



Peter W. Hochachka  
George N. Somero

---

# Biochemical Adaptation

Princeton University Press  
Princeton, New Jersey

*П. Хочачка, Дж. Сомеро*

# *Биохимическая адаптация*

Перевод с английского  
канд. мед. наук **Н. Н. Алипова,**  
**Е. П. Крюковой,**  
канд. биол. наук **Н. П. Матвеевой**

под редакцией  
чл.-корр. АМН СССР **И. Б. Збарского**



*Издательство „Мир“*

ББК 28.07

X87

УДК 577.1

Хочачка П., Сомеро Дж.

X87 Биохимическая адаптация: Пер. с англ. — М.: Мир, 1988. — 568 с., ил.

ISBN 5-03-001239-7

В книге авторов из США описаны биохимические механизмы адаптации к различным (в том числе экстремальным) условиям существования. Особое внимание уделено адаптации к физической нагрузке, высокой температуре, холоду, недостаточности кислорода. Авторы уже известны советскому читателю по ранее вышедшей книге «Стратегия биохимической адаптации» (М.: Мир, 1977).

Для биохимиков и физиологов, а также специалистов-медиков, занимающихся спортивной медициной и изучением стрессовых воздействий на организм.

X  $\frac{2007020000-488}{041(01)-88}$  151—88, ч. 1

ББК 28.07

*Редакция литературы по биологии*

ISBN 5-03-001239-7 (русск.)

ISBN 0-691-08344-4 (англ.)

© 1984 by Princeton University Press

© перевод на русский язык, «Мир», 1988



# Предисловие редактора перевода

Монография известных исследователей Питера Хочачки и Джорджа Сомеро представляет собой увлекательное повествование, касающееся интереснейшей проблемы биохимической адаптации, т. е. биохимических и молекулярных механизмов приспособления различных животных к разнообразным, нередко экстремальным, условиям среды.

При однотипном, по существу, характере биополимеров, биохимических структур и процессов обмена веществ у всех представителей животного и растительного мира и даже у микробов живые организмы существуют в очень широких пределах температуры, давления, содержания влаги и кислорода и солевого состава среды обитания. Жизнь имеется в море и пресных водах, на суше и на больших глубинах, при низких температурах и в тропиках, в области горячих ключей при температуре кипения, в засушливых пустынях и при обилии влаги.

Существование жизни в столь разнообразных условиях возможно лишь благодаря приспособлению к ним организмов и их сообществ.

В двенадцати главах книги читатель найдет отлично систематизированный и включающий новейшие данные материал, посвященный механизмам и стратегиям биохимической адаптации. По существу, этот аспект сравнительной биохимии можно было бы назвать биохимической экологией.

В первых трех главах рассмотрены общие подходы и закономерности. Авторы показывают, что биохимическая адаптация направлена:

- 1) на сохранение целостности и функциональной активности макромолекул (нуклеиновых кислот, ферментов, структурных и kontrakтильных белков) и надмолекулярных комплексов (хроматина, рибосом, мембран);

- 2) на обеспечение организма источниками энергии и питательными веществами, используемыми для биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, составляющих ткани организма и являющихся запасами питательного материала;

- 3) на поддержание регуляторных механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от непостоянных условий среды.

В остальных девяти главах приведены многочисленные примеры биохимических приспособлений, рассмотрены различные, часто хитроумные, механизмы выживания и существования в необычных условиях среды.

В 1977 г. в русском переводе вышла книга этих же авторов «Стратегия биохимической адаптации». Настоящая монография является по существу новой книгой и лишь отчасти — главным образом идеологически — может рассматриваться как новое издание прежней. Однако к ней полностью применима та характеристика, которую в своем предисловии к книге 1977 г. дал покойный академик Е. М. Крепс: «Высоким достоинством предлагаемой книги является то, что читатель узнает множество биологических фактов, частью совершенно новых, частью известных давно, но остававшихся без рационального физико-химического объяснения. Все эти сообщаемые биологические факты получают в книге рациональное, ясное и поражающее своей кажущейся простотой биохимическое объяснение, базирующееся на новейших достижениях этой науки». Отметим, что выпуск настоящей книги также связан с именем Евгения Михайловича Крепса, который высоко оценил английский оригинал и рекомендовал его издание на русском языке.

