшем могут развиваться злокачественное малокровие, поражение нервной системы, внезапные падения кровяного давления, потери сознания, судороги.

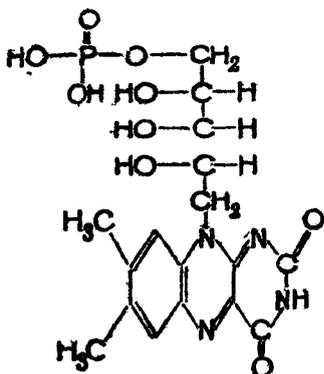
Многообразие патологических явлений, наблюдаемых у человека и животных при отсутствии или недостатке витамина В₂, определяется той большой ролью, которую он играет в функционировании многих окислительных ферментов.

В настоящее время известно уже более 40 различных ферментов, выделенных из самых различных источников (бактерии, дрожжи, растения, змеиный яд, сердечная мышца, печень и почки животных), активность которых обусловлена наличием в них витамина В₂. К ним относятся ферменты, регулирующие окисление сахаров (глюкозооксидаза), кислот (щавелевой, янтарной, пировиноградной и др.), аминокислот, а также соединений, содержащих гидроксиламино-, интрузо- и нитрогруппы, и многих других. Интересно отметить, что многие из флавиновых ферментов требуют для проявления своей активности одновременного присутствия ионов металлов (железа, молибдена и др.).

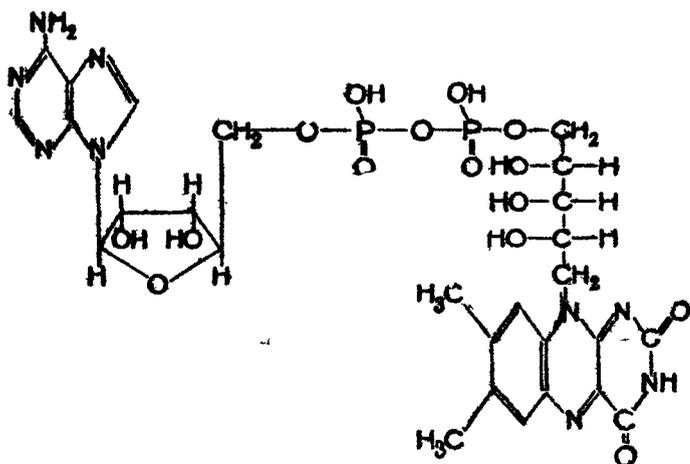
В химическом отношении витамин В₂ представляет собой сложное гетероциклическое соединение — производное изоаллоксазина, содержащее остаток углевода рибозы, входящего также в состав нуклеиновых кислот. Его строение может быть выражено следующей структурной формулой (1); наличие в витамине В₂ остатка рибозы является причиной его распространенного названия — рибофлавин.



Его характерной особенностью является легкое обратимое восстановление в восстановленную форму 2; с этим превращением связана способность легко передавать водород. В состав большинства флавиновых ферментов витамин В₂ (рибофлавин) входит обычно не как таковой, а в форме своих производных — фосфорнокислого эфира (флавиномононуклеотида) и сложного соединения с аденином (флавинадениндинуклеотида).



Флавиномононуклеотид



Флавинадениндинуклеотид

Строение витамина В₂ (рибофлавина) очень специфично и практически все изменения ведут к сильному снижению или полному исчезновению биологической активности. Более того, ряд сравнительно небольших изменений его молекулы приводит к образованию веществ, обладающих резко выраженными антагонистическими свойствами, например, при замене одной из метильных групп на атом хлора, при перемещении одной из метильных групп в соседнее положение или при изменении характера углеводного остатка получаются соединения, подавляющие действие рибофлавина.

Витамины РР (никотинамид)

Обычно история изучения витаминов складывается из нескольких последовательных этапов. Вначале при изучении какого-либо авитаминоза обнаруживают вещество, обладающее защитным действием. Это вещество постепенно очищают и, наконец, получают в гомогенном состоянии. После этого выясняют его строение и разрабатывают метод его синтеза. С другой стороны, ведется изучение механизма его действия, которое привело к принципиально важному выводу, что витамины входят в состав некоторых ферментов. Такова довольно общая схема изучения ряда витаминов.

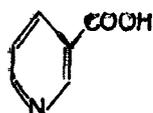
Однако в случае противопеллагрического витамина (витамина РР) последовательность этих стадий оказалась совершенно иной. Действительно, строение и синтез никотиновой кислоты были изучены еще в XIX столетии; в 1934 году было обнаружено, что никотиновая кислота (ее амид) входит в состав ряда ферментов, и лишь после этого (в 1937—1938 гг.) было установлено, что она и ее амид являются важным витамином.

Отсутствие никотиновой кислоты ведет к тяжелому заболеванию — пеллагре, которая была очень распространена в Италии, Румынии, Франции, США и других странах среди тех групп населения, для которых основным источником питания служила кукуруза.

У больного пеллагрой (по-итальянски *pele agra* — шершавая кожа) вначале резко падает аппетит, появляется быстрая утомляемость, апатия, бессонница. Затем развиваются поносы и изменения в полости рта. На коже появляются красные пятна (обычно симметрично расположенные на тех частях тела, которые подвергаются действию света). Постепенно они темнеют и распухают и резко отграничиваются от здоровых участков кожи. Эти изменения внешне напоминают проказу, вследствие чего пеллагра называлась также «ломбардской проказой». При далеко зашедших случаях пеллагры поражается нервная система — теряется вкус, появляются шумы в ушах, нарушение рефлексов и психические расстройства.

При изыскании средств лечения пеллагры было обнаружено, что экстракты из коровьей печени оказывают благотворное действие. Затем из них удалось выделить небольшие количества кристаллического вещества, которое, к изумлению ученых, оказалось давно известной никотиновой кислотой. Проверка антипеллагрического действия совершенно чистой синтетической никотиновой кислоты показала, что она (в природе обычно встречается ее амид) действительно очень быстро излечивает пеллагру.

Строение никотиновой кислоты и ее амида (природного



Никотиновая кислота

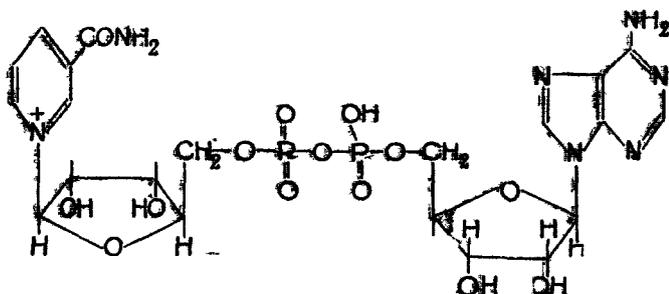


Никотинамид

витамина РР) очень просто: она является β -пиридинкарбоновой кислотой.

Несмотря на простоту строения, никотиновая кислота очень специфична — никакие ее изомеры не обладают витаминной активностью; лишь некоторые ее производные, способные превращаться в нее, обладают меньшей активностью.

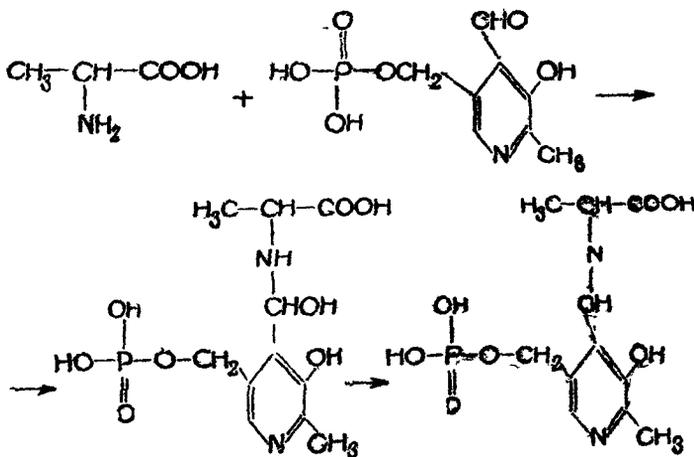
Как уже отмечалось, роль никотиновой кислоты в жизни человека и животных была выяснена еще до открытия ее антиислугрических свойств, когда было обнаружено, что она (в форме амида) входит в состав ряда ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах организма. Ниже приведено строение соответствующего кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД), называвшегося ранее козимазы, кофермент I или дифосфопиридиндинуклеотид.



Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и его фосфорный эфир (НАД-Ф) легко вступают в окислительно-восстановительные реакции, обеспечивая перенос водорода, эти превращения имеют очень большое значение в жизни человека и животных, поэтому понятно, что недостаток никотиновой кислоты столь пагубно отражается на организме. Суточная потребность в никотиновой кислоте (ее амиде) составляет для человека 20—30 мг. У некоторых животных потребность в никотиновой кислоте можно в известной мере покрыть аминокислотой триптофаном, который способен в организме превращаться в никотиновую кислоту; поэтому некоторые исследователи считают триптофан провитамином РР.

Витамин В₆

Под общим названием «витамин В₆» обычно понимают группу родственных по химическому строению и биологическому действию производных пиридина, отличающихся строе-



ствия аминогруппы аминокислоты и альдегидной группы фосфопиридоксала.

В зависимости от строения белковой части энзима, принимающего участие в реакции, образовавшееся шиффово основание может претерпеть различные превращения. Так, под влиянием аминотрансферазы (трансаминазы) на него может образоваться пиридиноградная кислота (CH₃СОСООН), а аминогруппа будет передана на соответствующий субстрат; в итоге получится аминокислота. В случае декарбоксилаз то же промежуточное шиффово основание расщепляется до аммиака или альдегида. Конкретное значение этих различий в строении белковой части ферментов еще не выяснено.

Таким образом, на примере витаминов группы В₆ четко показано, что в ряде совершенно различных энзиматических реакций может участвовать один и тот же кофермент, причем тип протекающей реакции зависит не только от него, но и от строения остальной (белковой) части фермента.

Пиридоксаль и пиридоксамин в биологических процессах легко превращаются друг в друга и поэтому равноценны. В остальном же строение витаминов В₆ очень специфично — замена метильной группы атомом водорода или другими алкильными группами приводит к полной или очень значительной инактивации. Активность исчезает также при замещении или удалении фенольного гидроксила и других изменениях молекулы. Некоторые аналоги пиридоксина, пиридоксамин и пиридоксаль обладают сильными антагонистическими свойствами. Неоднократно делались попытки использовать их для подавления роста болезнетворных бактерий, нуждающихся в витаминах В₆, но ни один из них не нашел практического применения.

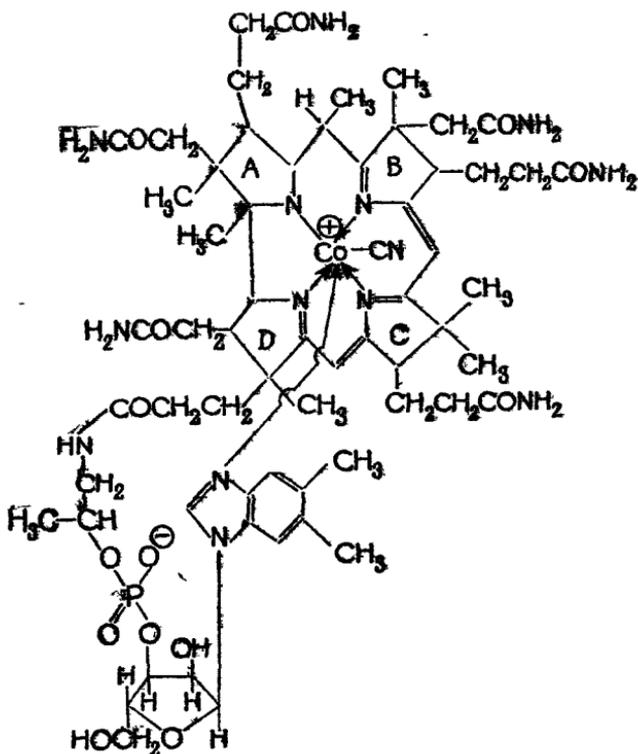
Значительно более сильными антагонистами витамина В₆ оказались противотуберкулезный антибиотик циклосерин и

его синтетические аналоги. Механизм подавления ими фосфо-
 пиридоксальных ферментов будет кратко рассмотрен в гла-
 ве 5.

Витамин В₁₂

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) представляет один из наи-
 более сложных витаминов, строение которого уже определе-
 но, но синтез еще не осуществлен.

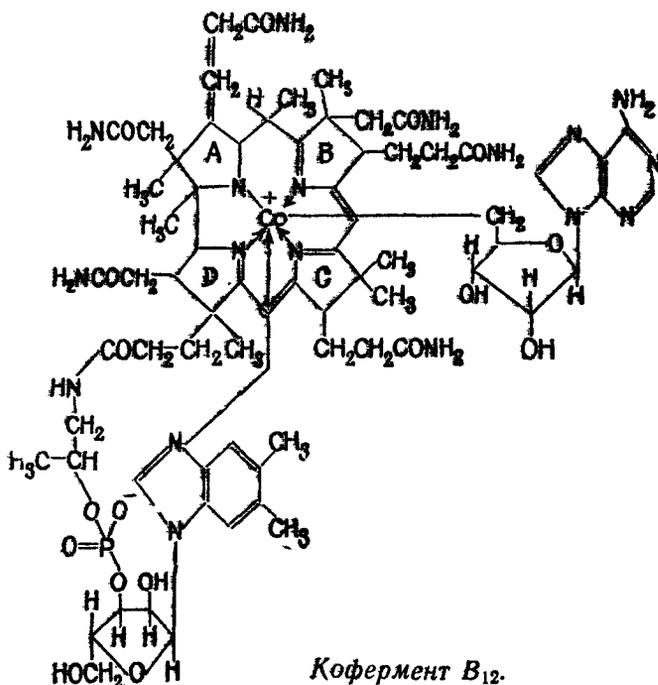
Как можно видеть из приведенной формулы, витамин В₁₂
 имеет сложную порфириновую систему, подобную тем, кото-
 рые содержатся в биологически важных красителях хлоро-
 филлах и геме — активной части гемоглобина, находящегося
 в эритроцитах. Подобно последним эта часть молекулы имеет
 координационно связанный атом металла, в данном случае
 кобальта (хлорофиллы содержат магний, а гем — железо).
 Биологическая активность витамина В₁₂ очень велика — в
 ничтожных количествах (0,01γ раз в трое суток) он предот-
 вращает и излечивает развитие злокачественной (пернициоз-
 ной) анемии, которая до его открытия практически всегда
 приводила к смертельному исходу. Кроме того, витамин В₁₂



оказывает большое влияние на протекание различных биохимических процессов: он предотвращает (вместе с холином) отложение жира в печени, стимулирует кроветворение после лучевого поражения и др. Он успешно применяется также при лечении некоторых невралгических заболеваний.

Поскольку синтез витамина B_{12} еще не осуществлен, его получают главным образом путем микробиологического синтеза. Вначале его извлекали из культуральной жидкости продуцента стрептомицина, но потом было установлено, что экономически более выгодна специально направленная ферментация некоторых бактерий. В животном организме он содержится в ничтожных количествах (например, из 1 т свежей говяжьей печени можно извлечь лишь около 28 мг чистого витамина).

Из природных источников, а также путем специальных опытов с образующими витамин B_{12} микроорганизмами (которым давали предшественники витамина B_{12} или его аналогов) удалось выделить большое число сходно построенных соединений, отличающихся либо заменой группы CN на другие группировки (нитрогруппу, оксигруппу и др.), либо заменой остатка диметилбензимидазола на сходные группировки. Ни одно из этих соединений не превосходит цианкобаламин по активности.



Кофермент B_{12} .

Как и многие иные витамины, цианкобаламин (B_{12}) имеет большое значение для некоторых энзиматических реакций. Так, в форме «кофермента B_{12} » или «ДВС-кофермента» (отличающегося от цианкобаламина тем, что цинк в нем замещен на 5'-дезоксаденозин) он входит в состав ряда ферментов, осуществляющих перенос метильных групп и обусловленную этим изомеризацию некоторых важных субстратов, например метилмалонилкоэнзима А в сукцинилкоэнзим А или метиласпарагиновой кислоты в глутаминую.

Витамин С (аскорбиновая кислота)

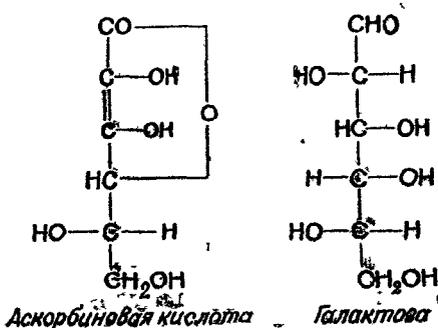
Ознакомление с письменными историческими материалами показывает, что цинга была известна человечеству очень давно. Она поражала множество людей, в особенности во время войн (осад и долгих походов), морских путешествий, голодных лет. Например, во время экспедиции Васко да Гама в поисках морского пути в Индию в 1495 году из 160 участников плавания от цинги погибло более 100 человек. На каждом корабле оставалось по семь-восемь здоровых человек. Анонимный автор дневника экспедиции записал: «Я заверяю всех, что, если бы подобное положение продолжалось еще две недели, не осталось бы людей для управления кораблями. Мы дошли до такого состояния, что исчезли все узы дисциплины. Мы молили святых покровителей наших судов. Капитаны посовещались и решили, если позволит ветер, вернуться обратно в Индию».

Цинга неоднократно свирепствовала и в России. Например, в 1849 году во время голода в нескольких губерниях заболело цингой более 260 тыс. человек, причем более 60 тыс. погибло. Во время героической обороны Порт-Артура около половины гарнизона болело цингой.

Причины этой болезни были долгое время непонятны. Еще в начале XX века большинство врачей склонялось к мнению о ее инфекционной природе (неоднократно описывали даже ее возбудителей!) или что она вызывается недостатком калия в пище. Постепенно, однако, становилось все более ясно, что цинга является следствием отсутствия в пище какого-то специфического малоустойчивого фактора, находящегося в свежих овощах, плодах и т. д. В 1928 году этот фактор был выделен в чистом состоянии и получил название витамина С, или аскорбиновой кислоты. Правильное строение аскорбиновой кислоты было выяснено в 1933 году; в том же году был осуществлен ее полный синтез различными группами исследователей. В химическом отношении аскорбиновая кислота близка моносахаридам — гексозам, содержащим прямую цепь из 6 атомов углерода. Строение витамина С можно выразить структурной формулой, приведенной на стр. 73; сравнение с формулой галактозы показывает их близость.

Наиболее характерной химической особенностью аскорбиновой кислоты являются ее резко выраженные восстанавли-

вающие свойства. Вследствие этого она малоустойчива, так как быстро окисляется и теряет биологическую активность. В организме аскорбиновая кислота обычно вначале окисляется до ближайшего к ней соединения — дегидроаскорбиновой кислоты, которое под влиянием ряда веществ может быть обратно восстановлено в исходный витамин С. Биологическая активность аскорбиновой кислоты тесно связана с ее способностью участвовать в такого рода обратимом окислении — восстановлении. Однако аскорбиновая кислота легко окисляется дальше или расщепляется иным путем, необратимо утрачивая свои биологические свойства. Поэтому ее обычно мало в долго хранившихся продуктах.



Она широко распространена в природе, находясь во многих овощах и фруктах, в хвое, в печени и других тканях животных. Аскорбиновая кислота может быть выделена из многих природных источников, но практически ее удобнее получать синтетически, исходя из D-глюкозы, которая при восстановлении ее альдегидной группы превращается в соответствующий спирт D-сорбит. Последний микробиологическим путем окисляется в L-сорбозу, из которой химическим путем получают аскорбиновую кислоту. Производство этого витамина представляет один из характерных примеров получения ценного препарата путем поочередного проведения чисто химических и микробиологических превращений органического соединения.

Громадное значение аскорбиновой кислоты для организма человека и животных связано с ее специфическими восстановительными свойствами; по-видимому, многие ферменты активируются путем взаимодействия с этим витамином. Возможно, что в ряде случаев благодаря способности к обратимому окислению — восстановлению аскорбиновая кислота и непосредственно участвует в переносе водорода на различные жизненно важные низкомолекулярные субстраты.

Во всяком случае при недостатке этого витамина в организме быстро развиваются многие патологические процессы.

Обычно болезнь начинается с общего недомогания и чувства угнетенности. Начинают кровоточить десны, затем появляются небольшие, постепенно все увеличивающиеся кровоподтеки на теле. На последних стадиях заболевания появляются язвы на деснах и на коже, выпадают зубы, западает грудина. Как уже указывалось выше, раньше очень часто цинга приводила к смертельному исходу.