Учитывая огромное разнообразие климатических условий в нашей стране, «Биохимическая адаптация» представит особый интерес для советского читателя. Книга будет полезна, интересна и доступна не только специалистам — биохимикам и физиологам, но и широкому кругу биологов и врачей.

Работа по переводу распределялась следующим образом: Н. Н. Алипов — главы 4, 11, 12; Е. П. Крюкова — главы 6, 7, 8; Н. П. Матвеева — главы 1, 2, 3, 5, 9, 10.

*И. Б. Збарский*

# Предисловие

Одним из крупнейших достижений биохимии и молекулярной биологии явилось открытие ряда общих принципов и механизмов, лежащих в основе всех проявлений жизни. Механизмы преобразования энергии, катализа, кодирования и обработки генетической информации свидетельствуют о единстве жизни на молекулярном уровне. Но, несмотря на все успехи редуccionистского подхода в биологии, он сравнительно мало что дал для решения одного важнейшего вопроса, интересующего многих биологов: как объяснить появление колоссального разнообразия живых организмов? Каковы основные пути адаптивного видоизменения фундаментальных биохимических структур и функций — того процесса, который позволил организмам освоить всевозможные экологические ниши и породил столь непохожие друг на друга формы жизни?

Вопрос о том, как возникают новые свойства и как единообразие в процессе своего развития порождает разнообразие, не нов. Еще несколько десятков лет назад сравнительную анатомию и физиологию разделяла пропасть. Своего рода мостиком через нее явилась концепция адаптации. Мы убеждены, что, распространив эту концепцию на молекулярный уровень, можно перейти от фактов, доказывающих единство молекулярных механизмов, к пониманию природы почти беспредельного разнообразия жизни. Наше внимание в этой книге будет сосредоточено именно на том, как в процессе видоизменения универсальных молекулярных структур возникли формы жизни, успешно заселившие столь разнообразные местообитания, как полярные области, пустыни и морские глубины; как шло формирование организмов, столь резко различающихся между собой характером питания и потребностью в кислороде.

При обсуждении основных стратегий адаптации на биохимическом уровне мы будем обращаться к анализу ограниченного числа биохимических процессов, используя их в качестве наглядных иллюстраций. Не претендуя на энциклопедичность изложения, мы сконцентрируем свое внимание только на тех объектах, которые, как нам кажется, представят наибольший интерес для читателя — они либо уже достаточно изучены, чтобы возможен был их детальный анализ, либо настолько интересны сами по себе, что к ним стоило бы привлечь внимание читателя. Мы надеемся при этом, что чтение нашей книги послужит стимулом к исследованию других, менее изученных проблем биохимической адаптации.

Мы признательны всем, чьи усилия способствовали созданию

этой книги, и пользуемся случаем выразить им свою признательность. Прежде всего должны быть упомянуты студенты и аспиранты, которые поддерживали наш энтузиазм на протяжении всей работы над книгой. Один из авторов, П. Хочачка, с особенной теплотой благодарит тех, кто непосредственно участвовал в проведении научных исследований в его лаборатории: H. Abe, J. Ballantyne, M. A. Castellini, G. P. Dobson, J. F. Dunn, B. Emmett, R. Foreman, C. J. French, U. Hoeger, T. P. Mommsen, B. J. Murphy, W. Parkhouse, E. A. Shoubridge, R. Suarez, а также бывших студентов, которые продолжают оказывать влияние на работу лаборатории: J. Baldwin, H. Behrisch, J. H. A. Fields, H. Guderley, M. Guppy, T. P. Moon, T. Mustafa, T. Owen, J. Storey, K. B. Storey. П. Хочачка благодарит своих многочисленных коллег, разбросанных по всему земному шару, деятельность которых сделала труд авторов столь увлекательным; в жизни этих людей интеллектуальные «приключения» подчас сочетаются с реальными приключениями в научных экспедициях.

Второй автор, Дж. Сомеро, выражает свою признательность бывшим и нынешним сотрудникам Лаборатории высоких давлений Скриппсовского океанографического института: L. Borowitzka, R. D. Bowlus, M. A. Castellini, B. J. Davis, K. A. Dickson, V. Donahue, J. G. Duman, H. Felbeck, S. L. French, E. Golanty, J. E. Graves, G. S. Greaney, S. C. Hand, K. H. Hoffmann, D. Kramer, G. Lopez, P. S. Low, M. S. Lowery, J. Malpica, E. Pfeiler, M. A. Powell, S. J. Roberts, J. F. Siebenaller, K. M. Sullivan, R. R. Swezey, P. J. Walsh, P. H. Yancey, M. Yacoe. Неоценим вклад J. J. Childress, M. E. Clark и F. N. White, постоянно участвовавших в обсуждении многих вопросов, рассмотренных в этой книге.

Ни эта книга, ни большая часть исследований, представленных в ней, не были бы завершены без поддержки NSERC, Канадского кардиологического фонда, Национального научного фонда США и Национальных институтов здоровья США. П. Хочачка особо благодарит Министерство науки и техники Австралии, оказавшее финансовую поддержку данной работе.

В заключение мы хотели бы подчеркнуть, что высказать ряд интересных идей много легче, чем подготовить книгу. Авторы несут полную ответственность за подготовку текста и рисунков, но они не сумели бы справиться с этой задачей, если бы не огромная помощь Leslie Borleski, Kathy Lingo и Cecelia Ross. И наконец, авторы благодарят за моральную поддержку всех членов семейного клана Laika.

П. Хочачка

*Ванкувер, Британская Колумбия*

Дж. Сомеро

*Ла Джолла, Калифорния*

# Биохимическая адаптация: основные механизмы и стратегии

## Парадигма адаптации

При обсуждении наиболее фундаментальных проблем того или иного раздела современной науки ученые обращаются к понятным схемам и моделям большой общности. Такие «парадигмы» представляют собой устойчивые концептуальные схемы, в рамках которых формулируются и анализируются все или почти все частные проблемы данной научной дисциплины (Kuhn, 1970). В последующих главах мы рассмотрим различные аспекты одной из наиболее общих и емких парадигм биологии, без которой не обойтись при обсуждении любого уровня биологической организации — от молекулярного до популяционного. Это представление об «адаптации», о способности организма видоизменяться в направлении, увеличивающем его шансы на выживание и размножение в данных условиях среды.

Тема адаптации — одна из центральных в биологии, хотя и не всегда она обсуждается в явном виде. Изучение биологии часто начинают с обзора огромного морфологического разнообразия организмов, населяющих биосферу. Изучая рыб, например, мы встречаем всевозможные формы, из которых одни приспособлены к быстрому плаванию и охоте за весьма подвижной жертвой, а другие как бы «сконструированы» в расчете на минимальную двигательную активность; многие глубоководные рыбы предпочитают оставаться неподвижными и поджидать свою жертву. На больших глубинах некоторые рыбы снабжены специальными приспособлениями для привлечения жертвы. Анатомические особенности других рыб позволяют им в зависимости от окружающих условий дышать как в водной, так и в воздушной среде. В литературе по вопросам адаптации чаще всего обсуждаются именно такие высокоспециализированные приспособления на физиологическом, морфологическом, поведенческом и экологическом уровнях.

В отличие от этого мы в своем подходе к проблемам адаптации сосредоточим внимание на биохимических механизмах, которые определяют качественное и количественное своеобразие метаболических функций, ход процессов газообмена, постоян-