Витамины группы D

Одной из наиболее распространенных болезней детского возраста, в некоторых странах поражающей более половины детей в возрасте до 5 лет, является рахит. Наиболее типичные проявления этого заболевания — резкие изменения в формировании костей, а отсюда сильные деформации скелета. При ярко выраженном рахите кости (особенно черепа и конечностей) сильно размягчаются. Кости черепа, в особенности затылочная и теменные, теряют прочность, становятся мягкими и податливыми. Затем на размягченных участках черепа откладывается особая губковидная ткань, из которой затем образуются гипертрофированные теменные и лобные бугры. Поскольку берцовые кости также оказываются размягченными, наблюдаются типичные искривления ног. Поражаются также остальные части скелета, замедляется прорастание зубов. Резко ослабляются мускулы. Недостаток кальция в крови может вести к судорогам.

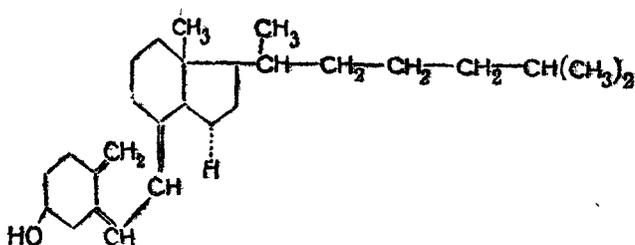
Все эти тяжелые поражения связаны в первую очередь с отсутствием или недостатком в организме особого противорахитического витамина — витамина D. Потребность организма ребенка в этом витамине очень мала — нормально человек должен получать ежедневно около 5—10 микрограммов (0,005—0,01 мг) витамина.

Интенсивное изыскание противорахитических факторов началось в 20-х годах нашего столетия и вначале привело к очень противоречивым выводам. Было найдено, что значительным противорахитическим действием обладают столь различные воздействия, как освещение солнечным или ультрафиолетовым светом и прием рыбьего жира. Затем было установлено, что эти, казалось бы, столь далекие факторы в действительности тесно связаны. Выяснилось, что в рыбьем жире содержится вещество, которые возникают также в организме при его облучении. Они получили название провитаминов D, а само противорахитическое вещество — витамина D. Вскоре было установлено, что провитамины D являются веществами стероидной природы.

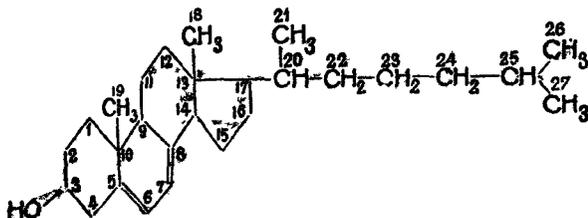
После долгих поисков, которые вначале завели в тупик, было установлено строение провитаминов D, а затем и самого витамина. При этом выяснилось, что похожей биологиче-

ской активностью обладает целая группа очень сходно построенных веществ, из которых наиболее сильным действием обладает витамин D₃ (холекальциферол), строение которого изображено ниже. Другие вещества, обладающие сходной активностью (витамины D₂, D₄, D₅, D₆, D₇), отличаются строением боковой цепи.

Все витамины группы D являются малоустойчивыми соединениями. Они легко возникают из их предшественников при облучении ультрафиолетовым светом (правда, вместе с целым рядом биологически неактивных изомеров). Так, витамин D₃



может получаться при облучении 7-дегидрохолестерина, содержащегося в нервных и жировых тканях человека, а также в коже, где он составляет до 4% содержания стеренов.



7-дегидрохолестерин

Фотохимическое превращение 7-дегидрохолестерина в витамин D₃ и объясняет противорахитическое действие солнечного света или ультрафиолетового облучения.

Хотя активность витаминов группы D очень велика, молекулярный механизм их действия в настоящее время достоверно не известен.

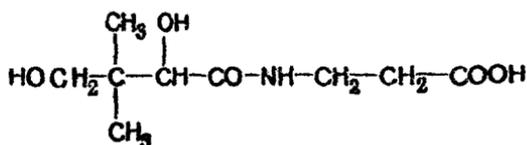
Пантотеновая кислота (витамин B₃)

Пантотеновая кислота является одним из самых важных витаминов, безусловно необходимых для нормального развития человека, млекопитающих, птиц и многих микроорганизмов. При ее отсутствии у подопытных животных быстро развивается недостаточность надпочечников, что ведет к резкому

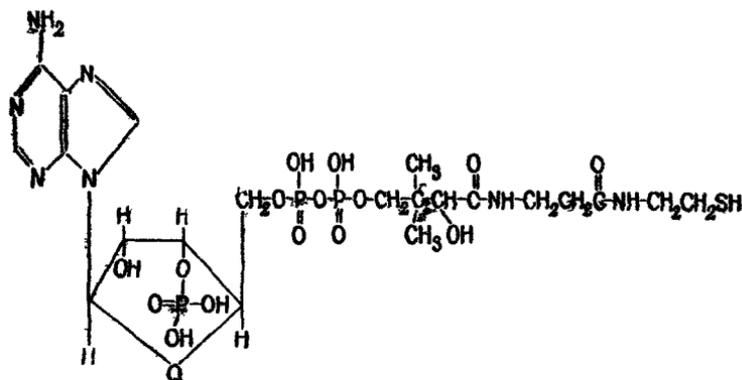
снижению выработки ряда необходимых для жизнедеятельности гормонов. У животных наблюдаются многочисленные патологические явления — учащаются дыхание и сердцебиение, начинаются конвульсии, развивается характерное раннее поседение, наблюдаются поражения центральной нервной системы. Животные, полностью лишенные пантотеновой кислоты, погибают при явлениях общей прострации.

У человека явления острой недостаточности пантотеновой кислоты наблюдаются сравнительно редко, хотя и описаны случаи тяжелого периферического неврита, связанные с недостатком этого витамина. В этих случаях излечение быстро наступало при ежедневном введении пантотеновой кислоты. Ежедневная потребность человека в этом витамине составляет около 10 мг в сутки; для кормящих матерей и лиц, занятых тяжелым физическим трудом, потребность в витамине больше — около 20 мг в сутки. В значительной мере потребность в пантотеновой кислоте покрывается за счет пищи, что связано с очень широким распространением этого витамина в природе. По этой же причине, очевидно, редко наблюдаются случаи острого авитаминоза.

В химическом отношении пантотеновая кислота является производным редкой аминокислоты — β-аланина. Ее строение может быть выражено следующей структурной формулой:



Громадное биологическое значение пантотеновой кислоты определяется тем, что она входит в состав кофермента А, строение которого изображено ниже. Как и в ряде других случаев, помимо пантотеновой кислоты, в его состав входит



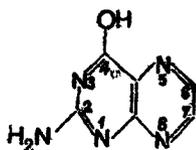
остаток фосфорилированной адениловой кислоты, а также остаток β-аминоэтилмеркаптана.

Кофермент А играет большую роль в обмене жиров и углеводов, в частности в переносе ацильных остатков (ацетильной группы); он входит в состав фермента цикла лимонной кислоты, фермента расщепления и синтеза жирных кислот; он участвует также в ряде биохимических процессов у разнообразных живых организмов от микробов до человека. Все это объясняет значение и широкое распространение пантотеновой кислоты в природе.

Витамины группы фолевой кислоты

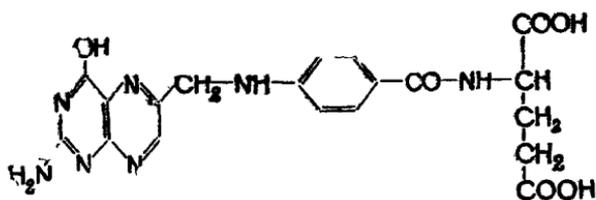
Подобно пантотеновой кислоте витамины группы фолевой кислоты широко распространены в природе и играют значительную роль в клеточном делении, кровообразовании и других важных процессах, протекающих в организме. В отличие от пантотеновой кислоты в данном случае имеется не одно, повсеместно распространенное соединение, а целая группа сходных веществ. Это обстоятельство долго вызывало большую путаницу, так как было описано много сходных, но в то же время неидентичных витаминов (витамины В₁₂, витамин М, фолевая кислота, фолиновая кислота и др.). Ниже мы остановимся подробно лишь на одном, наиболее важном представителе этой группы — фолевой кислоте. Под таким названием был описан в 1941 году антианемический фактор, выделенный из листьев (*folium* — латинское — лист) шпината. В дальнейшем оказалось, что это соединение необходимо для нормального развития ряда животных и человека. Недостаточность фолевой кислоты приводит к такому заболеванию, как трофические афты (спру), выражающемуся в многодневных утренних поносах, появлению на языке специфических язв (афт) и т. д. Недостаточность фолевой кислоты играет значительную роль в развитии ряда анемий, лечение которых осуществляется одновременным введением как этого соединения, так и витамина В₁₂.

Фолевая кислота (и все близкие к ней природные вещества, обладающие сходным действием) является производным гетероциклического соединения — птерина (2-амино-4-окси-птеридина).



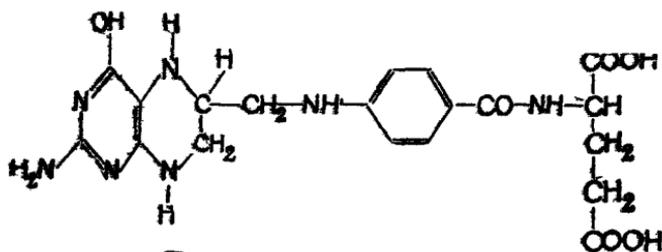
В состав фолевой кислоты входят также остатки парааминобензойной кислоты и глутаминовой кислоты. Ее называют

также L-птероилглутаминовой кислотой или витамином В_с, а ее полное строение может быть выражено следующей формулой:



Фолевая кислота

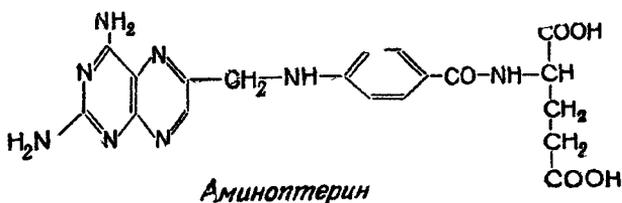
Производное фолевой кислоты — ее восстановленная форма (тетрагидрофолат, ТГФ) — входит в состав большого числа ферментов, осуществляющих перенос одноуглеродных остатков — метильной, оксиметильной, формильной и других групп (к ним относятся, например, такие ферменты, как серин-оксиметил-трансферазы, формилглутамат-трансферазы и многие другие). Восстановление фолевой кислоты в тетрагидрофолевую кислоту происходит очень легко в присутствии специфических ферментов. Строение тетрагидрофолевой кислоты указано ниже.



Тетрагидрофолевая кислота

Поскольку фолевая кислота и другие родственные ей витамины играют большую роль в клеточном делении, подавление ее активности может очень сильно влиять на деление клеток. С этой целью были подробно изучены ее антагонисты, т. е. вещества, очень сходные с ней, которые могут вытеснять ее из соответствующих энзиматических систем и тем самым блокировать их. Одним из таких очень сильных антагонистов фолевой кислоты (антифолевым препаратом) является аминокптерин, отличающийся от фолевой кислоты тем, что оксигруппа в положении 4 (имеющаяся в фолевой кислоте) заменена в нем на аминогруппу.

Это соединение обладает сильно выраженными противоопухолевыми (в частности, антилейкозными) свойствами в



опытах на животных, но высокая токсичность ограничивает его использование в качестве лечебного противоракового средства.

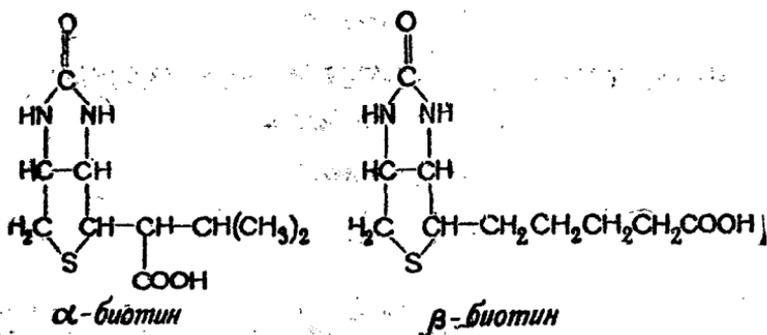
Биотин

Одним из широко распространенных в природе и очень активных витаминов является биотин (витамин Н). Это соединение необходимо не только для животных, но и для микроорганизмов и высших растений. Активность биотина удивительна: он стимулирует рост некоторых рас дрожжей в концентрации 0,002γ/л, т. е. стимулирование можно обнаружить при разведении 1γ (0,001 мг) в 500 л воды. Суточная потребность человека в биотине также очень мала — порядка 5—10γ в сутки. Такая исключительно высокая активность биотина и его широкое распространение в природе обычно не позволяют развиваться авитаминозам, вызванным недостатком этого соединения, хотя его роль в процессах жизнедеятельности очень велика.

Проявления сильной биотиновой недостаточности замечаются в случае содержания животных на диетах, из которых тщательно удален биотин. В этих условиях у них развиваются признаки авитаминоза: бледно-серая окраска кожи и слизистых, специфическое шелушение кожи, затем потеря аппетита, слабость мышц, сонливость, общий упадок сил. После введения биотина быстро наступало излечение. У человека недостаточность биотина наблюдается только в случаях питания сырыми куриными яйцами, в которых содержится особый белок — авидин, очень прочно связывающий биотин.

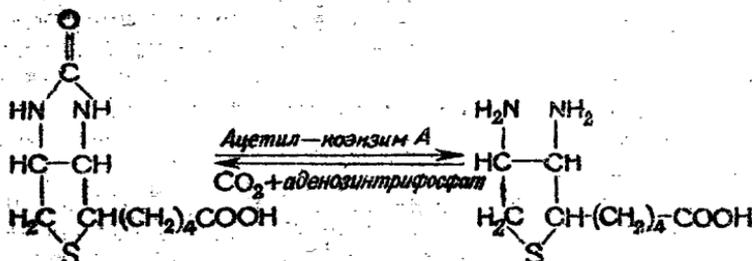
Ввиду очень высокой биологической активности биотина и малого содержания в природных объектах его получение в чистом виде оказалось очень трудоемкой задачей. Первые чистые образцы кристаллического метилового эфира биотина в количестве 1,1 мг были получены после обработки 250 кг сухих яичных желтков.

В настоящее время установлено, что одинаковым биологическим действием обладают два изомерных (имеющих одинаковый состав, но различное строение) серусодержащих соединения — α-биотин и β-биотин.



Из них наиболее изучен β -биотин, для которого разработано несколько способов синтетического получения.

Подобно ряду других вышеописанных витаминов биотин является составной частью многих важных ферментов, в частности ряда карбоксилаз, осуществляющих включение CO_2 или перенос карбоксильной группы. Предполагается, что перенос карбоксильной группы осуществляется за счет обратимого разрыва цикла при участии ацетил-коэнзима А и обратного замыкания в присутствии аденозинтрифосфата, как это изображено на нижеследующей схеме:



Другие витамины

В данной книге нецелесообразно рассматривать все известные к настоящему времени витамины. Некоторые из них имеют большое значение для человека и животных (витамины К, Е и др.), но еще мало изучен их молекулярный механизм действия. Другие еще недостаточно изучены или само их витаминное действие оспаривается (пара-аминобензойная кислота, витамины В₇, В₁₀, В₁₁, В₇, Т и др.). Наконец, само понятие «витамин» несколько неясно и некоторые соединения (например, холин) одними исследователями относятся к витаминам, другими нет.

Поэтому мы ограничились рассмотрением ряда вышеописанных витаминов, считая, что на их примере читатель смог получить общее впечатление об этой важной группе биорегуляторов.

Глава 4

ФАКТОРЫ САМОРЕГУЛИРОВАНИЯ ОРГАНИЗМА

(гормоны)

Прежде чем можно будет осуществить или даже говорить о каком-то регулировании, мы должны знать, что здесь существенно и что требуется. Любой биологический вид имеет свои требования: дощка должна быть сухой, рыба должна быть мокрой.

У. Росс Эшби
Введение в кибернетику

Одна из удивительных особенностей живого организма — ярко выраженная способность поддерживать постоянное состояние, высокая степень саморегулирования, которую пока не удается достичь в самых совершенных автоматических установках. Живой организм обладает целым набором систем саморегулирования, одной из которых является химическое регулирование посредством специфических веществ — гормонов (греческий корень слова гормон означает возбуждать, приводить в движение).

У человека и высших животных имеется ряд специальных органов (эндокринных желез или, как их раньше называли, «желез внутренней секреции»), которые вырабатывают и направляют в кровь или лимфу особые вещества, являющиеся внутренними химическими регуляторами многочисленных биологических процессов, происходящих в организме. У человека различные гормоны вырабатываются щитовидной железой (тироксин и родственные йодированные аминокислоты), паращитовидными железами (особый гормон, регулирующий обмен кальция и фосфора), надпочечниками (адреналин, стероидные гормоны, регулирующие либо обмен углеводов, либо содержание неорганических ионов в крови), поджелудочной железой (инсулин, глюкагон), гипофизом (большое число пептидных и белковых гормонов, регулирующих ряд функций), семенниками и яичниками (половые гормоны); некоторые гормоны образуются в кишечнике и желудке.

Нарушение функций эндокринных желез, проявляющееся в образовании уменьшенного (гипофункция) или увеличенного (гиперфункция) количества гормонов, обычно приводит

к серьезным заболеваниям, подчас трудно определяемым и трудно излечиваемым.

Изучение эндокринных желез, их функций, биологического значения образуемых ими гормонов, течения и лечения эндокринных заболеваний составляет предмет *эндокринологии*. В нашей небольшой книге в соответствии с ее планом будет освещена химическая сторона вопроса, а также кратко рассказано о роли гормонов в жизни человека. Правда, в ряде случаев очень трудно говорить о значении отдельных гормонов, так как в организме их действие очень тесно связано с действием ферментов и других гормонов. Важнейшей функцией некоторых из них (например, образуемого в гипофизе **адренкортикотропного гормона**, сокращенно называемого **АКТГ**) является **регулирование образования других гормонов** (**АКТГ регулирует образование адреналина надпочечниками**). Некоторые гормоны обладают очень разнообразным воздействием на организм, причем иногда одно и то же действие (например, регулирование жирового обмена) в различных случаях оказывают разные гормоны. Все это делает общую картину очень запутанной, и поэтому при описании роли отдельных гормонов обычно подчеркивается лишь их наиболее важная функция, тогда как остальные только упоминаются.

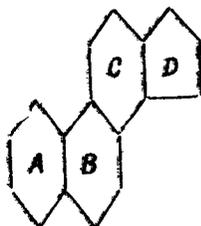
В химическом отношении важнейшие гормоны можно подразделить на несколько групп. Так, половые гормоны и большая часть гормонов надпочечников относятся к стероидам; надпочечники вырабатывают также своеобразные фенольные производные — адреналин и норадреналин. Ряд гормонов (щитовидной и паращитовидной желез, поджелудочной железы, гипофиза) являются веществами белково-пептидной природы. Иногда к гормонам относят также некоторые иные биологически активные вещества с регуляторными функциями (серотонин, гистамин, γ -аминомасляная кислота, ацетилхолин и др.), но мы их рассматривать не будем.

Половые гормоны

Еще в середине прошлого века удалось установить, что при пересадке семенников молодым кастрированным петухам (каплунам) у них восстанавливаются внешние половые признаки — возобновляется рост гребня и бородки, изменяется голос и птицы вновь начинают проявлять «боевые» качества нормального петуха. Аналогичным образом было показано, что атрофические изменения, наступающие после кастрации самок позвоночных, могут быть восстановлены посредством пересадки им ткани яичников. Отсюда возникло предположение, что в гонадах (семенниках и яичниках) содержатся особые вещества, влияющие на половые функции. Долгое время эти вещества не удавалось выделить в индивидуальном сос-

тоянии, главным образом потому, что они содержались в соответствующих тканях и органах в очень незначительном количестве. Известный физиолог Браун-Секар вынужден был в 1889 году публично признать бесплодность опытов по омоложению, проведенных им над собой путем инъециции экстрактов семенников быков (он брал слишком малые количества исходных веществ и использовал неудачные методы выделения). Лишь в начале нашего столетия удалось получить активные экстракты семенников и яичников и выделить из них особые вещества — половые гормоны. Впоследствии многочисленными исследованиями было установлено, что половые гормоны образуются в гонадах под влиянием стимулирующих белковых гормонов передней доли гипофиза, поступающих с током крови. Половые гормоны, образующиеся со времени наступления половой зрелости, регулируют рост и физиологическое развитие органов размножения и стимулируют, в зависимости от их природы, развитие мужских и женских вторичных половых признаков (первичная половая принадлежность индивидуума заключена в особых образованиях живой клетки — хромосомах).