ство внутриклеточной среды (рН, осмотического давления), необходимое для функциональной активности макромолекул, и использование доступных источников энергии. Эти виды биохимической адаптации можно рассматривать как «интериоризованные» механизмы, отличая от других, более привычных для нас форм биохимической адаптации, которые определяют специфику взаимодействия организма с окружающей средой. Такие «экстериоризованные» формы биохимической адаптации включают процессы, определяющие защитную окраску, способность к биолюминесценции, выработку разного рода химических сигналов, химических средств защиты и нападения. Сюда же можно отнести случаи молекулярной мимикрии — образование у паразита антигенов, неотличимых от антигенов хозяина. Экстериоризованные формы биохимической адаптации формально аналогичны упомянутым выше столь заметным морфологическим, поведенческим и другим адаптивным признакам. В отличие от этого интериоризованные адаптации, которые будут в центре нашего внимания, обычно могут быть обнаружены лишь после «биохимической препаровки» организма. Мы будем постоянно подчеркивать, что успешная адаптация ферментных систем, мембран, дыхательных пигментов и т. п. к тем или иным условиям среды еще не говорит об идентичности или хотя бы сходстве этих биохимических систем у различных организмов. Такое представление было бы ошибочным: конкретные варианты интериоризованных биохимических адаптаций не менее разнообразны, чем внешние адаптивные признаки.

Для того чтобы выявить особенности этого разнообразия и его роль в улучшении адаптации организмов к специфическим условиям, нужно рассмотреть сначала те биохимические структуры и функции, которые абсолютно необходимы для всех живых систем и в то же время весьма чувствительны к изменениям физических или химических особенностей среды. Эти адаптации, которые будут рассмотрены в последующих главах, выполняют в клетке следующие основные функции:

1. Поддержание структурной целостности макромолекул (ферментов, сократительных белков, нуклеиновых кислот и др.) при их функционировании в специфических условиях.
2. Достаточное снабжение клетки а) «энергетической валютой» — аденозинтрифосфатом (АТФ), б) восстановительными эквивалентами, необходимыми для протекания процессов биосинтеза, и в) предшественниками, используемыми при синтезе запасных веществ (гликогена, жиров и т. п.), нуклеиновых кислот и белков.
3. Поддержание систем, регулирующих скорости и направления метаболических процессов в соответствии с потребностями организма и их изменениями при изменении условий среды.

Эти фундаментальные функции необходимы всем живым системам, в каких бы условиях они ни находились. Каким же образом решаются эти задачи столь непохожими друг на друга организмами, живущими в совершенно разных условиях? Найти ответ на этот вопрос — значит понять само существо процессов биохимической адаптации, что мы и постараемся сделать в последующих главах.

### Гомеостаз и адаптация

Концепция гомеостаза, зачатки которой можно обнаружить еще в работах Клода Бернара, т. е. более ста лет назад, получила в начале нашего века последовательное развитие в теории У. Б. Кэннона (W. B. Cannon), согласно которой организмы способны поддерживать постоянство своей внутренней среды, несмотря на изменения окружающих условий. Очевидно, что конечный результат многих из упомянутых выше стратегий адаптации состоит именно в поддержании гомеостаза. В переводе на язык биохимии это означает, что скорости и направления биохимических реакций подвержены адаптивному регулированию. Для поддержания уровня глюкозы, например, необходима регуляция глюконеогенеза и гликолиза — противоположно направленных путей обмена.

### Энантиостаз и адаптация

Хотя явления гомеостаза весьма обычны у многих организмов, очевидно, что существуют и иные стратегии адаптации, не приводящие к постоянству и даже не направленные на его поддержание. Например, фосфолипидный состав биомембран у организмов, приспособленных к холоду или к теплу, различен; электролитный состав жидкостей тела у эвригалинных беспозвоночных прямо зависит от условий внешней среды, а рН крови и внутриклеточной жидкости нередко зависит от температуры тела. Высказана мысль (Mangum, Towle, 1977), что во многих случаях поддерживается не состояние определенных структур, а их функция. Вязкость (текучесть) биомембран хотя и изменяется с температурой, но таким образом, чтобы могли нормально функционировать мембраносвязанные ферменты, транспортные системы и гормоны; концентрации растворенных веществ регулируются в расчете на поддержание структуры и функции ферментов и регуляции их активности; рН крови изменяется так, чтобы при изменении температуры не нарушались функции ее белков. Результат адаптации во всех таких случаях — не гомеостаз (постоянство состояния), а скорее «энантиостаз» (поддержание функции) (Mangum, Towle, 1977).

## Фундаментальные механизмы биохимической адаптации

Рассмотрение адаптации на биохимическом уровне мы начнем с анализа небольшого числа фундаментальных механизмов. Следует сразу же подчеркнуть, что эти механизмы — а мы будем снова и снова обращаться к ним на протяжении всей книги — не всегда легко отграничить друг от друга; в ряде случаев может быть трудно разобраться в том, какой именно из фундаментальных механизмов обуславливает данную реакцию на изменение окружающей среды. Нам кажется, однако, что с эвристической точки зрения полезно будет ознакомить читателя со «скелетом» последующих глав и вместе с тем показать, что «кости» этого скелета не разрознены, а образуют связное целое.

В своем анализе процессов биохимической адаптации мы будем часто иметь дело со следующими тремя типами адаптивных механизмов или «стратегий»:

1. *Приспособление макромолекулярных компонентов клеток или жидкостей организма.* Можно выделить два вида такого приспособления: 1) изменяются количества (концентрации) уже имеющихся типов макромолекул, например ферментов; 2) образуются макромолекулы новых типов, например новые изоэзимы<sup>1</sup> или аллоэзимы, которыми замещаются макромолекулы, ранее имевшиеся в клетке, но ставшие не вполне пригодными для работы в изменившихся условиях. Ради простоты эти две стратегии адаптации можно называть соответственно «количественной» и «качественной» стратегиями.
2. *Приспособление микросреды, в которой функционируют макромолекулы.* Сущность этого механизма состоит в том, что адаптивное изменение структурных и функциональных свойств

---

<sup>1</sup> Термины «изоэзим» и «аллоэзим» будут часто встречаться на страницах этой книги, поэтому читателю необходимо ясно понимать их смысл. *Изоэзимы* (изоферменты) — общее название различных вариантов данного фермента. По генетической природе изоэзимы подразделяются на две группы. Для первой из них характерно, что данному ферменту (или его субъединице) в геноме организма соответствует два или больше генных локусов. Строго говоря, для обозначения этих вариантов следовало бы употребить выражение «полилокусные изоэзимы», но мы в дальнейшем будем их называть просто изоэзимами. Вторую группу составляют так называемые аллельные варианты, которые могут встречаться у диплоидных организмов в случае полиморфизма по локусу, кодирующему данный фермент (или субъединицу). Изоэзимы второго типа обычно называют «аллоэзимами».

С помощью этих терминов можно адекватно описывать различные варианты фермента у одного вида организмов, однако для сравнения ферментов разных видов необходимо ввести несколько новых терминов. В дальнейшем мы будем говорить о «межвидовой гомологии», если один и тот же фермент встречается у представителей разных видов; при этом «тот же», как правило, следует понимать в том смысле, что данный фермент кодируется генным локусом, общим для сравниваемых видов. Например, гликолитический фермент лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27, NAD : лактат-оксидоредуктаза) у позво-



макромолекул достигается путем видоизменения качественного или количественного состава окружающей их среды (например, ее осмотической концентрации или состава растворенных веществ). Этот механизм, как мы увидим, имеет исключительно большое значение и дополняет макромолекулярную адаптацию.

3. *Приспособление на функциональном уровне, когда изменение эффективности макромолекулярных систем, в особенности ферментов, не связано с изменением числа имеющихся в клетке макромолекул или их типов.* Адаптацию в этом случае обеспечивает изменение в использовании уже существующих макромолекулярных систем — в соответствии с текущими локальными потребностями в той или иной метаболической активности. Таким образом, из этих адаптаций складывается важное явление *метаболической регуляции* — надлежащее увеличение или уменьшение активности ферментов в связи с такими процессами, как локомоция, рост, переход к анаэробизму или зимняя (равно как и летняя) спячка. Во многих случаях эти регуляторные процессы будут, конечно, в большой мере зависеть от состава и концентраций содержащихся в клетке низкомолекулярных веществ (таких, например, как ингибиторы и активаторы ферментов).