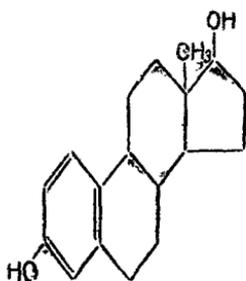
Химическое изучение половых гормонов показало, что все они относятся к классу *стероидов*. Стероиды широко распространены в живых организмах; в основе их структуры лежит сложная полициклическая система, построенная из четырех сконденсированных углеродных циклов (ABCD):



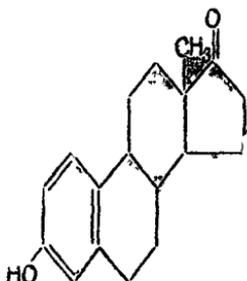
Большинство стероидов содержит одну или несколько метильных групп и различные кислородсодержащие и другие группировки. Изучение химии стероидов представляет собой одну из наиболее ярких глав органической химии, и именно развитие этой области принесло колоссальные успехи в органическом синтезе, стереохимии органических молекул и др. Важность стероидов не ограничивается только тем, что к ним относятся половые гормоны. Существует огромное множество других стероидных гормонов, играющих решающую роль во всех процессах жизнедеятельности на всех стадиях развития организма. Мы ограничимся, однако, кратким рассмотрением химии половых гормонов и гормонов коры надпочечников.

Женские половые гормоны

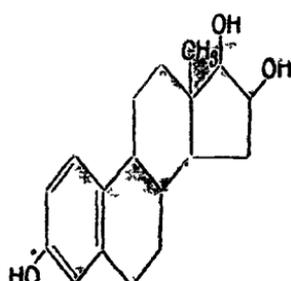
Удаление обоих яичников у зрелой самки млекопитающего уничтожает явление течки (по-гречески *эструс*), т. е. период активности к спариванию, характеризующийся интенсивным половым влечением. Установление гормональной природы этого эффекта, т. е. стимулирования его агентами, переносимыми жидкостями организма, привело к выделению и установлению строения женских половых гормонов. Существует два вида женских половых гормонов. К первому виду относятся так называемые *эстрогены* — эстрадиол, эстрон и эстриол



Эстрадиол



Эстрон



Эстриол

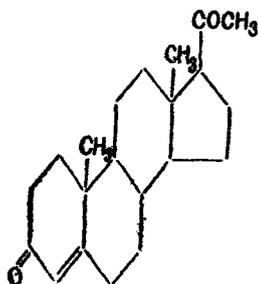
Следует отметить, что в процессе обмена веществ половые гормоны превращаются в разнообразные продукты и выделяются с мочой в виде метаболитов (как сохраняющих гормональную активность, так и полностью неактивных). В частности, истинным женским половым гормоном считается эстрадиол, поскольку эстрон и эстриол образуются из него в процессах метаболизма. В связи с этим интересно упомянуть, что поскольку эстрон и эстриол содержатся в моче в большем количестве, их выделили раньше (1929—1930 гг.) и в течение нескольких лет (до 1935 г.) они считались основными женскими половыми гормонами.

Женские половые гормоны, широко используемые в медицине, выделяют из мочи беременных женщин, а также жеребых кобыл (где их содержится значительно больше, чем в ткани яичников). Удобный метод испытания эстрогенных гормонов основан на их способности вызывать явление течки у кастрированных крыс и мышей; при этом активность препарата выражают в так называемых мышинных или крысиных единицах. Например, мышинной единицей называют наименьшее количество гормона, которое может вызвать эструс у кастрированной мыши (одна десятимиллионная доля грамма). Было также показано, что эстрогены содержатся в некоторых рас-

тениях, где их роль пока недостаточно ясна (кокосовые орехи, цветки, ивы, клевер, люцерна и др.). Во многих странах женские половые гормоны получают и путем прямого химического синтеза.

Медицинское применение женских половых гормонов не ограничивается лишь их введением при эстрогенной недостаточности. Они применяются и в терапии ряда заболеваний, в частности при лечении рака предстательной и молочной желез, используются в ветеринарной практике и т. п.

К женским половым гормонам относится и *прогестерон* — единственный природный гормон беременности,



Прогестерон

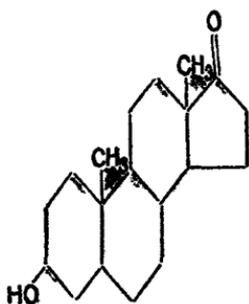
Биологическая роль прогестерона выяснена достаточно полно. В яичнике женщины после созревания и разрыва фолликула образуется ткань, которая из-за наличия в ней большого количества желтого пигмента каротина получила название «желтого тела» («корпус лутеум»). Основные функции желтого тела заключаются в подготовке и сохранении беременности. Как было установлено еще в начале нашего столетия, удаление желтого тела приводит к прерыванию беременности, откуда родилось предположение, что оно является эндокринной железой и вырабатывает гормоны. Действительно, изменения, вызываемые беременностью, можно восстановить введением экстрактов желтого тела. Все это позволило исследователям выделить из желтого тела гормон прогестерон (1934 г.), хотя задача оказалась исключительно сложной в силу лабильности этого вещества. Сейчас прогестерон получают как путем изолирования из яичников животных, так и на основе химических и микробиологических методов из других стероидных соединений (холестерина, дигосенина и т. п.).

Мужские половые гормоны

Мужские половые гормоны были выделены из экстрактов семенников (а также из мочи мужчин) и получили название *андрогенов* (по-гречески *андрос* — мужчина). Для их выделения в значительном количестве потребовалась разработка

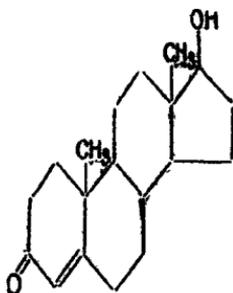
чувствительных биологических тестов; в частности, такой мерой андрогенной активности может служить рост гребня у кастрированных петухов, измеряемый непосредственно или путем проекции на фотобумагу тени гребня, получаемой при непродолжительном освещении (наименьшее количество гормона, вызывающее рост гребня на 15%, называют петушиной единицей). Другой метод основан на почернении клюва воробья при введении андрогенных гормонов, поскольку известно, что клюв воробья чернеет весной, когда усиливается деятельность семенников.

Первым гормоном, который был изолирован из мочи мужчин в индивидуальном состоянии, оказался *андростерон* (1931 г.).



Андростерон

Впоследствии, однако, было обнаружено, что в семенниках содержится еще один более активный гормон, и из 100 кг семенников было выделено новое вещество (10 мг), получившее название *тестостерона*:



Тестостерон

Детальные исследования, проведенные после выяснения химического строения мужских половых гормонов, показали, что тестостерон является, по всей вероятности, биологическим предшественником андростерона и последний образуется из

него в результате ряда метаболических превращений (в частности это было продемонстрировано с использованием «меченых» атомов).

В настоящее время андростерон и тестостерон, а также родственные им гормональные препараты получают в промышленных масштабах, причем первое место здесь принадлежит химическому синтезу. Эти вещества широко используют в терапевтической практике.

Тестостерон и его производные широко применяют при мужском климактерии и связанных с ним нервных расстройствах, при импотенции, зависящей от недостаточности половых желез или от переутомления. У женщин андрогенные гормоны применяют при предклимактерических и климактерических расстройствах. Описано использование андрогенов при лечении некоторых раковых опухолей, а также при коронарной недостаточности.

Гормоны коры надпочечников (кортикостероиды)

Надпочечники человека представляют собой небольшие органы весом около 6 г каждый, располагающиеся у верхнего конца каждой почки и состоящие из двух различных тканей — коркового слоя и мозгового вещества. Уже давно известно, что двустороннее удаление надпочечников (адреналэктомия) приводит к смерти в течение нескольких дней. Поскольку при полном удалении надпочечников смерть и предшествующие ей явления (слабость, понижение температуры, рвота, одышка и др.) наступают несмотря на введение в организм действующего начала мозгового вещества надпочечников — адреналина, можно сделать вывод, что кора надпочечников сама по себе выполняет жизненно важные функции. В самом деле, подопытные животные с удаленными надпочечниками не умирают при пересадке им ткани коры надпочечников или при введении экстрактов этой коры. При поражении коры надпочечников (например, туберкулезе надпочечников) появляются симптомы особого заболевания, известного под названием аддисоновой болезни. Ее внешним признаком является окрашивание кожи в коричневый цвет, а более серьезными последствиями — анемия, ослабление сердечной деятельности, желудочно-кишечные расстройства, чувствительность к холоду и к болевым раздражениям и т. п.; до применения современных методов лечения болезнь всегда оканчивалась смертью.

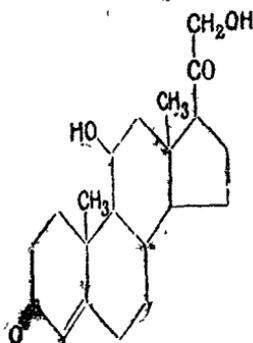
Исследования физиологической роли коры надпочечников показали, что она регулирует такие важные функции организма, как обмен воды и электролитов, углеводный и белковый

обмен и связанную с ними работоспособность мышечной системы, а также влияет на сопротивляемость организма по отношению к шоку, недостатку кислорода, инфекциям и интоксикациям.

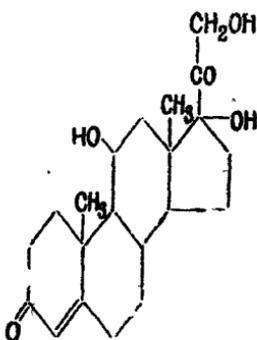
Это свидетельствовало о том, что кора надпочечников содержит один или большее число гормонов (экстракты коры давали положительный эффект на адреналэктомированных животных). В течение 1930—1945 годов из сырых экстрактов желез было выделено большое число гормонов стероидной природы, из которых многие обладали вполне определенным типом активности, специфичной для функций коры надпочечников. В последующие годы были выделены и другие кортикостероиды, и в настоящее время их насчитывается несколько десятков.

Все известные кортикостероиды можно по их функции разделить в основном на две группы. Одна группа действует на обмен электролитов (минеральных солей) и воды и поэтому их называют «минерало-кортикостероидами». При удалении коры надпочечников (в частности при аддисоновой болезни) организм теряет способность удерживать ионы натрия и хлора, поэтому их выделение в моче возрастает и содержание хлористого натрия (поваренной соли) в организме резко падает; одновременно сильно увеличивается содержание ионов калия в крови. При введении минерало-кортикостероидов восстанавливается нормальная картина.

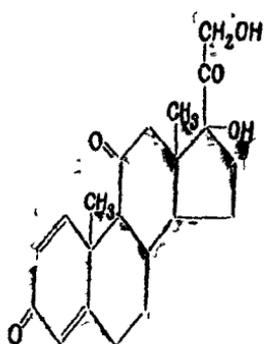
Другую группу кортикостероидов, действующих не только на обмен минеральных солей, но и на обмен углеводов и белков, составляют гормоны, иногда называемые «глюко-кортикостероидами». При введении их животным с удаленными надпочечниками повышается содержание углеводов (гликогена в печени и сахара в крови) и одновременно выделяется (с мочой) азота больше, чем организм получает его в виде белков (отрицательный азотный баланс).



Кортизон



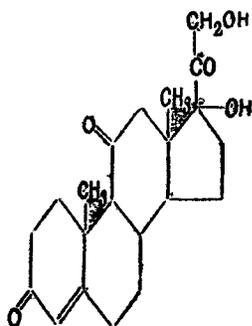
Кортизол



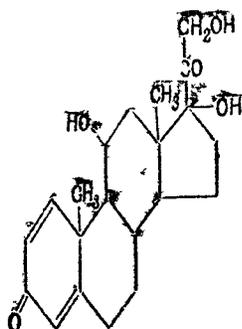
Кортикостерон

Химическое строение большинства кортикостероидов полностью установлено. Важнейшими из них являются кортизон, кортизол и кортикостерон.

В результате многочисленных исследований были найдены эффективные методы получения природных кортикостероидов и их многочисленных аналогов и производных, находящих исключительно широкое применение в медицинской практике, в частности преднизона, преднизолона и др.



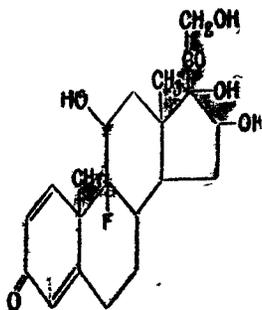
Преднизон
(дегидрокортизон)



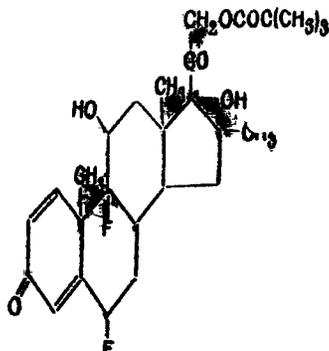
Преднизолон

Особенно интересными в биологическом отношении оказались фторированные производные кортикостероидов с одним или двумя атомами фтора в различных положениях стероидного скелета; из них хорошо известны *триамцинолон* и *локакортен*.

Кортикостероиды, в особенности кортизон и его производные, обладают сильным и разнообразным физиологическим



Триамцинолон



Локакортен

действием, благодаря чему успешно применяются при лечении различных заболеваний. Кроме уже упомянутой области применения (недостаточность надпочечников и аддисонова болезнь), кортизон и его производные широко и успешно используются в терапии тяжелых ревматических заболеваний (суставной ревматизм, ревмокардит, подагра и др.). Их применяют также при различных аллергических заболеваниях, например, при бронхиальной астме и сенной лихорадке, а также при таких хронических кожных заболеваниях, как красная волчанка, некоторые виды экземы и т. п. Имеются данные об успешном использовании кортикостероидов и их аналогов при лимфосаркоме, тяжелых формах желтухи и язвенных заболеваниях. В последнее время кортизон и его аналоги оказались эффективными при лечении некоторых глазных заболеваний (конъюнктивит, воспаление века и радужной оболочки и др.).

Необходимо подчеркнуть, что синтетически полученные аналоги кортикостероидов обладают более сильным и более направленным действием, чем их природные партнеры (некоторые фторкортикоиды в десятки раз превосходят кортизон по противовоспалительному эффекту), и в то же время наблюдается, особенно при местном применении, резко уменьшенное побочное действие (что часто является серьезным препятствием для стероидных гормонов при их длительном лечебном использовании). Поэтому применение этих препаратов имеет большое будущее.

Другие гормоны надпочечников (гормоноиды)

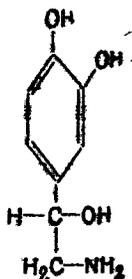
В организме содержится много веществ, действующих на процессы обмена и обладающих гормоноподобными свойствами, хотя и лишенных некоторых признаков истинных гормонов: они редко образуются в определенных эндокринных органах, их недостаток не вызывает характерных симптомов, а их избыточная секреция обычно не происходит. Они быстро оказывают действие, но так же быстро теряют свою активность. В последнее время такие вещества называют гормоноидами; к ним относятся тканевые гормоны (каллидин, брадикинин, гипертензин и др.) и нейрогормоны (триптамин и его производные, гистамин, ацетилхолин и др.). Здесь нет возможности рассмотреть все эти вещества, поэтому мы остановимся лишь на нейрогормонах *адреналине* и *норадреналине*.

Адреналин и норадреналин образуются в мозговом слое надпочечников (который представляет собой систему высокоспециализированных нейросекреторных клеток) и затем от-

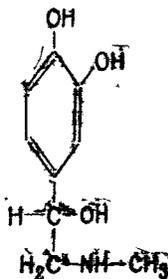
Кладываются в окончаниях нервных волокон в «замаскированном» состоянии (в виде соли с особым, богатым энергией веществом — аденозинтрифосфатом).

В организме норадреналин и адреналин выполняют функции кратковременного или длительного контроля за деятельностью многочисленных органов, входящих в сферу симпатической нервной системы. Наиболее изучен их эффект на повышение кровяного давления за счет сужения артерий; они высвобождаются в нервных окончаниях в ответ на раздражение нерва, контролирующего систему кровообращения, и таким образом проявляют свое действие. После этого адреналин и норадреналин подвергаются ферментативному разрушению. Например, при быстром подъеме на значительную высоту сила земного притяжения обуславливает некоторые нарушения в системе кровообращения; как сейчас предполагают, благодаря возникающему при этом рефлексу, в котором определенную роль играет выделение адреналина, уже через несколько секунд развивается повышенная «гравитационная» устойчивость. Надо отметить, что в организме адреналин выделяется одновременно в ничтожном количестве, и благодаря его чрезвычайно высокой биологической активности эффект оказывается достаточным. Если бы, например, весь адреналин, содержащийся в мозговом слое надпочечников человека (около 10 мг), выделился одновременно, это привело бы к шоку и быстрой смерти. Как мы уже отметили, деятельность надпочечников регулируется гормонами гипофиза.

В химическом отношении норадреналин и адреналин являются производными двухатомного фенола-пирокатехина и образуются в организме путем ферментативного гидроксирования и последующих превращений аминокислоты тирозина; они встречаются в природе в виде оптически активных D-форм:



D-(-)-норадреналин



D-(-)-адреналин

Эти нейрого르몬ы прекрасно изучены и синтезированы самими различными методами. Получены и многочисленные аналоги адреналина и норадреналина, находящие практическое применение.

Гормоны щитовидной железы (тироксин и близкие вещества)

Одной из загадочных болезней, в течение веков поражавшей жителей определенных районов, удаленных от моря, являлся эндемический зоб. Долгое время не удавалось понять причин этого заболевания. Лишь в середине XIX века впервые было высказано правильное предположение, что появление зоба связано с недостатком в пище йода. Однако лишь в самом конце XIX века стала ясна связь между появлением таких заболеваний, как зоб и кретинизм, и недостатком йода, с одной стороны, и недоразвитостью или повреждением давно известной анатомам щитовидной железы, с другой стороны. Постепенно удалось объединить, казалось бы, совершенно несвязанные отдельные факты в общую картину, причем центральное место в ней по праву заняли гормон тироксин и близкие вещества, вырабатываемые щитовидной железой.

Щитовидная железа образует несколько йодсодержащих соединений — производных аминокислоты тирозина. Главным из них является *тироксин* (тетрайодтиронин), в котором имеется четыре атома йода; меньшей, но несомненной активностью обладают соединения, содержащие три атома йода. В организме тироксин и близкие вещества вступают в различные реакции, поэтому известно много содержащих йод продуктов обмена тироксина, в той или иной мере обладающих сходным с ним действием. Обычно в организме тироксин присутствует в форме белка — тиреоглобулина.

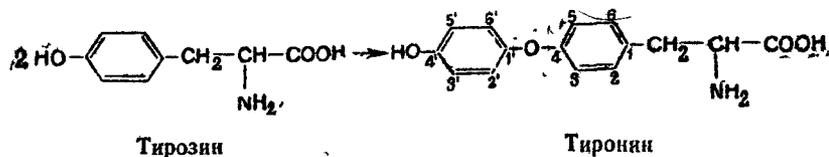
Основная биохимическая функция тироксина (и близкого к нему трийодтиронина) заключается в регуляции интенсивности дыхания клеток. При недостаточном образовании тироксина (что вызывается нехваткой йода или повреждением железы) наблюдается уменьшение частоты сердечных сокращений, понижение кровяного давления, слабость; больные все время ощущают чувство холода. При сильной нехватке тироксина может наступить ожирение, так как значительная часть веществ пищи не используется, а откладывается.

Наиболее тяжелыми заболеваниями, связанными с большой недостатком тироксина, являются эндемический зоб и задержка роста и умственного развития. Эндемический зоб в некоторых местностях, особенно в удаленных от моря горных районах (Анды, Средняя Азия, Швейцария и др.), встречается очень часто. Например, еще в 1924 году в кантоне Берн (Швейцария) примерно у 80% новорожденных были признаки зоба. Основной причиной этого заболевания являлся дефицит йода. Обычно в сутки человеку достаточно около 0,2 мг йода; при повышенных физических и психических нагрузках (наступление половой зрелости, беременность, лактация, тя-

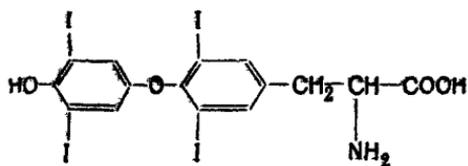
желые инфекционные заболевания, психические травмы и др.) потребность в йоде повышается, так как в организме должно образовываться большее количество тироксина. При достаточном питании, включающем морские продукты, с пищей поступает необходимое количество йода. В настоящее время почти во всех странах введено обязательное добавление йодистого калия (примерно 5—10 мг на 1 кг) к поступающей в продажу поваренной соли. Это простое мероприятие резко снизило заболеваемость зобом. В тех случаях, когда даже в присутствии йода организм не может производить необходимого количества тироксина (вследствие врожденной недоразвитости щитовидной железы или ее повреждения), нередко можно предотвратить развитие патологических явлений введением тироксина (или лучше тироксинсодержащего белка — тиреоглобулина).

Значительный избыток тироксина (гипертиреоз) также очень опасен для человека; первыми признаками такого заболевания являются легкая возбудимость, учащенное сердцебиение и т. д. При сильной гиперфункции щитовидной железы («щитовидка») может развиться базедова болезнь, характеризующаяся повышением температуры, потливостью, дрожанием рук, специфическим пучеглазием и другими признаками. Больные страдают повышенной нервозностью. Для борьбы с гипертиреозом и базедовой болезнью необходимо уменьшить содержание тироксина в организме (путем хирургического удаления части щитовидной железы или разрушением ее препаратами радиоактивного йода) или ввести его антагонисты. Следует отметить, что различные гормоны очень тесно взаимосвязаны между собой. Так, образование тироксина в значительной мере регулируется специфическим тиреотропным гормоном, образующимся в гипофизе. В свою очередь, тироксин влияет на образование в надпочечниках гормона адреналина.

В химическом отношении тироксин и близкие ему соединения подробно изучены. Установлено, что они являются йодпроизводными аминокислоты тиронина, образующейся в организме путем конденсации двух молекул распространенной оксиаминокислоты тирозина (с отщеплением одной боковой цепи в виде аланина):



Атомы йода вступают в положение 3, 5, 3', 5' (в тироксине), в положения 3, 5, 3' или 3, 3', 5' (в случае трийодтиронинов).



Тироксин

Строение тироксина строго доказано, осуществлен его **полный синтез**. В случае необходимости использования обычно применяют **синтетический тироксин**, так как получать и очищать его много легче, чем **извлекать из щитовидной железы**. Однако в большинстве случаев при дефиците тироксина в организме достаточно **ввести небольшие количества йода**, чтобы обеспечить биосинтез нужного количества гормона.

Гормоны поджелудочной железы (инсулин и глюкагон)

Инсулин и глюкагон вырабатываются в поджелудочной железе, точнее в особых островках Лангерганса, **вкрапленных** в основную ткань органа. Эти островки состоят из клеток двух типов; одни из них (**β-клетки**) образуют инсулин, другие (**α-клетки**) — глюкагон. Оба гормона участвуют в регулировании углеводного обмена в организме, причем если роль инсулина выяснена достаточно хорошо, то функциональное значение глюкагона исследовано пока сравнительно мало и здесь имеется много неясного. В химическом отношении инсулин и глюкагон — полипептиды, и их относят к числу наиболее простых белков.

Инсулин является первым гормоном, биологическая функция которого была принципиально выяснена путем удаления у животных поджелудочной железы — при этом появлялись признаки так называемой «сахарной болезни» (1889 г.). Последующее изучение физиологического действия инсулина показало, что он регулирует проникновение глюкозы внутрь клеток, вследствие чего понижается ее содержание в крови, стимулируется образование жиров и опосредованно регулируются многие другие жизненно важные функции организма. При недостатке инсулина у человека развивается тяжелое заболевание — «сахарная болезнь», или диабет, при котором затрудняется усвоение глюкозы из крови. Содержание сахара в крови повышается, но клетки испытывают его острую нехватку, и для выработки энергии (а сахара являются важным «топливом» живого организма) начинают использовать **жиры и белки**,

Уменьшение поступления глюкозы особенно опасно для функционирования мозга. Если больному диабетом одновременно ввести значительную дозу инсулина, больной может потерять сознание вследствие инсулинового шока. В то же время большую опасность представляет и повышение содержания глюкозы в крови, которое может привести к нарушению нормальной деятельности мозга — развитию диабетической комы. Поэтому больные диабетом вынуждены все время лавировать между этими двумя опасностями, тщательно придерживаясь установленных норм введения инсулина путем ежедневных инъекций, а также строго соблюдать диету.

Диабет — весьма распространенное заболевание, причем процент больных диабетом оказывается более высоким в развитых странах (что связано с увеличением потребления мясной пищи). Поэтому изучение биологического действия инсулина и возможностей регулирования сахарного обмена в организме представляет собой одну из актуальных проблем современной биологии и медицины.

Обычно для лечения больных диабетом людей используют инсулин животного происхождения, выделяемый из поджелудочных желез крупного рогатого скота. Однако недавно было установлено, что для многих больных такой инсулин оказывается малоэффективным и в ряде случаев приводит к аллергическим реакциям организма (это связано с тем, что инсулин животных по своей структуре несколько отличается от инсулина людей и человеческий организм отказывается воспринимать «чуждый» ему гормон). Отсюда ясна исключительная значимость стоящей перед учеными задачи — изучить химическую природу инсулина человека и научиться получать этот гормон искусственным путем.

Инсулин был первым гормоном, для которого была доказана его белковая природа. В середине 50-х годов нашего столетия удалось расшифровать его структуру (инсулин быка), за что английскому ученому Сэнджеру была присуждена Нобелевская премия. Несколько позднее было выяснено строение инсулинов других животных и человека.

Молекула инсулина состоит из двух полипептидных цепей (первая цепь состоит из 21 аминокислотного остатка и вторая — из 30 остатков), соединенных дисульфидными связями.

В 1963—1964 годах удалось осуществить полный химический синтез инсулина, используя для этого методы классического пептидного синтеза — последовательное соединение между собой отдельных аминокислот. В последние годы этот синтез был значительно улучшен на основе полуавтоматических методов, и в ближайшее время в ряде стран планируется промышленный выпуск синтетического инсулина.

Глюкагон. Этот гормон участвует в процессе превращения глюкозы в гликоген в печени и мышцах. Его действие в изве-

стром, смысле обратнo инсулину, поскольку глюкагон вызывает повышение содержания сахара в крови. По своей структуре он является полипептидом, состоящим из 29 аминокислотных остатков

Долгое время глюкагон не удавалось получить искусственным путем, однако в 1967 году был осуществлен его полный химический синтез. Это открывает путь к более глубокому изучению биологической функции глюкагона.

Пептидно-белковые гормоны гипофиза

Гипофиз человека и животных представляет собой небольшую железу, образующую своего рода вырост межучного мозга и составляющую по весу около 0,5 г у человека и около 1 г — у быка (т. е. меньше чем 1/100 000 общего веса тела). Несмотря на столь крохотные размеры, он имеет важнейшее значение для жизнедеятельности человека и животных, поскольку в нем вырабатываются и накапливаются многочисленные гормоны организма; функции гипофиза непосредственно связаны с деятельностью центральной нервной системы. Образуемые гипофизом гормоны оказывают регуляторное действие на работу других желез внутренней секреции (щитовидную, надпочечники, яичники и др.), поэтому в гормональном аппарате человека и животных гипофиз (вместе с гипоталамусом) играет роль своеобразного «командного устройства» и его часто называют «главной эндокринной железой».

Отдельные части гипофиза строго специализированы по выполняемой ими функции; различают заднюю долю гипофиза (нейрогипофиз), переднюю (аденогипофиз) и промежуточную (интермедиальную область). Гипофиз тесно связан с гипоталамусом, где, как предполагается, образуются гормоны задней доли гипофиза (рис. 18).

В задней доле гипофиза содержатся два основных гормона — окситоцин и вазопрессин, которые, по последним данным, накапливаются здесь в результате поступления из ядер гипоталамуса. Вазопрессин регулирует выделение воды через почки (точнее, он способствует концентрации мочи в извитых канальцах почек), а также оказывает (как следует из его названия) сильное влияние на кровяное давление (прессорный эффект). В свою очередь, окситоцин стимулирует сокращение матки во время родов, а также действует на другую гладкую мускулатуру; кроме того, он способствует выделению молока в послеродовой период (лактогенный эффект).

Окситоцин и вазопрессин представляют собой пептиды сравнительно небольшого молекулярного веса, однако, по

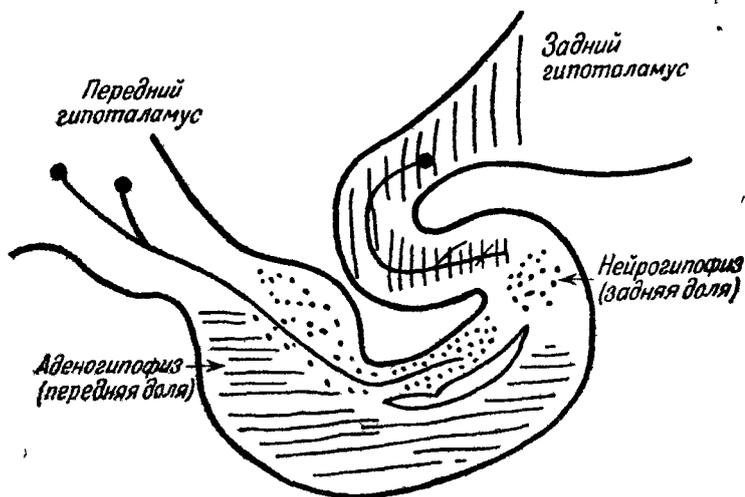
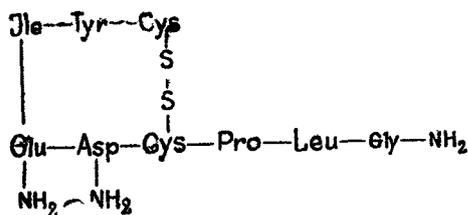


Рис. 18 Схема строения гипофиза

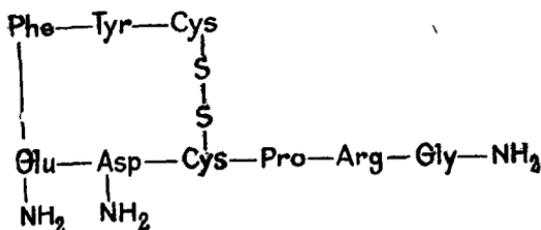
всей вероятности, они содержатся в гипофизе в форме высокомолекулярных белков-предшественников и образуются из последних в определенный момент под действием протеолитических ферментов. У человека и всех животных окситоцин одинаков, имеет ту же структуру, тогда как вазопрессин достоверно существует в двух формах, различающихся аминокислотным составом. Молекула вазопрессина свиной содержит остаток лизина, а в вазопрессине человека и большинства млекопитающих лизин заменен аргинином.

В химическом отношении окситоцин представляет собой циклический пептид, в котором замыкание цикла осуществляется за счет дисульфидной связи.

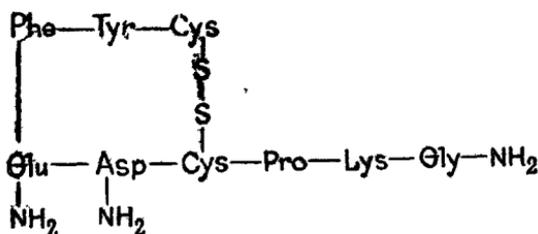


Окситоцин

Аналогично построены и оба вазопрессина:



Аргинин-вазопрессин



Лизин-вазопрессин

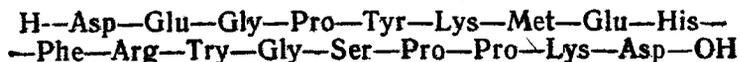
Относительная простота строения окситоцина и вазопрессина позволила сравнительно быстро установить их химическое строение; в настоящее время осуществлены полные химические синтезы этих гормонов и они выпускаются во многих странах в промышленном масштабе. На основе химического синтеза ученые получили сотни аналогов окситоцина и вазопрессина, многие из которых по своему биологическому действию близки этим гормонам, а другие, напротив, являются антагонистами. Удалось также установить, какие элементы структуры гормонов наиболее важны для их физиологической активности — это прежде всего наличие циклической системы и боковой цепи. В то же время многие функциональные группировки молекулы гормонов оказались не столь существенными; можно, например, заместить атомы серы в дисульфидной группе на метиленовые звенья $-\text{CH}_2-$ (при этом образуются так называемые «карбо»-аналоги гормонов) — и биологическое действие сохранится. Столь интенсивное химическое изучение окситоцина и вазопрессина, продолжающееся и сейчас, обусловлено их широким применением в медицине и сельском хозяйстве.

В средней доли гипофиза, насколько известно в настоящее время, образуется только один, специфический гормон — *меланоцитостимулирующий (МСГ)*, часто называемый также *меланотропином* или *интермедином*. Биологическое значение этого гормона пока во многом остается загадочным. Уже дав-

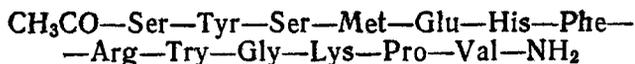
но удалось установить, что меланотропин вызывает изменение цвета кожи лягушки, так как при его введении происходит увеличение меланоцитов — особых клеток в коже, содержащих черный пигмент меланин. Интересно, что эта способность меланоцитостимулирующего гормона вызывать потемнение кожных покровов обычно используется для его биологического тестирования. По всей вероятности, аналогичные функции выполняет МСГ и в организме человека; так, при болезни Аддисона в результате снижения образования меланотропина (и других гормонов) у больных развивается характерная усиленная пигментация кожных покровов. При длительном применении в больших дозах МСГ вызывает у человека пигментацию кожи и родимых пятен, а иногда — появление новых родимых пятен. Однако эффект МСГ на кожные покровы человека весьма незначителен и во всяком случае даже очень большой дозой этого гормона нельзя превратить человека с белой кожей в негра, как это делал герой романа Беляева «Человек, потерявший лицо».

Не вызывает сомнения, что пигментационный эффект МСГ не имеет столь существенного значения для жизнедеятельности организма и только им нельзя объяснить наличие у ряда животных близких, но не идентичных меланоцитостимулирующих гормонов. Весьма вероятно, что МСГ выполняет еще какую-то важную физиологическую функцию. В частности, было показано, что при его введении усиливается действие ацетилхолина; отсюда можно предположить, что интермедин оказывает влияние на передачу нервного возбуждения.

В настоящее время химически изучены и синтезированы несколько меланоцитостимулирующих гормонов, например β -МСГ свиньи, представляющий собой линейный октадекапептид (18 остатков аминокислот) и α -МСГ (из гипофиза свиньи), являющийся защищенным тридекапептидом.



Структура β -МСГ из гипофиза свиньи



Структура α -МСГ из гипофиза свиньи

β -Меланотропин из гипофиза крупного рогатого скота отличается от свиного заменой всего лишь одного аминокислотного остатка — вместо остатка глутаминовой кислоты во втором положении молекулы находится остаток серина. Напротив, α -меланотропин человека построен уже из 22 аминокис-

В 1963 году осуществлен полный синтез АКТГ — пока это синтез наиболее длинной природной полипептидной цепи. Однако в промышленном масштабе в настоящее время выпускается путем химического синтеза аналог АКТГ с последовательностью аминокислот 1—24 самого гормона.

Гормон роста

Гормон роста (или соматотропный гормон) также образуется в передней доле гипофиза. Как показывает само название, его основной функцией является регуляция роста. При его недостатке наблюдается замедление роста (карликовость). Однако крайне опасно и избыточное образование этого гормона, приводящее к гигантизму, причем в некоторых случаях развивается патологическое разрастание костей черепа и конечностей, так называемая акромегалия. Содержание соматотропина в плазме крови обычно не превышает 20—40 μ /мл, тогда как у больных оно в полтора-два раза выше. Гормон роста оказывает сильное влияние и на другие биологические процессы в организме, вероятно, опосредованно, т. е. усиливая рост других желез.

Нужно отметить, что в зависимости от рода животных в их организме образуются различные варианты гормона роста, сильно отличающиеся молекулярным весом, строением и специфичностью. Например, гормон роста из гипофиза крупного рогатого скота совершенно не действует на человека и обезьян. Гормоны роста различного происхождения сильно различаются по аминокислотному составу и другим свойствам. Так, гормон роста человека представляет собой белок, состоящий из одной длинной полипептидной цепи, содержащей 188 аминокислот. Его строение в последнее время полностью выяснено.

Гормон роста крупного рогатого скота имеет более высокий молекулярный вес и содержит ориентировочно около 370 аминокислот. Его строение еще не выяснено. Имеются данные, что некоторые животные (например, крысы) способны частично расщеплять высокомолекулярный гормон роста крупного рогатого скота до гормона с меньшим молекулярным весом.

Биологическое действие гормона роста видоспецифично. Например, соматотропный гормон крупного рогатого скота вызывает усиление роста только у крыс, но не действует на человека. Поэтому при необходимости клинического использования гормона роста оказывается возможным применять лишь человеческий гормон, извлекаемый из гипофизов умерших людей. Естественно, что такие препараты весьма мало доступны и дороги, и медицина ждет от ученых решения проблемы искусственного синтеза гормона роста.

К сожалению, обычные методы пептидно-белкового синтеза пока не пригодны для получения таких сложных высокомолекулярных белков, и исследователям необходимо создавать принципиально новые, быстрые и эффективные способы синтеза белков. Поиск идет в самых различных направлениях, но наиболее перспективным представляется тот путь, который использует живая клетка для получения сложнейших белков и ферментов. В клетке синтез белков осуществляется на специальных нуклеопротеидных образованиях — рибосомах и в его основе лежит «матричный» принцип (матрицами служат молекулы специфических нуклеиновых кислот). Весь процесс синтеза самого сложного белка занимает одну-две минуты. Поэтому в лабораториях ученых сейчас детально изучают принципы и механизмы работы аппарата биологического синтеза белков, ищут способы его модифицирования и направленного регулирования и выясняют возможность создания систем, моделирующих подобный аппарат. Решение этой проблемы будет иметь исключительно большое значение для науки и практики, и сейчас есть все основания надеяться, что в ближайшем будущем человек научится осуществлять такие синтезы белков, которые пока являются продуктами лишь живой природы.

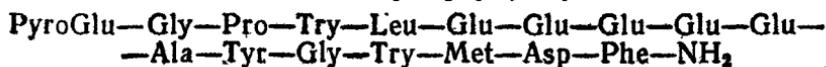
Гонадотропные гормоны

В передней доле гипофиза вырабатываются также несколько белково-пептидных гормонов, влияющих на эндокринную функцию половых желез. К ним относится *фолликулолестимулирующий* гормон (ФСГ), регулирующий деятельность фолликул, которые вырабатывают женские половые гормоны (эстрогены). Другой гормон этой группы (*лютеинизирующий*) стимулирует активность желтого тела, вырабатывающего гормон прогестерон. В свою очередь, прогестерон и еще один гонадотропный гормон — *пролактин*, стимулируют развитие молочных желез в период беременности. Наконец, *тиреотропный* гормон регулирует деятельность щитовидной железы. Все эти гормоны представляют собой сложные белки или комплексы белков с углеводами (гликопротеины), имеют большой молекулярный вес и строение большинства из них неизвестно. Лишь в последнее время удалось установить структуру пролактина быка, который оказался белком, построенным из 203 аминокислотных остатков.

Химическое изучение гонадотропных гормонов тормозится исключительной сложностью их выделения, разделения и индивидуализации, поскольку из гипофиза получаются смеси близких по структуре и биологическому действию высокомолекулярных белков. Успех здесь может быть достигнут лишь на основании использования всего комплекса современных ме-

в нем ферментов. Предполагается, в частности, что язвы желудка являются следствием чрезмерного гормонального раздражения, обусловленного повышенным выделением гастринина.

Гастрин является сравнительно небольшим полипептидом, построенным из 17 аминокислотных остатков; на его N-конце (слева) находится остаток пироглутаминовой кислоты, представляющей собой циклическую форму глутаминовой кислоты.



Структура гастринина человека

Гастрин химически значительно более изучен, чем секретин. В настоящее время не только проведен его полный синтез, но и получены многочисленные аналоги. При этом был обнаружен весьма интересный факт; оказалось, что синтетический тетрапептид, представляющий собой C-концевую аминокислотную последовательность гастринина (а именно Ac—Try—Met—Asp—Phe—NH₂, где Ac — какая-то ацильная защитная группа), обладает практически полной биологической активностью гормона. Другими словами, у природной молекулы можно «обрубить» почти 80% ее пептидной цепи, и тем не менее она продолжает благополучно функционировать.

Мы уже отмечали, что аналогичные явления встречаются и у других гормонов (в частности, у аденокортикотропина) и даже у ряда ферментов. Этот вопрос давно интересует ученых. С одной стороны, на этой основе можно искусственно создавать достаточно простые аналоги биологически активных природных веществ, без всяких «архитектурных излишеств»: это и быстрее, и экономнее. И действительно, такие упрощенные «фрагменты гормонов» выпускаются уже в промышленности, например, полипептид с 1—24 последовательностью АКГГ (швейцарская фирма «Сиб»). Но, с другой стороны, представляется странным — зачем природа, всегда являющаяся образцом целесообразности, допускает такое «расточительство»? Так ли все просто? Чтобы это понять, необходимо очень тщательно изучать сравнительное биологическое действие природного вещества и аналога на различных организмах, в различных состояниях и условиях функционирования, и искать, где проявится различие. Четкого ответа на этот вопрос пока не получено, но в ряде случаев (например, некоторые пептидные гормоны) удалось показать, что казавшаяся «балластной» часть молекулы играет важную роль в защитных реакциях организма (иммунохимический эффект). Напротив, в других случаях никаких последственных воздействий такого «обрубленного» соединения не обнаружено. Наука пока ищет правильный ответ.