Следует еще раз подчеркнуть, что рассмотренные типы адаптивных ответов не всегда можно четко разграничить и во многих случаях ответ включает одновременно все три типа адаптивных реакций. Однако приведенное подразделение может служить удобной концептуальной схемой, помогающей разобратся в механизмах адаптации. Перейдем теперь к более подробному анализу каждой из стратегий.

### Адаптивные изменения ферментных систем

Ферменты выполняют две главные функции: они катализируют биохимические реакции и служат регуляторами обмена веществ. Обсуждая адаптивные изменения ферментных систем, следует четко различать эти функции, так как во многих случаях

---

ночных кодируется не менее чем двумя, а обычно тремя отдельными локусами. Субъединицу лактатдегидрогеназы, содержащуюся в наибольшей концентрации в клетках скелетных мышц (особенно в белых мышцах рыб), называют М-субъединицей или субъединицей мышечного типа. В аэробных тканях, например в сердечной мышце, преобладают субъединицы второго типа — Н. Субъединицы третьего типа встречаются только в клетках семенников и сетчатки. При рассмотрении тетрамеров мышечного типа ( $M_4$ ) у разных видов речь будет идти о субъединицах, кодируемых гомологичными генными локусами, но аминокислотный состав этих субъединиц у разных видов может заметно различаться.

тонкая регуляция каталитической способности ферментов имеет даже большее значение, чем просто высокая степень этой способности. Для того чтобы понять, каким образом и когда при адаптивных ответах организма вступают в действие механизмы регуляции ферментативных функций, нужно сначала рассмотреть основные типы адаптивных процессов, протекающих на уровне ферментов. Изменения в наборе ферментов и в их концентрациях часто бывают необходимы по следующим причинам:

1. Изменение окружающей среды или переход к новой стадии развития организма может вести к изменению его потребностей в отношении общей интенсивности метаболизма или каких-то определенных процессов.
2. На структуру и функцию фермента могут сильно влиять изменения физических факторов среды, например температуры или величины гидростатического давления.
3. При изменениях химического состава среды (поскольку они могут влиять на качественный и количественный состав внутриклеточных и внеклеточных жидкостей) нередко требуются изменения в концентрациях и типах ферментов.

Если условия среды изменяются или организм переходит на новую стадию развития, возникают новые метаболические задачи, для решения которых могут понадобиться количественные и качественные преобразования ферментных систем, упоминавшиеся выше. Например, у эктотермного организма (температура тела которого в основном или даже полностью определяется температурой окружающей среды) при понижении внешней температуры может сильно понизиться общая интенсивность метаболизма и измениться регуляция ряда ключевых ферментов. В определенной мере эти отклонения могут быть компенсированы повышением концентрации ферментов в клетке. Однако в некоторых случаях одного увеличения этих концентраций бывает недостаточно: может случиться так, что для восстановления адекватной каталитической и особенно регуляторной способности ферментов клетке потребуется синтезировать новые изоформы. Аналогичная ситуация возможна и при изменении гидростатического давления: здесь тоже могут изменяться скорости ферментативных процессов и регуляторные характеристики ферментов. Метаболические проблемы, связанные с изменениями химического состава окружающей среды, также могут решаться на уровне ферментов, особенно в тех случаях, когда под влиянием внешних перемен (например, при изменении осмотического давления) изменяется состав или содержание в клетке растворенных соединений или их активность. При анализе различных типов реакции организма на сдвиг внешнего осмотического давления мы, однако, обнаружим, что в большинстве случаев внутриклеточные макромолекулярные структуры достаточно надежно

защищены: это может быть обеспечено работой ионных насосов или же тонкой коррекцией состава микросреды, окружающей макромолекулы.