Очень мало известно о механизме биологического действия гормонов, хотя, естественно, он будет различным у разных гормонов. Многие гормоны, в частности соединения пептидно-белковой природы, оказывают влияние на проницаемость клеточных и субклеточных мембран, по всей вероятности, путем воздействия на определенные ферменты. Таким путем они регулируют различные процессы в живой клетке. Интересно, что при этом гормон не обязательно должен входить в клетку, он может «прикрепляться» к определенной ферментной системе, расположенной на клеточной поверхности, и посредством кооперативных эффектов вызывать какие-либо изменения внутри клетки (такой механизм иногда называют «кнопочным»). Таким путем может регулироваться транспорт ионов различных металлов и ряда веществ (например, сахаров) через мембраны и оболочки.

Другие гормоны способны оказывать непосредственное действие на активность ферментов в виде специфических активаторов и ингибиторов (в частности, именно такой характер действия приписывают гормонам щитовидной железы, воздействующим на окислительно-восстановительные ферментативные процессы).

Наконец, некоторые стероидные гормоны оказывают существенное влияние на биосинтез белка.

Однако детальный механизм действия гормонов еще предстоит изучать. Этим занимаются многие научные коллективы, и каждый успех, пусть самый незначительный, постепенно приоткрывает завесу, скрывающую нитимные механизмы деятельности этих исключительно «разумных» тружеников живого организма.

Глава 5

ВРАГИ НАШИХ ВРАГОВ (природные и синтетические противомикробные средства)

Найти средство, сыворотку, которая убивала бы микробов, но не причиняла вреда человеку, — вот в чем была загвоздка. Пытались даже применить других микробов, вводить в тело больного человека таких микробов, которые были бы врагами чумных микробов...

Д. Лондон.
Алая чума

Человека окружает многообразный живой мир — громадное число различных растений, зверей, птиц, рыб, насекомых. Без этого хорошо знакомого каждому из нас окружения нельзя представить себе жизнь человечества. Однако наряду с множеством растений и животных нас окружает и другой живой мир — невидимый невооруженному глазу мир микроорганизмов, без которых жизнь человека тоже была бы невозможна.

Значение микроорганизмов в природе и в жизни человека колоссально — можно напомнить лишь несколько известных примеров. Бактерии *Azotobacter* и близкие к ним виды являются одним из основных источников связанного азота, без которого было бы невозможно развитие всего растительного мира. Многие микроорганизмы-сапрофиты разлагают остатки мертвых растений и животных, превращая их в те вещества, которые нужны для жизни. Железобактериям и серобактериям мы во многом обязаны концентрированными запасами железа, серы и других важных ископаемых. Такие примеры можно приводить без конца.

Однако наряду с нужными и полезными микроорганизмами имеется множество вредных микроорганизмов, являющихся возбудителями многих крайне опасных заболеваний человека, животных, растений. Эти патогенные микробы не раз причиняли страшный вред человеку, нередко ставя под угрозу само существование человечества. Достаточно напомнить страшные эпидемии средневековья, когда чума почти вдвое сократила численность населения ряда стран Европы. В XIX веке в Европу была занесена холера, в результате которой также погибло множество людей. Даже в более поздние годы,

современниками которых являются многие из нас, вспышки таких заболеваний, как сыпной тиф, дизентерия, брюшной тиф и другие, уносили сотни тысяч жизней. В течение многих столетий человечество не имело никаких средств борьбы против этих опасных врагов. Постепенно, в основном в XVIII—XIX веках, было разработано, если можно так назвать, «оборонительное оружие» — были найдены соответствующие гигиенические мероприятия (карантины, уничтожение трупов, проведение операций в асептических условиях и т. д.). Это был громадный шаг вперед, но у человека по-прежнему не было «наступательного оружия» в борьбе с болезнетворными микроорганизмами. Такое оружие было найдено только в XX веке.

Изыскание противомикробных веществ велось широким фронтом, и примерно в одно и то же время на нескольких направлениях были достигнуты первые серьезные успехи. С одной стороны, проводился интенсивный поиск синтетических веществ, могущих специфически убивать микроорганизмы, будучи малотоксичными для человека. Вначале успех был достигнут в отношении некоторых простейших — возбудителей сифилиса (сальварсан) и сонной болезни скота (наганин). Затем были найдены (в какой-то мере случайно) первые синтетические антибактериальные препараты — белый стрептоцид и большое число близких к нему соединений (сульфаниламидов). С другой стороны, на основе изучения антагонизма различных микроорганизмов были обнаружены соединения, образуемые одними микроорганизмами и сильно подавляющие другие. Эти вещества получили название антибиотиков. К ним относятся такие важные лекарственные средства, как пенициллин, стрептомицин, левомицетин, тетрациклин и многие другие.

Изложение истории нахождения противомикробных препаратов не входит в задачу данной книги, тем более что на русском языке уже опубликован ряд популярных книг, в которых детально изложены многие эпизоды изыскания этих средств. Как и в других главах этой книги, мы рассмотрим несколько наиболее важных и типичных соединений, стремясь на этих примерах показать значение комплекса химических и медико-биологических наук в нахождении и дальнейшем изучении таких препаратов.

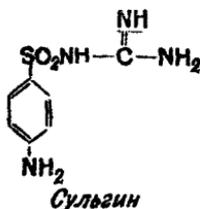
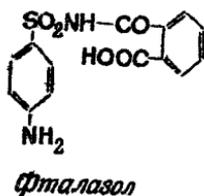
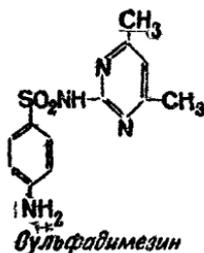
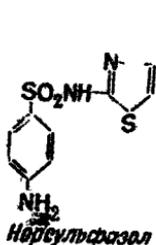
Синтетические antimикробные препараты

Как уже упоминалось, лечебное действие родоначальника большого семейства противомикробных препаратов — сульфаниламида — было открыто в 30-х годах нашего столетия.

Любопытно отметить, что сам сульфаниламид (белый стрептоцид),



был синтезирован значительно раньше (в 1908 г.), но его действие на микроорганизмы не изучалось. Вслед за открытием лечебных свойств сульфаниламида за короткое время было синтезировано и широко изучено в медико-биологическом отношении громадное число близких к нему соединений. Многие из этих веществ оказались более активными, более специфическими или менее токсичными, чем сам сульфаниламид (стрептоцид); некоторые из них нашли широкое применение в медицине. К их числу можно отнести норсульфазол, сульфадимезин, сульгин, фталазол и некоторые другие. Формулы этих соединений приведены ниже.



Некоторые из многочисленных синтезированных и изученных сульфаниламидов одно время находили широкое применение в медицине (например, сульфидин, красный стрептоцид, сульфазол и др.), но затем они были вытеснены более эффективными и менее токсичными препаратами.

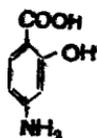
Как видно из приведенных формул, перечисленные практически ценные препараты очень сходны между собой, являясь производными самого сульфаниламида. Изучение зависимости между строением различных близких соединений и их антибактериальными свойствами показало, что для проявления биологического действия заместители должны находиться в пара-положении. Это наблюдение, а также факт снижения активности сульфаниламидов в присутствии пара-аминобензойной кислоты (играющей для многих микроорганизмов роль

важного витамина) послужили основанием для предположения, что антибактериальные свойства этого класса соединений являются следствием их структурного сходства с пара-аминобензойной кислотой, в результате чего эти соединения заменяют ее в каких-то важных бактериальных ферментах, делая их неактивными. При наличии значительных количеств пара-аминобензойной кислоты она, в свою очередь, может вытеснить их, вновь активируя фермент. Соединения типа сульфаниламида носят название антиметаболитов. На основе аналогичного принципа были синтезированы некоторые антагонисты фолевой кислоты (антифолевые препараты). Несмотря на определенные экспериментальные обоснования и общую наглядность гипотезы об антиметаболитической природе действия сульфаниламидов, это предположение нельзя считать строго доказанным. Применение сульфаниламидов сыграло очень большую роль в лечении ряда заболеваний, возбудители которых представляют собой в первую очередь грамположительные бактерии: стафилококки и стрептококки (заражающие раны и нередко вызывающие общий сепсис), пневмококки (возбудители воспаления легких), некоторые грамотрицательные бактерии (например, гонококки — возбудители гонорреи) и отдельные виды простейших (например, бледная спирохета — возбудитель сифилиса).

До настоящего времени многие сульфаниламидные препараты успешно применяются при ряде неспецифических простудных заболеваний (в частности норсульфазол, сульфадимезин), расстройстве желудка (фталазол, сульгин), для лечения ран (стрептоцид, в особенности в форме эмульсии) и т. д. Несмотря на большую роль, которую сыграли сульфаниламидные препараты в медицине, они не решили в достаточной мере сложную задачу борьбы с патогенными микроорганизмами. С одной стороны, они обладали значительной активностью в отношении лишь сравнительно узкой (хотя и очень опасной) группы микроорганизмов, но в ряде случаев оказывались недостаточно эффективными при лечении заболеваний, вызываемых микроорганизмами, обычно чувствительными к ним. С другой стороны, выяснилось, что патогенные микроорганизмы очень быстро привыкают к сульфаниламидам, вырабатывая новые, устойчивые расы. Поэтому с течением времени лечение сульфаниламидами стало менее эффективным, чем в первый период их применения. Приспособляемость микроорганизмов к лечебным антимикробным веществам, как оказалось позднее, вообще очень велика, что заставляет очень осторожно и продуманно назначать эти препараты, одновременно непрерывно изыскивая новые.

Вслед за сульфаниламидами было открыто еще несколько групп или отдельных синтетических препаратов, также нашедших применение в медицине. Например, в качестве проти-

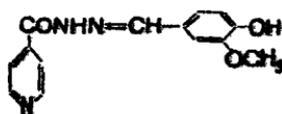
вотуберкулезных препаратов применяются пара-аминосалициловая кислота (ПАСК), а также гидразид изоникотиновой кислоты (изониазид, тубазид) и некоторые его производные, в частности продукт его конденсации с ванилином — фтивазид. Строение этих соединений изображено ниже.



*Пара-амино-
салициловая
кислота*



*Гидразид
изоникотиновой
кислоты*



Фтивазид

Интересно отметить, что значительно позднее синтеза и подробного изучения противотуберкулезных свойств гидразида изоникотиновой кислоты было обнаружено, что он является, по сути дела, природным соединением, так как содержится в соке индийской финиковой пальмы (*Phoenix sylvestris*).

Антибиотики

Пенициллины

Помимо синтетических антимикробных препаратов, в настоящее время в медицине очень интенсивно используются также природные антимикробные вещества — антибиотики. Первым из нашедших широкое практическое применение антибиотиков был пенициллин, вошедший в лечебную практику несколько позднее сульфаниламидов — в период 1942—1945 годов. Именно пенициллин благодаря редкостному сочетанию исключительно высокой антибактериальной активности и очень низкой токсичности для человека привлек внимание широких кругов ученых и практиков к проблеме антибиотиков. С самого начала следует отметить, что, строго говоря, термин «пенициллин» в приложении к конкретному лекарственному препарату неправилен, так как в настоящее время установлено, что существует очень много веществ, относящихся к этой группе и объединяемых под общим названием «пенициллин». Несмотря на общее сходство, они довольно сильно различаются по своим химическим и биологическим свойствам и находят различное применение в медицине. Поэтому более целесообразно познакомиться со свойствами некоторых наиболее важных пенициллинов отдельно.

Из них первым следует рассмотреть бензилпенициллин, поскольку он является наиболее характерным и до сих пор наиболее часто применяемым пенициллиновым препаратом,

Именно его (обычно в форме его калиевой соли) продают в аптеках под названием «пенициллин». В то же время бензилпенициллин был первым соединением этой группы, которое удалось получить в химически чистом виде в форме кристаллической натриевой соли. Изучение (главным образом, последней) позволило выяснить строение как самого бензилпенициллина, так и ряда родственных ему веществ.

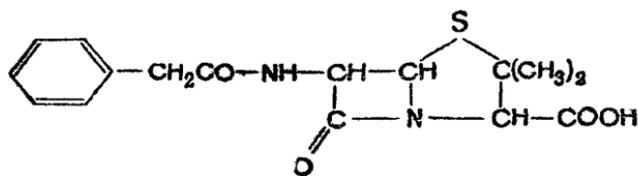
Бензилпенициллин является природным пенициллином, т. е. он образуется (наряду с другими пенициллинами и сопровождающими веществами) при росте некоторых плесеней (главным образом относящихся к родам *Penicillium* и *Aspergillus*).

Получение бензилпенициллина представляло на первых порах очень большие трудности, так как в культуральной жидкости, получающейся после выращивания на ней плесени, содержалось очень мало бензилпенициллина. Количество бензилпенициллина обычно измеряют в единицах; одна единица соответствует 0,6 микрограмма = 0,0006 миллиграмма чистой натриевой соли бензилпенициллина. В начальный период изучения пенициллинов обычно получались культуральные жидкости, содержащие всего лишь по нескольку единиц бензилпенициллина в 1 мл, наряду с которым в ней присутствовало большое количество различных примесей. Лишь в результате длительной напряженной работы больших коллективов ученых удалось создать высокоактивные штаммы плесени (продуцента пенициллина), способные на специально подобранных средах образовывать громадные количества антибиотика — порядка 15 000 ед/мл (т. е. примерно однопроцентный раствор). Очистка пенициллина (помимо его низкого содержания в культуральной жидкости) очень осложнилась его сильной лабильностью — он очень быстро разрушается как в кислой, так и в щелочной среде. Лишь тщательное изучение его свойств, нахождение строго определенных условий его извлечения и конструирование специальных экстракторов позволили решить эти задачи в технологическом плане.

Очень много труда потребовал также вопрос о химическом строении бензилпенициллина, который в конечном счете был однозначно разрешен комплексным использованием химических и физических приемов исследования. Имелось несколько причин, затруднявших выяснение правильной структуры бензилпенициллина: а) его большая неустойчивость; б) его принадлежность к очень мало изученному в тот период классу соединений; в) его склонность в очень мягких условиях превращаться в вещества, имеющие тот же состав, но построенные иначе (говоря химически — склонность к многочисленным реакциям изомеризации); г) наконец, немалые сложности были порождены также тем режимом засекречивания, который был установлен при химическом изучении пенициллина

правительствами США и Англии, когда научные достижения скрывались не только от ученых стран-союзников, но и от большинства научных работников своих стран.

Строение бензилпенициллина может быть выражено следующей структурной формулой:



Это довольно сильная кислота, дающая растворимые нейтральные соли с щелочными металлами и многими органическими основаниями. Большое практическое значение имеют также некоторые малорастворимые соли бензилпенициллина: с новокаином, с N, N'-дибензилэтилендиамином и другими органическими основаниями.

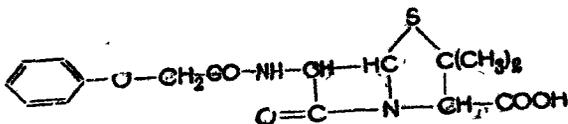
Наиболее реакционноспособной частью бензилпенициллина является его четырехчленное кольцо (β -лактаминный цикл), легко расщепляющееся или изменяющееся при воздействии щелочамн, кислотами, аминами, спиртами и другими реагентами, β -лактаминный цикл претерпевает изменения и при всех известных изомерных превращениях бензилпенициллина.

Бензилпенициллин очень активен против большого числа грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки, пневмококки и др.), против некоторых грамотрицательных бактерий (гонококки) и против возбудителя сифилиса. Он значительно эффективнее сульфаниламидов, будучи в то же время менее токсичным. Поэтому в ряде случаев, когда лечение сульфаниламидами было безуспешным, применение бензилпенициллина позволяло спасти, казалось бы, уже безнадежных больных.

Несмотря на исключительную ценность бензилпенициллина для лечебной практики, он обладал рядом недостатков: из-за очень большой неустойчивости в кислой среде бензилпенициллин нельзя принимать через рот, так как в желудочном соке, обладающем высокой кислотностью, антибиотик почти нецело инактивировался; бензилпенициллин очень быстро инактивируется также под влиянием фермента пенициллиназы, вызывающего быстрое расщепление его β -лактаминового цикла; этот фермент образуется большим числом патогенных и непатогенных микроорганизмов. Кроме того, бензилпенициллин очень мало действует на многие штаммы микроорганизмов, приобретшие к нему устойчивость, а также практически неактивен против большинства грамотрицательных бактерий. В результате ряда исследований удалось найти новые пеницил-

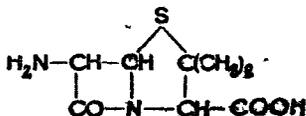
лины, лишенные тех или иных указанных недостатков бензилпенициллина. Как они были получены?

Для получения новых пенициллинов наиболее эффективными оказались два пути. Вначале было выяснено, что если в питательную среду, обычно содержащую фенилуксусную кислоту или ее производные, вводить вместо последних определенные количества некоторых других кислот, например феноксиуксусной кислоты, то удается «обмануть» плесень и вместо обычного продукта метаболизма — бензилпенициллина — она будет образовывать новый продукт. Это будет тоже пенициллин, но содержащий другую боковую цепь. Таким путем было получено несколько сот различных, так называемых «биосинтетических» пенициллинов, содержащих необычные группировки или атомы (например, остатки тиофена, атомы селена и др.). Некоторые из биосинтетических пенициллинов в том или ином отношении заметно отличались от бензилпенициллина, но только один из них — феноксиметилпенициллин — нашел широкое практическое применение.



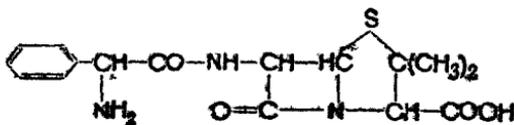
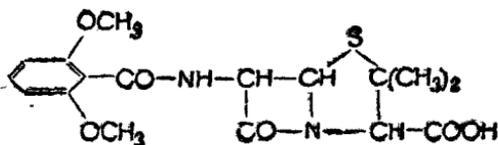
Феноксиметилпенициллин (иногда называемый «пенициллином V») значительно более устойчив в кислой среде, вследствие чего он почти не разрушается под влиянием кислотности желудочного сока, хорошо всасывается и его содержание в крови легко достигает лечебной концентрации. Поэтому феноксиметилпенициллин обычно принимают через рот в виде таблеток, а не в форме инъекций, как бензилпенициллин. По своему действию на микроорганизмы он очень сходен с бензилпенициллином.

При попытках получить ряд новых биосинтетических пенициллинов выяснилось, что «обманывать» плесень удается лишь до определенных пределов — далеко не каждая кислота, прибавленная в питательную среду, вызывает образование нового пенициллина. Часть кислот плесень легко расщепляет, другие она не усваивает, третьи оказываются для нее очень токсичными. Тем самым число «биосинтетических» пенициллинов оказалось довольно ограниченным. Значительно большие возможности для получения новых пенициллинов создались после открытия близкого пенициллину вещества — 6-аминопенициллаовой кислоты (6-АПК).

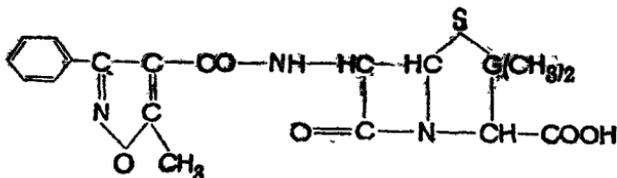


Это соединение образуется при выращивании плесени (продуцента бензилпенициллина) на питательной среде, не содержащей таких кислот, которые могут служить предшественниками боковой цепи пенициллинов. В этом случае плесень как бы «недостаивает» молекулу антибиотика, образуя полупродукт. На практике, однако, оказалось более целесообразно получать 6-аминопенициллановую кислоту путем ферментативного отщепления боковой цепи от бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина, получаемых путем обычного биосинтеза. Кроме того, это соединение может быть получено и путем полного химического синтеза; можно считать, что осуществлен синтез всех пенициллинов. Однако с практической точки зрения получение бензил- (и феноксиметил-) пенициллина путем биосинтеза настолько хорошо разработано, что их химический синтез (пока еще довольно сложный) не выдерживает с ним конкуренции.

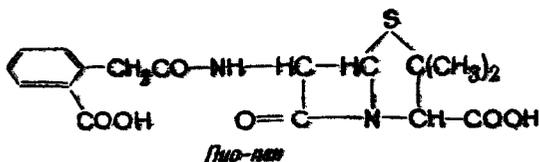
Полученная тем или иным путем 6-аминопенициллановая кислота может быть превращена в бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин или любой иной пенициллин путем обработки хлорангидридами кислот. Здесь нет уже практически никаких ограничений. Таким образом было получено очень много так называемых «полусинтетических» пенициллинов. Некоторые из них оказались в тех или иных отношениях значительно эффективнее бензилпенициллина и феноксиметилпенициллина. Так, 2, 6-диметоксифенилпенициллин (метициллин, селбенин)



Ампициллин



Оксациллин



очень активен в отношении ряда устойчивых к бензилпенициллину грамположительных бактерий, ибо он значительно устойчивее к действию образуемой ими пенициллиназы.

Ампициллин и оксациллин в отличие от бензилпенициллина обладают значительной активностью в отношении ряда грамотрицательных бактерий (в частности, протей), а про-печ (α -карбокисбензилпенициллин) даже способен подавлять (правда, в довольно высоких, но для человека нетоксичных дозах) грамотрицательную синегнойную палочку (*Pseudomonas aeruginosa*), очень устойчивую к действию большинства antimicrobных средств.

Таким образом, в случае пенициллинов удалось получить препараты, близкие природным, но в ряде отношений значительно превосходящие их.

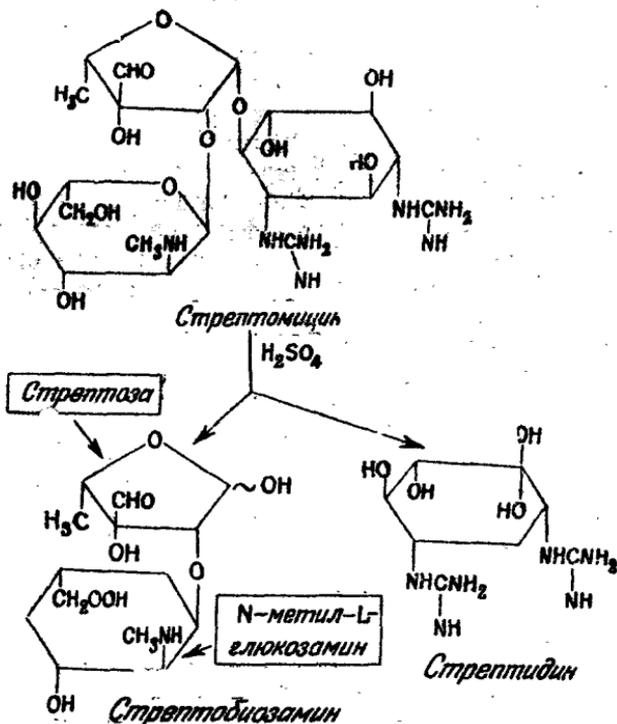
Стрептомицин

Несколько позднее бензилпенициллина был открыт другой важный антибиотик, в течение уже более 20 лет играющий важную роль в медицине, — стрептомицин. Он образуется актиномицетом (лучистым грибом), *Streptomyces griseus* (*Actinomyces streptomycini*). Стрептомицин обладает значительно более широким, чем бензилпенициллин, спектром антибиотического действия, подавляя многие грамположительные, грамотрицательные и кислотостойкие бактерии. В настоящее время особенно большое значение имеет его активность в отношении микобактерий — возбудителей туберкулеза; он до последнего времени является одним из самых действенных противотуберкулезных препаратов. При лечении заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями, он применяется сейчас сравнительно редко, так как найдены более эффективные антибиотики широкого спектра действия: хлорамфеникол (левомицетин) и антибиотики тетрациклиновой группы.

Благодаря наличию в стрептомицине N-метиламинной и двух гуанидиновых групп он является сильным основанием, дающим нейтральные соли с минеральными кислотами. Обычно в медицине применяется сульфат стрептомицина. Поскольку стрептомицин не всасывается из желудочно-кишечного тракта, его приходится вводить путем внутримышечных инъекций (либо вводя его непосредственно в инфицированную ткань или полость).

Стрептомицин в химическом отношении является углевод-

ным соединением. При кислотном гидролизе он распадается на две лишённые антибактериальной активности части — стрептоидин и стрептобиозамин, состоящий, в свою очередь, из двух частей — весьма необычного сахара стрептозы и производного глюкозы — N-метил-L-глюкозамина. Эти превращения изображены на следующей схеме



Стрептомицин обладает значительной токсичностью — при длительном применении он вызывает глухоту и нарушение аппарата равновесия (8-й пары черепно-мозговых нервов). Поэтому много труда было затрачено на попытки так изменить строение стрептомицина, чтобы, сохранив его антибактериальные свойства, уменьшить токсичность. Одно время казалось, что продукт восстановления его альдегидной группы — дигидрострептомицин — превосходит по лечебной ценности природный антибиотик. Однако длительный опыт использования дигидрострептомицина показал, что это не так. В последнее время его практическое применение почти полностью прекратилось. Не удалось найти и других производных стрептомицина, превосходящих его в практическом отношении. Таким образом, в данном случае природное соединение оказалось пока непревзойденным.

Как видно из приведенной формулы, строение стрептоми-

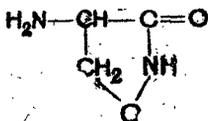
цина довольно сложно; его синтез еще не осуществлен, хотя уже разработаны методы синтеза всех трех его составляющих: стрептидина, стрептозы и N-метил-L-глюкозамина.

Циклосерин

Другим важным противотуберкулезным антибиотиком, нашедшим широкое применение в ряде стран, является циклосерин. Он был открыт в 1954—1955 годах практически одновременно несколькими группами исследователей как продукт жизнедеятельности различных актиномицетов. Вскоре было установлено его довольно простое, но очень своеобразное строение; это и позволило разработать несколько методов его синтетического получения. В настоящее время циклосерин (как и ниже описываемый хлорамфеникол) получают в производственных масштабах не только биосинтетически (т. е. при выращивании соответствующих актиномицетов), но и путем полного химического синтеза.

Циклосерин активен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов; но практически наиболее важным является его противотуберкулезное действие. Интересной особенностью циклосерица является его малая противотуберкулезная активность в опытах на экспериментальных животных, при очень высокой противотуберкулезной активности *in vitro* и высокой эффективности при лечении человека. Как и другие противотуберкулезные средства, его приходится применять очень длительное время.

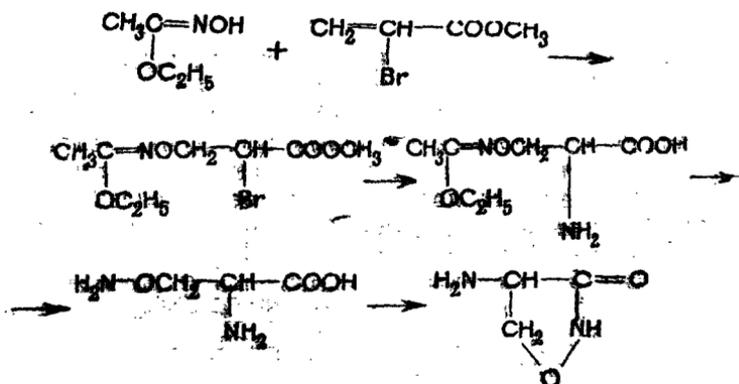
Циклосерин является внутренним O-эфиром D-серингидроксамовой кислоты, содержащим малоустойчивую гетероциклическую систему изооксазолидин-3-она. Его строение может быть выражено следующей формулой:



Относительная простота строения циклосерина позволила разработать ряд методов его синтеза; в качестве примера можно привести оригинальный метод его получения, предложенный несколько лет назад советскими химиками. Он основан на введении остатка $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-$ в органические соединения при помощи оксиминоуксусного эфира.

В молекуле циклосерина содержится один асимметричный атом углерода, вследствие чего он может существовать в виде двух оптических изомеров. Поскольку значительно большим лечебным действием и меньшей токсичностью обладает при-

родная форма антибиотика (D-изомер), при синтетическом получении циклосерина (при котором, естественно, получается оптически неактивное — рацемическое соединение) необходимо осуществить разделение на оптические формы.



Сходным путем был осуществлен синтез ряда аналогов циклосерина, что позволило выяснить существенные зависимости между строением антибиотика и его биологическими свойствами. Эти материалы были крайне важны при изучении механизма его антибиотического действия, которое оказалось связанным (подробнее об этом будет сказано в конце главы) с его способностью реагировать с ферментами, содержащими остаток фосфопиридоксала.

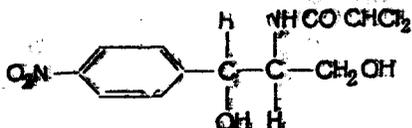
Хлорамфеникол (левомицетин)

Открытие стрептомицина, образуемого актиномицетом *Streptomyces griseus*, привлекло очень большое внимание к этим микроорганизмам как возможным источникам антибиотиков. Актиномицеты стали интенсивно изучаться, и за короткое время среди их продуктов жизнедеятельности действительно было найдено большое число разнообразнейших антибиотиков, многие из которых нашли затем широкое практическое применение или оказались очень интересными в теоретическом отношении.

Одним из первых практически ценных (в то же время обладающим необычным строением) антибиотиков был открыт хлорамфеникол (выпускаемый в СССР под названием «левомицетин»), образуемый актиномицетом *Streptomyces venezuelae*. Хлорамфеникол обладает широким спектром действия, подавляя как грамположительные, так и многие грамотрицательные бактерии, в том числе возбудители чумы, холеры, туляремии, дизентерии, брюшного тифа и ряда других опасных заболеваний. Кроме того, он активен и в отношении очень мелких микроорганизмов — риккетсий, являющихся

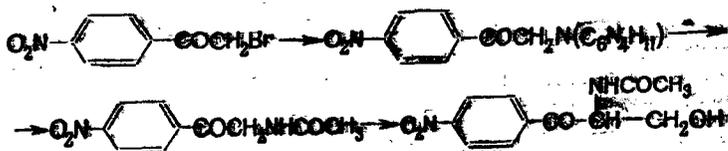
возбудителями сыпного тифа, марсельской лихорадки и других риккетсиозов. Хлорамфеникол хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта и его обычно вводят через рот. Правда, этому несколько мешает его интенсивно горький вкус, но антибиотик можно применять в таблетках и капсулах. Кроме того, удается получить его безвкусные производные, которые легко распадаются в желудке с образованием исходного активного соединения. Хлорамфеникол обладает сравнительно невысокой токсичностью и его применение, как правило, не вызывает побочных явлений.

Строение хлорамфеникола довольно просто, но в то же время необычно для природного соединения. Как можно видеть из нижеследующей структурной формулы



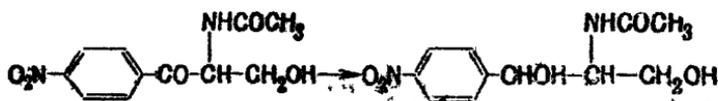
хлорамфеникол содержит нитрогруппу (присоединенную к бензольному циклу) и остаток дихлоруксусной кислоты. Хлорамфеникол оказался первым природным соединением, в котором было четко доказано наличие нитрогруппы. До этого существовало убеждение, что нитрогруппу удается ввести в органические соединения только химическим путем в очень жестких условиях — например, действием смеси азотной и серной кислот при повышенной температуре. После расшифровки строения хлорамфеникола был открыт еще ряд природных нитросоединений, являющихся продуктами жизнедеятельности как микроорганизмов (актиномицетов, плесеней), так и некоторых растений. Пути биологического образования нитрогруппы еще точно не изучены, но, по-видимому, она образуется путем энзиматического окисления аминогруппы.

Относительная простота строения хлорамфеникола побудила многих химиков заняться изысканием путей синтеза как самого антибиотика, так и его аналогов. В итоге интенсивной работы за короткое время было найдено несколько способов его полного синтеза, причем некоторые из них оказалось возможным осуществить в промышленных масштабах. Вследствие этого в настоящее время хлорамфеникол в больших количествах изготавливается синтетическим путем.

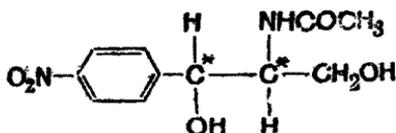


Одна из схем синтеза хлорамфеникола рассматривается ниже — в качестве исходного продукта в ней используется р-нитроацетофенон $p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_3$, который может быть легко получен рядом методов. В это соединение в несколько стадий вводится аминогруппа, затем путем взаимодействия с формальдегидом удлиняется боковая цепь (см. схему на стр 119).

Одним из наиболее важных и наиболее сложных моментов синтеза хлорамфеникола является последующее восстановление кетогруппы с образованием диокси соединения.



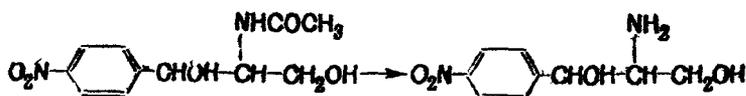
Трудности этой стадии связаны с двумя обстоятельствами. Во-первых, нужно восстановить кетогруппу ($\text{C}=\text{O}$) в оксигруппу (C(OH)) путем присоединения к ней двух атомов водорода, тогда как в молекуле содержится нитрогруппа (NO_2), которая при действии обычных восстановителей более реакционноспособна, чем кетогруппа. Поэтому очень трудно подобрать такие условия реакции, чтобы добиться полного восстановления кетогруппы, не затронув нитрогруппу. Одним из специфических реагентов, позволяющих провести такую реакцию, являются алкогалаты алюминия, в частности изопропилат алюминия. Вторая причина осложнений зависит от строения образующегося продукта восстановления — так называемого диола.



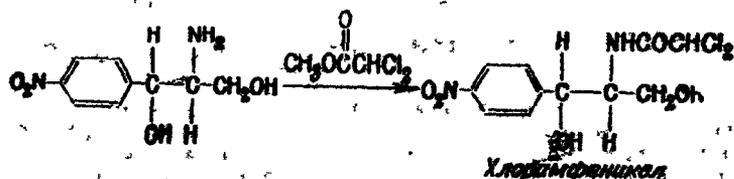
Дело в том, что два центральных атома углерода в этом соединении (отмеченные*) соединены каждый с четырьмя различными группировками и являются, таким образом, асимметрическими. Вещества, имеющие один асимметрический атом углерода, могут существовать в виде двух пространственно различных форм, отличающихся друг от друга, как предмет и его зеркальное изображение (как левая перчатка отличается от правой). Такие соединения не различаются по своим физическим свойствам (кроме направления вращения поляризованного света) и химическим свойствам (кроме взаимодействия с другими асимметрическими соединениями). Однако они могут иметь совершенно различные биологические свойства — одно из таких соединений может, например, подавлять микроорганизмы, а другое (его антипод) быть в этом отношении неактивным. Если в соединении содержатся два асимметрических атома, оно может существовать в виде четырех пространственно различных форм, из которых только одна обладает сильным антибиотическим действием. Три остальные пространственно отличные от нее формы не действуют на микроорганизмы, но все они в разной мере токсичны.

Поэтому при синтезе хлорамфеникола возникает необходимость выделить в чистом виде одну-единственную нужную пространственную форму и полностью отделить три остальные.

Этот процесс проводят в два этапа. Сразу же после восстановления отделяют две пространственно ненужные формы, используя их различия в растворимости. При этом получают вещество, которое содержит равные количества двух оптически активных форм (рацемат). Поскольку обе содержащиеся в рацемате пространственные формы не различаются по своей растворимости, их разделение очень сложно. Для этого предварительно удаляют остаток уксусной кислоты, имеющейся в молекуле, и получают таким образом амин, способный давать соли.



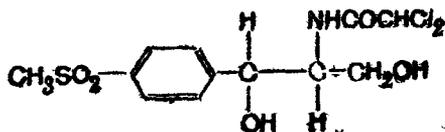
Этот рацемический амин обрабатывают какой-либо оптически активной кислотой (например, винной), разделяют полученные соли и выделяют из одной нужную пространственную форму амина. Путем взаимодействия последней с эфиром дихлоруксусной кислоты получают хлорамфеникол, ничем не отличающийся от природного антибиотика.



Поскольку разделение рацемического амина на составляющие его пространственно чистые формы является очень тонкой и кропотливой задачей; в некоторых случаях эту стадию опускают и получают дихлорацетильное производное рацемического амина. Образующийся при этом рацемический продукт носит название синтомицина. Он содержит только половину нужной пространственной формы хлорамфеникола, и поэтому в два раза слабее действует на микроорганизмы и для получения одинакового эффекта его нужно брать вдвое больше.

В то же время содержащаяся в нем вторая («неправильная») пространственная форма обладает заметной токсичностью. Все это резко снижает лечебную ценность синтомицина по сравнению с чистым антибиотиком (который у нас выпускается под названием левомицетина). Конечно, в ряде случаев синтомицин можно применять (в частности при очень коротких курсах лечения, для поверхностного применения в виде мазей, для ветеринарных целей и т. д.), однако его использование связано с большими опасностями, чем применение левомицетина (чистого хлорамфеникола).

Химическим путем было получено очень большое число аналогов хлорамфеникола, отличающихся от него теми или иными особенностями строения. Изучение их биологических свойств показало, что ни один из них не обладает существенными преимуществами перед природным соединением. Только один из таких аналогов нашел практическое применение для лечения брюшного тифа (по некоторым сведениям, он несколько превосходит в этом отношении хлорамфеникол); он выпускается под фирменным названием тиоциметин. В химическом отношении он отличается от хлорамфеникола тем, что содержит вместо нитрогруппы остаток метилсульфона.

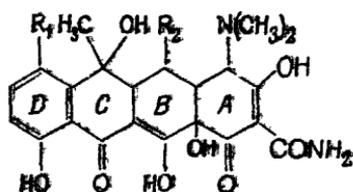


Механизм действия хлорамфеникола связан с нарушением некоторых стадий биосинтеза белка. Подробнее об этом сказано в конце главы.

Тетрациклины

Почти одновременно с хлорамфениколом был открыт ауреомицин — первый представитель тетрациклинов, очень важной группы антибиотиков широкого спектра действия. Вскоре был найден второй сходный с ним антибиотик — тетрациклин. В настоящее время известно уже около 10⁶ антибиотиков этой группы, из которых важнейшими являются сам тетрациклин, 5-окситетрациклин (тетраамицин) и 7-хлортетрациклин (ауреомицин, биомицин). Они все очень сходны по антибактериальному спектру, но несколько отличаются по токсичности и устойчивости. В настоящее время наиболее широкое применение находит тетрациклин, несколько меньшее — окситетрациклин (тетраамицин), тогда как хлортетрациклин (ауреомицин, биомицин) используется в медицине сравнительно мало, но по-прежнему находит широкое немедицинское применение. Тетрациклины хорошо всасываются из желудочно-кишечного тракта и поэтому обычно их принимают через рот. Они очень активны в отношении почти тех же микроорганизмов, что и хлорамфеникол (грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также риккетсий), но несколько уступают ему по активности против возбудителей брюшного тифа.

Выяснение строения тетрациклинов потребовало довольно длительных усилий, так как они оказались сложными соединениями, склонными к различным превращениям. В настоящее время их строение выяснено полностью. Оно может быть выражено следующей общей формулой:



- $R_1 = \text{H}_2 = \text{H}$ тетрациклин
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$ 5-окситетрациклин (тетраамицин)
 $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{H}$ хлортетрациклин (ауреомицин, биомицин)

При обработке спор актиномицетов, образующих тетрациклин и хлортетрациклин, различными факторами (облучение, действие особых химических веществ — мутагенов) удалось

получить мутантные штаммы, образующие несколько видоизмененные тетрациклины, лишённые метильной группы, находящейся в кольце С. Такие десметильные аналоги тетрациклинов несколько устойчивее обычных тетрациклинов.

Химики ряда стран затратили много усилий на осуществление синтеза этих соединений, что оказалось очень сложной задачей. Как выразился американский химик лауреат Нобелевской премии Р. Вудворд, «тетрациклины представляют собой дьявольское сплетение реакционноспособных групп». Только в 1967 году полный синтез тетрациклина был осуществлен советскими учеными. В промышленных масштабах все тетрациклины производятся только биосинтетически — путем ферментации соответствующего актиномицета в определенных условиях.