### Адаптация на уровне микроокружения макромолекул

При изучении процессов биохимической адаптации и молекулярной эволюции основное внимание обычно обращают на макромолекулярные компоненты клеток — нуклеиновые кислоты и белки — и на большие надмолекулярные ансамбли, например мембраны. Значительно меньший интерес исследователей вызывали «микромолекулы» — низкомолекулярные вещества. Между тем именно они, омывая макромолекулярные системы, определяют многие из их важнейших биологических свойств. Мы постараемся исправить это упущение. В центре нашего внимания будет несколько процессов, о которых мы почти не упоминали, например стратегии в области осморегуляции. Один из ключевых вопросов касается выбора определенных типов растворенных веществ в качестве «осмотических эффекторов» (осмолитов), т. е. внутриклеточных регуляторов осмотического давления. Мы выдвинем ряд химических принципов, позволяющих решить, может ли данное вещество, будь то неорганический ион или малая органическая молекула, быть «подходящим» компонентом биологического раствора. Такой анализ приведет нас к важному выводу, что эволюция биологических растворов, например цитозолей, состоит в создании окружения, благоприятного для нормального функционирования макромолекул. Далее мы рассмотрим, как поддерживается постоянство такого микроокружения при химических изменениях внешней среды. Наш анализ позволит нам по-новому взглянуть на причины, лежащие в основе разнообразных стратегий осморегуляции у водных и наземных организмов.

Анализируя проблемы адаптации на уровне микросреды, мы затронем также вопрос о липидном окружении, в котором функционируют многие ферменты, в особенности связанные с мембранами. Липиды, не будучи «микромолекулами», тоже могут, подобно водной среде, окружающей растворимые ферменты, создавать микроокружение, благоприятное для функционирования белков. Известно, что процессы температурной адаптации сопровождаются существенными изменениями состава липидов; аналогичные изменения, вероятно, происходят и при адаптации к перемене давления. Смысл этих адаптаций тот же, что и в случае адаптации к осмотическим условиям.

Обсуждение процессов адаптации, протекающих с участием мембранных липидов и осмолитов, будет дополнено рассмотрением процессов, обеспечивающих нужную величину рН в не-

посредственном окружении ферментов. Выбор этой величины и буферных систем для ее поддержания был, вероятно, важнейшей проблемой, которую пришлось решать живым организмам на заре эволюции клетки. Это вытекает из того факта, что регуляцию рН мы находим у всех исследованных до сих пор организмов. Мы попытаемся выявить критерии, определяющие оптимальную для той или иной функции величину рН, и это прямо подведет нас к вопросу о том, каким образом буферные и другие регуляторные системы могут поддерживать рН на оптимальном уровне.

Анализ различных способов регуляции внутриклеточной микросреды для поддержания структурных и функциональных свойств макромолекул, возможно, приведет читателя к новому, более широкому пониманию следующего важного принципа: при надлежащей регуляции микроокружения макромолекул для адаптации организма к изменениям внешней среды может не требоваться какого-либо изменения самих этих макромолекул. Такое «перенесение главной тяжести эволюционного процесса на плечи макромолекул» означает, что скорость какого-то конкретного эволюционного процесса (например, освоения среды с иной соленостью) уже не будет лимитироваться возможной скоростью замены аминокислот в белках.

### Адаптация путем изменений метаболической активности

Выше мы рассмотрели две основные стратегии адаптации организма к изменяющейся среде: одна из них состоит в изменении количеств или типов макромолекул, имеющих в клетке, а другая — в таком изменении микросреды для этих макромолекул, которое защищало бы их от воздействия внешних перемен. Наряду с этими двумя широко распространенными механизмами адаптации известен третий, который отличается особой быстротой. Его сущность состоит в регулировании функциональной активности макромолекул, ранее синтезированных клеткой. Регулирующие факторы (сигналы) разнообразны по своей природе; это могут быть физические изменения внешних факторов (например, температуры или света) и разнообразные физиологические сигналы внутреннего происхождения (гормоны, электрические процессы). Такие сигналы могут изменять интенсивность метаболизма в целом и соотношение между отдельными, часто конкурирующими, путями метаболизма. Подобные реакции могут быть ответом

а) на изменение энергетических потребностей (или смену источников энергии) при переходе к новому виду деятельности, например от покоя к энергичному движению;

б) на изменение в обеспеченности кислородом, например при факультативном анаэробнозе;

в) на воздействие факторов, связанных с миграцией и голоданием, например при нерестовой миграции лососей;

г) на изменение физических условий среды, требующее перестройки метаболизма, например при переходе к зимней или летней спячке;

д) на происходящие повседневно изменения гормонального статуса — повседневные (например, при регуляции уровня глюкозы) или связанные с определенной стадией репродуктивного цикла, например с регулированием лактации.