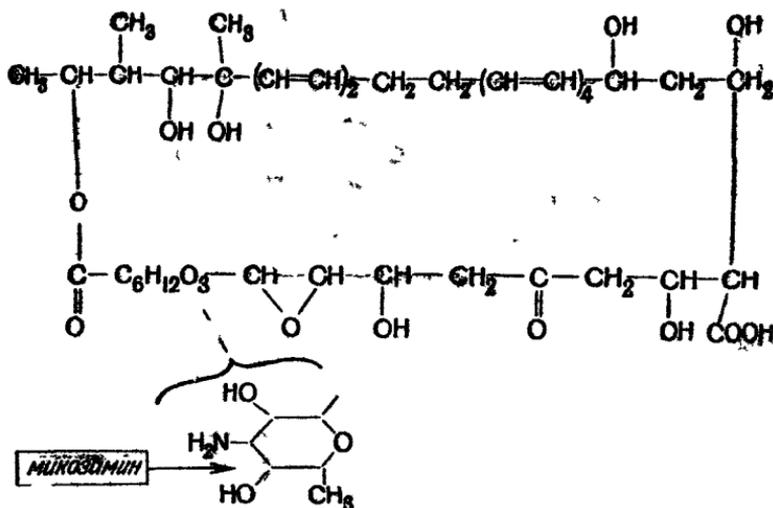
Противогрибковые (антифунгальные) антибиотики

Перечисленные антибиотики (пенициллины, стрептомицин, циклосерин, хлорамфеникол, тетрациклины) в значительной мере решили проблему борьбы с заболеваниями, вызываемыми различными бактериями. В то же время все они были практически неактивны в отношении патогенных грибов и дрожжей. Более того, плохо контролируемое медицинское применение антибиотиков широкого спектра действия одно время привело к усиленному развитию у больных *Candida albicans* — дрожжей, вызывающих молочницу, а иногда даже общее заражение. Дело в том, что обычно у многих больных эти дрожжи встречаются в организме в очень небольших количествах, находясь в биологическом равновесии с бактериальной флорой. Когда же при плохо контролируемом приеме антибиотиков широкого спектра действия это равновесие нарушалось (исчезали все бактерии), то начиналось безудержное развитие упомянутых дрожжей, которые становились очень опасными для здоровья и даже жизни больного.

Для предотвращения развития этих дрожжей (возникновения кандидомикоза) необходимы специальные противодрожжевые (противогрибковые) антибиотики. Такие антибиотики важны также для лечения заболеваний, вызываемых патогенными грибами; к их числу можно отнести ряд заболеваний кожи — паршу (вызываемую грибами *Achorion schoenleinii*), трихофитию (обычно называемую «стригущим лишаем»), возбудителем которой являются различные виды гриба *Trichophyton* и др., а также заболевание ногтей (возбудитель которого также является патогенным грибом). В настоящее время известно уже большое число антибиотиков, активных против грибов и дрожжей, но лишь

немногие из них могут успешно применяться в медицине. Следует упомянуть в первую очередь нистатин и гризеофульвин.

Нистатин образуется актиномицетом *Streptomyces noursei*. Это сравнительно малоустойчивое (особенно в присутствии некоторых примесей), очень ненасыщенное соединение. Строение нистатина очень сложно, и его структурная формула установлена еще не полностью. Она приведена ниже.



Нистатин

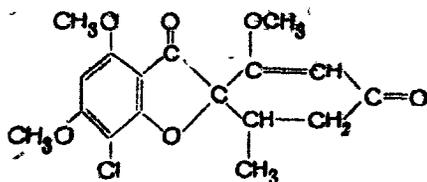
В этой формуле все еще не выяснено строение одной части ((C₆H₁₂O₃) и точное место присоединения аминосахара — микозамин.

Особенностью нистатина является наличие в его молекуле четырех сопряженных (т. е. стоящих через одну) двойных связей, что является причиной очень характерного ультрафиолетового спектра поглощения. Обычно о количестве нистатина в препаратах судят по интенсивности поглощения при определенной длине волны. Нистатин малорастворим в воде, но при приеме через рот создается его достаточная лечебная концентрация. В последние годы стало правилом при длительном назначении тетрациклина одновременно давать больным нистатин; нередко выпускается готовая смесь этих двух антибиотиков — тетрациклин с нистатином.

Далеко не все патогенные грибы чувствительны к нистатину, кроме того, этот антибиотик лишь с большим трудом проникает в некоторые ткани. Иногда значительно эффективнее оказывается гризеофульвин, образуемый плесенью *Penicillium griseo-fulvum*. История изучения гризеофульвина довольно любопытна. Он является одним из старейших членов семейства антибиотиков, так как был открыт еще в 1939 го-

ду. Он привлек внимание прежде всего необычным действием на грибы — вызывал очень своеобразное искривление их конидий, в результате чего его даже называли «фактор, вызывающий искривление» («curling-factor»).

Вскоре было подробно изучено его действие на многие микроорганизмы и полностью выяснено его строение, которое может быть выражено приведенной ниже формулой, но практического применения он не находил.



Гризеофульвин

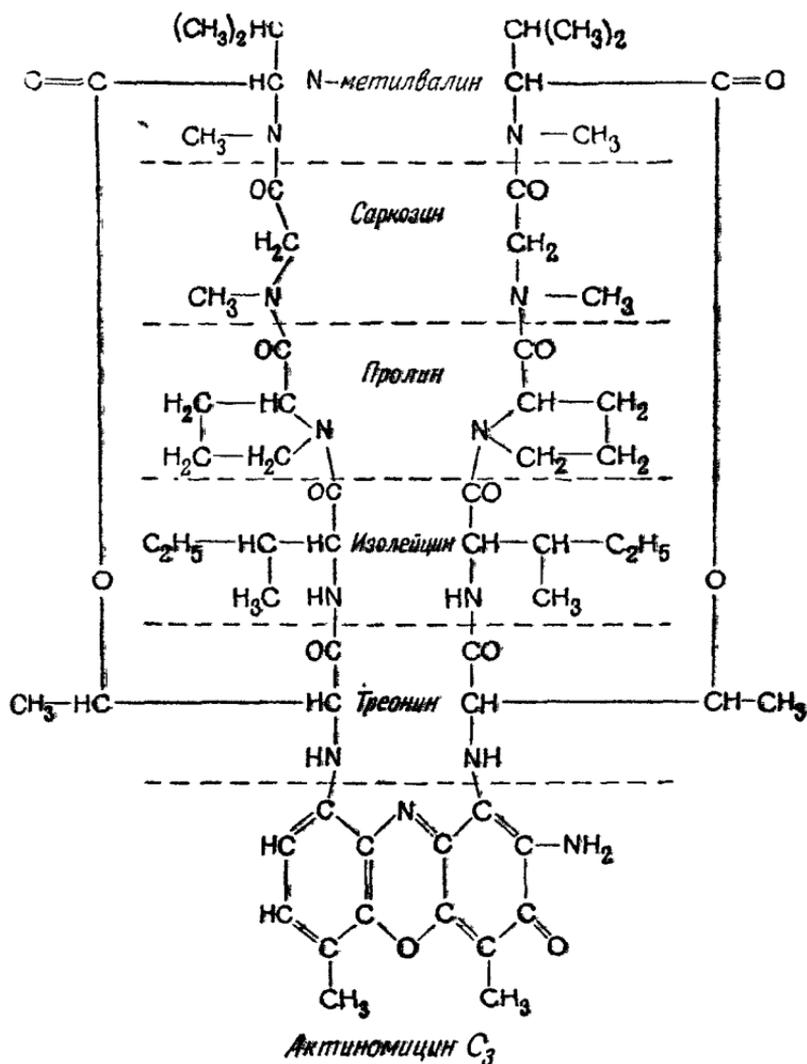
Были, правда, сделаны попытки его применения для борьбы с некоторыми фитопатогенными грибами, поражающими полезные растения, но большого успеха они не имели. Лишь более чем через 20 лет после его открытия были предприняты попытки его лечебного применения, увенчавшиеся успехом. Оказалось, что гризеофульвин является лучшим средством лечения такого заболевания, как длительное мучительное поражение ногтей, вызываемое *Trichophyton rubrum*. При применении через рот гризеофульвин постепенно приводит к полному исцелению.

Противораковые антибиотики

Большие успехи, которыми сопровождалось применение антибиотиков для лечения многочисленных опаснейших заболеваний, вызываемых грамположительными, грамотрицательными и кислотостойкими бактериями, риккетсиями, дрожжами и грибами, давало основание предполагать, что в природе (в частности среди продуктов жизнедеятельности микроорганизмов) можно найти вещества, полезные при лечении злокачественных опухолей. Такие вещества получили неточное название противоопухолевых или противораковых антибиотиков. Неточность этого термина заключается в том, что проблема лечения опухолей не связана с проблемой избирательного подавления какого-то внешнего возбудителя (микроорганизма) без поражения организма человека. Вопрос этиологии и лечения злокачественных опухолей много сложнее. Тем не менее нельзя считать априорно бессмысленными попытки найти в природе или получить синтетически вещества, которые

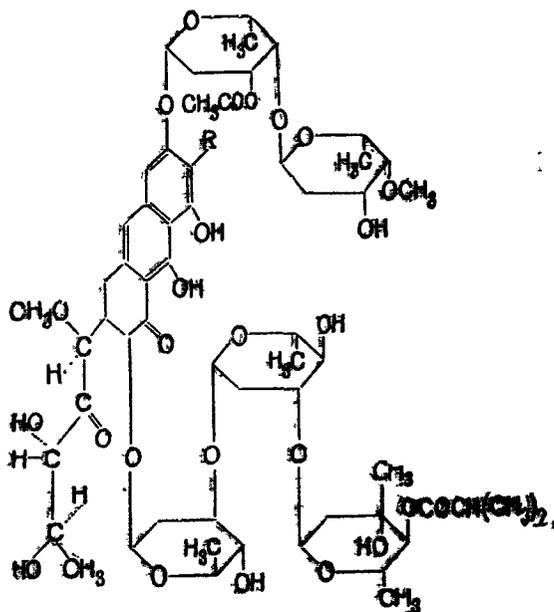
бы во много раз сильнее действовали на опухолевую ткань, чем на нормальную. Уже в настоящее время найдены вещества, вне всякого сомнения обладающие некоторой специфичностью в этом отношении. (Правда, иногда противоопухолевое действие того или иного препарата в значительной мере обусловлено его способностью вообще угнетать размножение клеток). Среди антибиотиков, действующих на микроорганизмы, некоторые обладают также противоопухолевым действием. Из них можно упомянуть две группы соединений: актиномицины и антибиотики группы хромомицинов — оливомицинов.

Актиномицины, как и только что рассмотренный гризе-



офульвин, относится к наиболее «старым» антибиотикам, так как первый представитель этой группы веществ был открыт еще в 1940 году. В настоящее время известно несколько десятков актиномицинов, отличающихся строением или положением аминокислот, входящих в их состав. Актиномицины очень активны в отношении многих грамположительных бактерий, но они не нашли практического применения из-за высокой токсичности; их смертельная доза для человека (при подкожном введении) составляет всего лишь около 50 мг. Поэтому длительное время считалось, что актиномицины не найдут никакого лечебного применения. Однако в период 1952—1955 годов было установлено, что они очень сильно подавляют размножение (пролиферацию) некоторых клеточек, что давало основание испытать их в качестве противораковых средств. После длительного периода изучения (когда были получены очень противоречивые данные) стало ясно, что при некоторых формах злокачественных опухолей (например, при опухоли Уильма) они оказывают определенное лечебное действие и находят (в сочетании с другими средствами лечения) практическое применение.

Актиномицины представляют собой довольно сложные соединения, строение которых полностью выяснено. Они со-



Вливомицин А (R—H)

Хромомицин А₂ (R—CH₃)

стоят из хромофорного ядра (придающего актиномицинам яркую оранжево-желтую окраску), и двух своеобразных колец, построенных из пяти аминокислот. Формула одного из актиномицинов (актиномицина С₃) приведена выше. Недавно осуществлен его полный синтез. Различие между отдельными актиномицинами зависит, как уже упоминалось, от строения или взаимного расположения аминокислот, входящих в состав двух его циклопептидных частей, где вместо одного или двух остатков пролина могут находиться остатки оксипролина или γ-оксопролина, а вместо остатков изолейцина — остатки валина или других аминокислот.

Антибиотики группы оливомицинов — хромомицинов также обладают сильным действием на грамположительные бактерии и высокой токсичностью. Как было недавно установлено советскими учеными, различие между двумя типами (оливомицины и хромомицины) заключается в строении хромофорной части. Хромомицины можно рассматривать как 9-метильные производные оливомицинов. Различие между отдельными представителями каждого типа зависит от строения входящих в молекулу сахаров. Оливомицин А и хромомицин А₃ применяют при лечении некоторых опухолевых заболеваний соединительной ткани.

Немедицинское применение антибиотиков

Выше, в начале главы и при описании отдельных антибиотиков, особое внимание уделялось их практическому применению в медицине для лечения тех или иных заболеваний человека. Хотя медицинское использование антибиотиков очень важно, оно далеко не единственное. Многие антибиотики широко используются в сельском хозяйстве как в животноводстве, так и в растениеводстве. Следует подчеркнуть, что некоторые антибиотики (в первую очередь хлортетрациклин) не только оказываются очень ценными в лечебных целях, но и являются очень активными стимуляторами роста молодняка. Сравнительно небольшие дозы антибиотика, введенные в комбинированные корма, вызывают лучшее усвоение кормов и ускорение развития молодняка (животных и птицы). Применение антибиотиков оказывается экономически очень выгодным как в животноводстве, так и в растениеводстве.

Так, в Японии в последние годы почти весь урожай риса собирается с полей, которые обрабатываются антифунгальным антибиотиком бластицидином S, специфически подавляющим один из основных вредителей риса — грибок *Piricularia oryzae* и нетоксичным для рыбы. Это очень важно, так как в Японии выращивание риса сочетают, как правило, с разведением рыбы, а применение обычных синтетических фунгицидов препятствует этому.

Некоторые антибиотики (например, нистатин) находят применение в виноделии (для прекращения брожения вина), в медицинской промышленности (для выработки стерильных вакцин и сывороток) и т. д.

Очень важное значение имеет использование антибиотиков (в частности, хлортетрациклина) для консервирования рыбы, мяса, фруктов и других скоропортящихся продуктов. Если эти продукты обрызгать слабым раствором антибиотика, они могут длительное время храниться даже при комнатной температуре. При приготовлении пищи эти антибиотики удаляются или разрушаются, так что не могут оказать вредного действия на организм человека.

Количество антибиотиков, используемых для подкормки животных, консервирования продуктов и других немедицинских целей, сопоставимо с количеством антибиотиков, выпущаемых в качестве лечебных средств.

Антибиотики как регуляторы биологических процессов (механизм действия антибиотиков)

В первый период изучения антибиотиков они рассматривались прежде всего как сильные противомикробные лечебные средства. Поэтому при их изучении рассматривалось их общее угнетающее действие на микроорганизмы и на клетки животных. Затем, при более углубленном изучении, стало ясно, что многие антибиотики являются сильными и очень избирательными регуляторами различных жизненно важных функций клеток.

Сейчас можно считать твердо установленным, что известные в настоящее время антибиотики очень различаются по механизму их действия. Некоторые из них (например, нистатин и другие противогрибковые полиеновые антибиотики, а также антибиотики депсипептидной природы, в частности палиномицин) в первую очередь действуют на клеточную стенку, вызывая изменение ее проницаемости. Другие (например, ленициллины, ванкомицин и др.) препятствуют синтезу веществ, из которых создается клеточная оболочка бактерий. Активность циклосерина связана с его взаимодействием с некоторыми ферментами обмена аминокислот, содержащими остаток фосфонитридоксаля (витамина B₆). Антимицины (сильные противогрибковые антибиотики, обладающие значительной токсичностью) нарушают окислительно-восстановительные процессы в клетке. Ряд антибиотиков (хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, актиномицины, пуромицин, эритромицин и др.) нарушает идеальные стадии сложного процесса образования белков в клетке.

Процессы взаимодействия антибиотика с микробной клеткой очень сложны, в большинстве случаев угнетение какой-то одной функции влечет за собой резкие изменения во многих других функциях, поэтому очень трудно обнаружить тот ключевой процесс, который нарушается первым и за которым следуют остальные. Сложность изучения вопросов механизма действия антибиотиков не позволила еще ни в одном случае выяснить его во всех деталях.

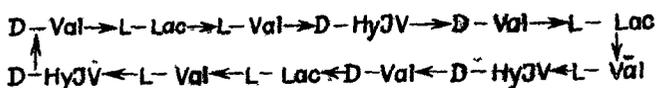
В этой небольшой книге, не посвященной специально изучению антибиотиков, мы не имеем возможности подробно излагать многочисленные данные, касающиеся влияния различных антибиотиков на разнообразные биохимические процессы, тем более что для понимания их влияния надо хорошо знать нормальное течение процессов, на которые действует тот или иной антибиотик. Поэтому для читателей, которые хотят более подробно ознакомиться с этими вопросами, мы попытаемся очень упрощенно рассказать о механизме действия некоторых антибиотиков на микробную клетку.

Рассмотрим вначале несколько подробнее данные о механизме антибактериального действия противотуберкулезного антибиотика циклосерина. Рядом опытов было установлено, что он специфически взаимодействует с ферментом, содержащим фосфопиридоксаль (производное витамина В₆), в частности он нарушает образование клеточной стенки бактерий, содержащей аминокислоту D-аланин. Поскольку этот оптический антипод аланина не имеет существенного значения для человека, циклосерин обладает достаточно избирательным антибактериальным действием и малой токсичностью. В последнее время работами главным образом советских ученых выяснены многие важные стороны взаимодействия циклосерина и близки к нему соединений с фосфопиридоксальевыми ферментами, в частности показано значение отдельных группировок в его молекуле. Посредством аминогруппы циклосерин связывается с коэнзимом пиридоксальевых ферментов, образуя реакционноспособное пиридоксалиденное производное. Такое производное получено, например, с ферментом аспарат-трансаминазой. Значение циклической группировки эфира гидроксамовой кислоты заключается в ее ацилирующих свойствах, благодаря чему связывание антибиотика с ферментом становится необратимым. На основе изучения структурных особенностей циклосерина, и процессов его взаимодействия с пиридоксальевыми ферментами был предложен метод получения специфических ингибиторов иных ферментов, участвующих в обмене не только аланина, но и других аминокислот.

По конечному результату — подавлению образования клеточной стенки бактерий — в известной мере сходны с циклосерином такие важные антибиотики, как пенициллины, в частности бензилпенициллин. Однако по сути дела механизм действия пенициллинов совершенно иной — они не взаимодействуют с фосфопиридоксальевыми ферментами. Конкретный химический механизм действия пенициллинов еще не известен, если не считать косвенных данных о том, что они взаимодействуют с каким-то соединением в цитоплазматической мембране бактериальных клеток за счет реакционноспособного β-лактамного цикла. Это неизвестное соединение (по-видимому, очень сложное) получило условное название «пенициллин-связывающий компонент». Поскольку подобного вещества не обнаружено в клетках животных (у которых отсутствует такого рода клеточная стенка), малая токсичность пенициллинов получает свое объяснение.

Несколько групп антибиотиков оказывают сильное влияние на мембраны микроорганизмов, сильно меняя их проницаемость. Так, противогрибковый тетраеновый антибиотик нистатин и сходные с ним по типу строения и действия полиеновые антибиотики (кандидины, кандидины и др.) взаимодействуют со стеринами клеточной мембраны, вызывая ее повреждение. Резко меняется проницаемость мембраны, вследствие чего клетка начинает терять неорганические ионы и низкомолекулярные метаболиты, что приводит к нарушению ряда процессов обмена в клетке — дыхания, гликолиза и т. д.

Очень избирательным действием на мембраны обладает антибиотик валиномицин, подробно изученный советскими учеными, которые выяснили его строение, осуществили синтез как самого антибиотика, так и ряда его аналогов и установили ряд существенных зависимостей между его строением и биологической активностью.



(Val — остаток валина, Lac — остаток молочной кислоты, HyJV — остаток изовалериановой кислоты).

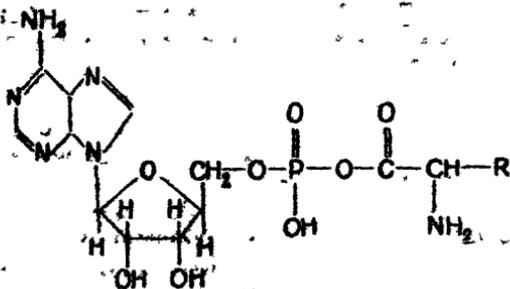
Валиномицин избирательно изменяет проникновение через мембрану иона калия, не влияя на транспорт других ионов (в том числе натрия). В присутствии валина скорость транспорта калия через мембрану возрастает в сотни раз.

Как уже упоминалось выше, механизм действия ряда антибиотиков связан с избирательным подавлением ими отдельных стадий биосинтеза белка. Чтобы рассказать о механизме действия таких веществ, необходимо хотя бы очень схематически напомнить современные представления о том, как протекает сам процесс образования белков.

Строение синтезируемого белка (т. е. последовательность входящих в его состав аминокислот) предопределяется строением соответствующей (содержащей несколько тысяч оснований) молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), где каждой аминокислоте соответствует определенная последовательность трех соседних нуклеиновых оснований. Иными словами эту основную мысль выражают, говоря, что строение белка закодировано в молекуле ДНК, являющейся основным носителем наследственной информации. При синтезе новой молекулы белка протекает несколько процессов. На молекуле ДНК хромосом, как на матрице, синтезируется особая, более короткая (содержащая несколько сотен оснований) молекула рибонуклеиновой кислоты (РНК), называемая информационной РНК (иногда говорят РНК-посредник или матричная РНК). В отличие от молекулы ДНК, представляющей со-

бой двойную спираль, информационная РНК является длинной одноцепочечной молекулой. Она поступает в особые глобулярные образования в клетке — рибосомы, состоящие из белков и рибонуклеиновых кислот.

Рибосомы состоят, как правило, из двух частиц — субъединиц, отличающихся по скоростям седиментации (sedimentum — латинское — оседание), их называют 30S- и 50S-субъединицами. Рибосомы являются своего рода конвейерами; на которых происходит «сборка белка» из соответствующих деталей — аминокислот. Однако в рибосомы должны поступать аминокислоты не как таковые, а предварительно подготовленные «к сборке». Прежде всего аминокислоты активируются, взаимодействуя с аденозинтрифосфатом и образуя аминокациладенилаты, общая формула которых приведена ниже.



Аминокациладенилаты далее присоединяются к особому типу рибонуклеиновых кислот, так называемым транспортным РНК. Это наиболее короткие нуклеиновые кислоты, содержащие около 80 оснований. Каждая транспортная РНК способна давать комплекс с аминокациладенилатом, содержащим определенную аминокислоту. Такие комплексы (т. е. транспортные РНК, «нагруженные» соответствующими аминокислотами) также поступают в рибосому (или систему из нескольких рибосом — полисому, в которой отдельные рибосомы временно соединяются посредством информационной РНК). Таким образом в рибосому (или, точнее, в полисому) поступают соответствующие «детали» (активированные аминокислоты) и «план» (информационная РНК), по которому надлежит их собирать. На 50S-компонентах рибосом имеются особые участки, на которых временно удерживаются различные транспортные нуклеиновые кислоты, содержащие определенные аминокислоты, вплоть до того момента, когда в соответствии с «планом» данную аминокислоту нужно встроить в создаваемую на рибосоме полипептидную цепь. Полипептидная цепь начинает строиться с аминокислоты, содержащей свободную аминогруппу; последующие аминокислоты присоединяются к карбоксильному концу полипептидной

цепи по одной. Когда сборка «запланированной» белковой молекулы закончена, полипептидная цепь соответствующим образом свертывается, принимая необходимую пространственную форму, — и белок готов.

Приведенная схема очень упрощенно излагает последовательность и характер стадий, многие из них опущены, но она позволяет показать, как же различные антибиотики могут нарушать этот четко работающий механизм.

Так, актиномицин подавляет образование информационной РНК на матрице ДНК — клетка не получает соответствующего «плана» и синтез белка не идет. Тетрациклины препятствуют присоединению транспортных РНК к соответствующему месту полисомы. Сходным образом действует хлорамфеникол — он избирательно действует на 50S-субъединицу рибосом, нарушая реакции, предшествующие построению на рибосоме полипептидной цепи. По-видимому, он ингибирует активность участвующих в этом процессе энзиматических систем (пептидилтрансфераз).

Макролидный антибиотик эритромицин действует, вероятно, очень сходно с хлорамфениколом, но он связывается с 50S-субъединицей рибосомы значительно прочнее (он может вытеснить хлорамфеникол). Стрептомицин (и, по-видимому, некоторые иные антибиотики) присоединяется к рибосоме и нарушает процесс «считывания» информации с молекулы информационной РНК; при этом возникают систематические ошибки и вместо одних (нужных) аминокислот начинают включаться другие аминокислоты; получаются белки с совершенно иными свойствами и микроорганизм оказывается нежизнеспособным. Пурамици (антибиотики, содержащий остаток 6-диметиламинопурина и обладающий антибактериальным и некоторым противоопухолевым действием) специфически подавляет саму стадию «сборки» аминокислот, стадию образования пептидов. Он отрывает от рибосом незаконченные пептидные цепи, вытесняя концевые транспортные РНК.

Конечно, эти представления о механизме нарушения различными антибиотиками той или иной стадии биосинтеза белка еще недостаточно конкретизированы, а в некоторых случаях даже не строго доказаны, но они очень четко показывают, насколько сильными и специфическими биорегуляторами являются антибиотики. Их использование в качестве инструментов для регулирования и изучения отдельных стадий образования белка уже оказало и оказывает неоценимую услугу при изучении этих важных и сложных процессов.

При оценке влияния того или иного антибиотика на различные биологические процессы нужно, конечно, очень тщательно учитывать целый ряд дополнительных условий. В ряде случаев тот или иной антибиотик не может проникнуть в соответствующую клетку, в достаточной концентрации или в ней

быстро инактивируется. Этим в значительной мере объясняется, почему антибиотики по сути дела с очень сходным механизмом действия (например, хлорамфеникол и эритромицин) обладают совершенно различной активностью в отношении некоторых микроорганизмов. Так, хлорамфеникол очень сильно подавляет грамотрицательные бактерии, а эритромицин совершенно не действует на них. Этим, а возможно и рядом иных причин, объясняется столь существенная с практической точки зрения относительно низкая токсичность антибиотиков для человека, хотя в ряде случаев, как видно из вышеприведенного краткого разбора, они подавляют процессы, очень важные не только для микроорганизмов, но и для людей. Именно вследствие своей высокой избирательности эти очень активные вещества оказываются нашими союзниками в борьбе с таким опасным врагом, как болезнетворные микробы.

Попытка ответить богдыхану (вместо заключения)

И богдыхан, оглядев толпу и увидав, что все в порядке, сказал:

— В никогда не прекращающихся заботах о благе наших детей-китайцев, решили мы выяснить вопрос: зачем это на свете существуют науки? Давно уже они существуют, и вот хотим мы узнать, для чего? А потому отвечайте нам прямо и откровенно, без утайки и безо всякой хитрости: зачем науки и какой от них толк? Начнем хоть с тебя!

В. Д. Дорошевич.
О пользе наук

В лукавой китайской сказке Дорошевича, из которой взят эпитафия, ни одному ученому, как известно, не удалось угодить богдыхану Цзан-Ли-О. Он безапелляционно решил, что все науки либо бесполезны, либо вредны. К сожалению, подобные «богдыханы» изредка встречаются не только в сказках. С ними спорить бесполезно, но ведь вопрос о пользе той или иной науки нередко ставят не только злобные враги прогресса, но и лица, по-настоящему интересующиеся успехами науки и желающие понять, что же следует из ее достижений. Поэтому попытаемся ответить на такой вопрос, попробуем рассказать о том, что же дало человечеству и что может дать в будущем изучение химических регуляторов биологических процессов.

Начнем, естественно, с подведения кратких итогов. Можно напомнить, что изучение, например, витаминов и гормонов позволило выяснить причины ряда тяжелых недугов, в течение многих веков поражавших человечество. Дальнейшее изучение этих веществ, а затем и антибиотиков позволило найти действенные средства предупреждения и лечения многих опасных заболеваний человека, животных, растений.

В нашей небольшой книге мы не имеем, к сожалению, возможности останавливаться на регуляторах развития растений, но можно упомянуть, что в настоящее время найден ряд химических соединений (как встречающихся в природе, так и полученных путем синтеза), которые в малых дозах сильно ускоряют или замедляют развитие растения в целом или его отдельных частей.

Так, гетероауксин (β-индолилуксусная кислота), α-нафтилмасляная кислота и другие ростовые вещества способны сти-

мулировать рост корней, что позволяет, например, пересаживать большие деревья и размножать черенкованием такие растения, которые без специальных стимуляторов не закореняются. Выделение и изучение гиббереллинов позволило использовать эти соединения, обнаруженные вначале как фитопатогенный фактор, для повышения урожая винограда (при этом особенно приятно, что значительно увеличивается процент ягод без косточек).

Столь же большое значение приобретают биорегуляторы, влияющие на отдельные функции сельскохозяйственных животных и на их общее развитие. Помимо гормональных препаратов, витаминов и антибиотиков, которые были подробно рассмотрены выше, можно указать на ряд соединений, позволяющих усиливать образование белков или жиров, ускорять развитие домашней птицы, предохранять животных от нападения насекомых и т. д.

Все более широкое применение в промышленности, перерабатывающей природное сырье, находят ферментные препараты. Их успешно используют, например, в хлебопечении и виноделии, при осветлении фруктовых соков и для улучшения качества мяса, для эффективного обезволаживания шкур в кожевенном производстве вместо применения едких веществ, снижающих качество кожи. Ферментные препараты могут резко ускорять обработку тканей, фотопленки и других материалов, специфически разрушая связующие вещества. Прибавление в корма животным наряду с небольшими количествами витаминов и антибиотиков еще и некоторых ферментов (например, целлюлаз, способных разлагать грубые составные части кормов) позволяет значительно ускорить откорм скота и резко сократить расход кормов. Этот список можно продолжать очень долго, так как буквально каждый день обнаруживаются все новые и новые области практического использования ферментных препаратов.

Из приведенного беглого обзора можно видеть, что в настоящее время целенаправленное научно обоснованное использование биорегуляторов уже имеет очень большое значение в медицине, сельском хозяйстве, промышленности.

Однако при более критическом рассмотрении вопроса становится ясным, как еще много предстоит сделать и какие важные задачи стоят перед учеными, занимающимися изысканием и изучением биорегуляторов.

Хотя число хорошо изученных биорегуляторов очень велико, нет сомнения в том, что существует еще много биорегуляторов, о которых мы знаем крайне мало или лишь догадываемся об их существовании. Это относится, в частности, к малоизученным гормонам и гормоноподобным соединениям, регулирующим течение различных процессов в организме человека, животных и в особенности растений. Несомненно, су-

существует еще много неизученных ферментов, способных катализировать очень тонкие превращения веществ в живых организмах. Открытие и изучение таких биорегуляторов является одной из актуальных задач будущего.

Мы кратко рассказали в книге о некоторых синтетических и природных соединениях, способных избирательно поражать таких опасных врагов человека, как многие патогенные бактерии, риккетсии, грибы, дрожжи. Однако мы до сего времени не имеем достаточно эффективных средств, способных избирательно подавлять вирусы или злокачественные опухоли; в этом направлении достигнуты лишь самые первые успехи. Нахождение или создание подобных веществ имело бы громадное значение для человечества. Для успешного изыскания таких высокоспециализированных препаратов, вероятно, недостаточно того, в значительной мере эмпирического, пути, по которому в основном велось изыскание лекарственных веществ до последнего времени. Несомненно, очень заманчивым является научно обоснованный направленный синтез веществ с заранее предугаданными свойствами.

Можно себе представить, что подобно тому, как во многих случаях до синтетического получения неизвестного соединения мы уже можем достаточно точно предсказать его многие физические и химические свойства, можно будет разработать теоретические предпосылки, позволяющие заранее определять и биологические свойства новых веществ. Однако пока в этом направлении сделаны лишь первые шаги. Для решения подобной задачи особенно важны исследования по глубокому изучению механизма действия различных биорегуляторов. Уже сейчас в некоторых случаях на основе имеющихся сведений удается создавать вещества с высокой биологической активностью. Так, например, изучение механизма действия фосфорорганических инсектицидов, вскрытие первых четких закономерностей их взаимодействия с ферментами, участвующими в обмене холина (холинэстеразы и др.), уже позволило начать направленное создание более эффективных препаратов.

Как подчеркнуто в главе 2, чрезвычайно важным представляется глубокое изучение строения и механизма действия ферментов. Когда будут глубоко изучены особенности строения этих биорегуляторов, позволяющие им легко осуществлять те процессы, которые в технике проводятся в очень жестких условиях, мы сможем внести серьезные изменения во многие отрасли промышленности. Можно напомнить, например, что необходимые для интенсивного развития растениеводства азотные удобрения получают сейчас в промышленности из азота воздуха при температурах в сотни градусов и давлении в сотни атмосфер.

В то же время у бактерий рода *Azotobacter* существуют

ферментные системы, позволяющие проводить процессы связывания атмосферного азота в условиях клетки, т. е. при низкой температуре и обычном давлении. Создание промышленных катализаторов, подобных имеющимся в клетках азотфиксирующих бактерий, позволило бы коренным образом перестроить производство азотных удобрений, что повлекло бы за собой изменения во всем народном хозяйстве. Наконец, изучение биорегуляторов уже позволило в некоторых случаях понять сущность самых интимных процессов жизнедеятельности, причем использование этих соединений в качестве тонких инструментов регулирования таких процессов способствовало и будет способствовать прогрессу наших знаний в этой трудной области.

Исследования по биорегуляторам входят важной составной частью в создающуюся в наши дни общую картину физико-химических основ жизни. В ряде мест книги мы пытались показать обнаруженные в последнее время взаимосвязи таких веществ, которые еще сравнительно недавно казались мало чем связанными между собой. Сейчас мы уже знаем, что многие витамины важны тем, что они обеспечивают активность ферментов (либо входя в их состав, либо участвуя в соответствующих превращениях). С другой стороны, выяснилась роль многих гормонов, которые также оказались имеющими прямое отношение к функционированию ферментов, играя роль «аллостерических» регуляторов их образования или действия. В общую картину химической регуляции биологических процессов удачно вписываются и многие антибиотики, способные избирательно нарушать активность важных ферментативных реакций. Это позволяет глубже и глубже проникать в сущность тех тонких взаимосвязанных превращений веществ, которые лежат в основе самого явления жизни.

Все сказанное убеждает авторов этой книги (а они верят, что читатели также разделяют это убеждение) в том, что изучение биорегуляторов является очень увлекательным и, несомненно, полезным делом. Мы надеемся, что многие молодые читатели, прочтя эту книгу, заинтересуются затронутыми в ней проблемами и обратятся к более специальной литературе, а может быть, даже решат посвятить себя развитию этой области науки. Нужно лишь с самого начала предостеречь их, что, хотя перспективы у нашей области науки очень широкие и интересные, легких успехов в ней ждать нельзя. В этом разделе науки, как и во многих других, помимо увлечения и фантазии нужно много и упорно трудиться.

Если книга заинтересовала читателей и вызвала хотя бы у некоторых из них желание более серьезно заняться изучением биорегуляторов, авторы будут счастливы,

Литература

А. ПОПУЛЯРНАЯ ЛИТЕРАТУРА О БИОРЕГУЛЯТОРАХ, НЕ РАССМОТРЕННЫХ В ДАННОЙ КНИГЕ

Чайлахян М. Х. ПОВЕСТЬ О ГИББЕРЕЛЛИНАХ РАСТЕНИЙ. М., «Знание», 1963.

В небольшой популярной брошюре автор рассказывает о гиббереллинах и других фитогормонах.

Чайлахян М. Х. ФАКТОРЫ ГЕНЕРАТИВНОГО РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ, М., «Наука», 1964.

Доклад, прочитанный на Тимирязевском чтении, посвящен гормональным факторам развития растений.

Киршенблат Я. Д. ТЕЛЕРГОНЫ — ХИМИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ВОЗДЕЙСТВИЯ ЖИВОТНЫХ. М., «Наука», 1968.

Популярная брошюра, в которой изложены материалы о телергонах — веществах, регулирующих взаимоотношения между животными (половые аттрактанты, отпугивающие вещества, токсины и т. д.).

Вольфович С. И., Биленкин Д. А. ХИМИЯ СОЗДАЕТ КОНТИНЕНТЫ. (Химия и урожай), М., «Советская Россия», 1963.

Популярная книга о химизации сельского хозяйства. Отдельные главы посвящены регуляторам растений (гиббереллины, гербициды, фунгициды и т. д.).

Б. МОНОГРАФИИ, ПОДРОБНО ОПИСЫВАЮЩИЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, О КОТОРЫХ КРАТКО РАССКАЗАНО В ДАННОЙ КНИГЕ

Берзин Т. БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ. М., «Мир», 1964.

Сравнительно небольшая (400 стр.) монография, посвященная в основном биологическому изучению гормонов. Химические данные в значительной мере устарели.

Березовский В. М. ХИМИЯ ВИТАМИНОВ. М., Пищепромиздат, 1959.

Подробная монография (599 стр.) по химии витаминов. Содержит краткие сведения по биологическому их изучению.

Диксон М., Уэбб Э. ФЕРМЕНТЫ. М., «Мир», 1966.

Подробная монография (816 стр.), посвященная в основном биологическим вопросам.

ХИМИЯ АНТИБИОТИКОВ Третье издание, т. I, М.,
Изд-во АН СССР, 1961.

Подробная монография (1550 стр), но частично устаревшая.

**Сазыкин Ю. О. АНТИБИОТИКИ КАК ИНГИБИТОРЫ
БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ** М., «Наука», 1968.

Монография, специально посвященная изучению биохимического механизма действия антибиотиков.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ, АНА-
ЛИЗА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ.** Под
редакцией **Г. В. Самсонова** М.—Л., «Наука», 1966.

Сборник статей, посвященный критическому рассмотрению ряда методов разделения и очистки природных высокомолекулярных веществ.

Содержание

	Стр.
МЕЖДУ СЦИЛЛОЙ И ХАРИБДОЙ (вместо предисловия)	3
ВВЕДЕНИЕ (многообразие и взаимосвязь биорегуляторов)	10
Глава 1	
ТРУДНЕЙ, ЧЕМ ДОБЫЧА РАДИЯ (очистка биологических регуляторов)	14
Глава 2	
САМЫЕ СОВЕРШЕННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ (Ферменты)	31
Специфичность действия ферментов	34
Строение ферментов	39
Как работают ферменты?	50
Глава 3	
НЕЗАМЕНИМЫЕ ДОБАВКИ В ПИЩЕ (витамины)	58
Витамин А	59
Витамин В ₁	60
Витамин В ₂ (рибофлавин)	63
Витамин РР (никотинамид)	66
Витамин В ₆	67
Витамин В ₁₂	70
Витамин С (аскорбиновая кислота)	72
Витамины группы D	74
Пантотеновая кислота (витамин В ₃)	75
Витамины группы фолевой кислоты	77
Биотин	79
Другие витамины	80
Глава 4	
ФАКТОРЫ САМОРЕГУЛИРОВАНИЯ ОРГАНИЗМА (гормоны)	81
Половые гормоны	82
Женские половые гормоны	84
Мужские половые гормоны	85
Гормоны коры надпочечников (кортикостероиды)	87
Другие гормоны надпочечников (гормоноиды)	90
Гормоны щитовидной железы (тироксин и близкие вещества)	92
Гормоны поджелудочной железы (инсулин и глюкагон)	94
Пептидно-белковые гормоны гипофиза	96
Адренокортикотропный гормон	100
Гормон роста	101
Гонадотропные гормоны	102
Гормоны желудочно-кишечного тракта (секретин и гастрин)	103
	146

Глава 5

ВРАГИ НАШИХ ВРАГОВ (природные и синтетические противомикробные средства)	106
Синтетические антимикробные препараты	107
Антибиотики	110
Пенициллины	110
Стрептомицин	115
Циклосерин	117
Хлорамфеникол (левомицетин)	118
Тетрациклины	122
Противогрибковые (антифунгальные) антибиотики	123
Противораковые антибиотики	125
Немедиацисное применение антибиотиков	128
Антибиотики как регуляторы биологических процессов (механизм действия антибиотиков)	129
Попытка ответить богдыхану (вместо заключения)	135
Литература	139

АЛЕКСАНДР СТЕПАНОВИЧ ХОХЛОВ
ЮРИИ АНАТОЛЬЕВИЧ ОВЧИННИКОВ

ХИМИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Редактор *И. М. Тужилина*
Худож. редактор *Е. Е. Соколов*
Техн. редактор *Е. М. Лопухова*
Корректор *Е. Э. Ковалевская*
Художник *А. П. Кузнецов*

Т 01088. Сдано в набор 25.XI 1968 г. Подписано к печати 10.II 1969 г. Формат бум. 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 3. Бум. л. 4,5. Печ. л. 9,0. Уч.-изд. л. 7,94. Тираж 54 000 экз. Издательство «Знание». Москва, Центр, Новая пл., д. 3/4, Заказ 3394. Типография изд-ва «Знание». Москва, Центр, Новая пл., д. 3/4.
Цена 27 коп.

ДОРОГОЙ ТОВАРИЩ!

Число подписчиков научно-популярной серии «Биология» постоянно растет. И естественно, что редакцию интересует вопрос: кто он, наш новый подписчик, какие проблемы биологии его волнуют, какие темы он считает наиболее актуальными и полагает необходимым включить в план изданий серии на ближайшие годы. Поэтому мы предлагаем Вам несколько вопросов, ответы на которые, как мы надеемся, будут способствовать улучшению качества выпускаемых брошюр.

Ваш возраст _____

Образование _____

Профессия и специальность _____

Где живете (город, сельская местность) _____

С какой целью Вы выписываете брошюры (используете ли их в своей практической работе)

Удовлетворяет ли Вас качество и оперативность информации в брошюрах _____

Что не удовлетворяет Вас в наших брошюрах (содержание, стиль изложения, художественное оформление и т. д.) и что конкретно Вы предлагаете сделать для их улучшения _____

Темы, которые Вы считаете необходимым включить в перспективный план серии «Биология»

Благодарим Вас за ответы. Наш адрес: Москва, Центр, Новая площадь, д. 3/4, изд-во «Знание». Редакция естественнонаучной литературы, серия «Биология».