Это, конечно, далеко не полный перечень условий, приводящих к серьезным качественным и количественным изменениям метаболизма. Однако он все же позволяет читателю представить себе, насколько важную роль может играть регуляция активности уже существующих ферментов в разнообразных адаптивных реакциях. Для многих из этих адаптаций необходима чрезвычайная быстрота регуляции скоростей метаболических реакций — гораздо большая, чем та, которую могли бы обеспечить изменения в концентрации изотимов того или иного фермента. Этот вывод приводит нас к рассмотрению еще одной важной особенности процессов биохимической адаптации, а именно связи между необходимой быстротой адаптации и разнообразием способов ее осуществления у данного организма.

### **Скорость биохимической адаптации**

#### **и ее связь с имеющимися адаптивными механизмами**

Временные параметры биохимической адаптации варьируют в широких пределах — от длительных периодов, необходимых для эволюционного изменения аминокислотных последовательностей, до долей секунды, за которые может измениться активность уже присутствующих в клетке ферментов. Из этого ясно, что выбор того или иного механизма (или механизмов) адаптации в значительной мере определяется требованиями к ее скорости. Чем больше времени предоставляется для адаптивных изменений, тем больше выбор возможных стратегий. Приступая к обсуждению вопроса о временных масштабах адаптации, полезно выделить несколько ее типов, которые будут рассмотрены ниже.

*Генетическая адаптация.* В тех случаях, когда адаптивный процесс идет на протяжении многих поколений, популяция может использовать все стратегии приспособления. Мутации регуляторных генов приведут к изменению базальных концентраций ферментов и других молекул, т. е. к количественной макромолекулярной адаптации. Аминокислотные замены в белках обусловят появление новых изотимов (или аллозимов), а в особых

случаях — и ферментов совсем нового типа. Замены аминокислот могут облегчить выработку новых способов регуляции ферментативной активности, обеспечивающих более адекватную реакцию на сигналы, вызывающие изменения в скоростях метаболических процессов. При генетической адаптации могут также возникать совершенно новые молекулы, придающие организму способность к освоению новых местообитаний. Классическим примером такого рода адаптаций может служить появление гликопротеиновых и полипептидных «антифризов» у морских костистых рыб, живущих в высоких широтах, благодаря чему эти рыбы (в отличие от других костистых рыб) могут существовать среди льдов.

*Аклимация и акклиматизация.* Адаптивные реакции этих типов происходят у отдельных особей, но требуют все же достаточного времени, чтобы могла произойти индукция новых белков и структурная перестройка фосфолипидов в мембранах. Согласно Проссеру (Prosser, 1973), акклиматизация — это такой адаптивный процесс, при котором организм приспосабливается к изменению нескольких параметров окружающей естественной среды, в то время как акклимация — это приспособление, наблюдаемое в лабораторных условиях, где все параметры среды, за исключением какого-то одного, поддерживаются на неизменном уровне.

Главное отличие этих адаптивных реакций от генетической адаптации состоит в том, что они протекают исключительно на фенотипическом уровне. Для приспособления организма к изменениям среды в этом случае может использоваться только та информация, которая уже содержалась в его геноме с самых первых дней жизни.

*Немедленная адаптация.* Такого рода биохимическая адаптация происходит настолько быстро, что она не может быть связана с изменениями в экспрессии генов или со значительной перестройкой клеточных структур в результате биосинтетических процессов. Немедленная адаптация нередко осуществляется путем модуляции активности уже имеющихся ферментов. Такая быстрая «подгонка» активности ферментов часто представляет собой лишь первую линию защиты организма от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Со временем на смену этой реакции приходят изменения в экспрессии генов или — в ряду поколений — изменения на генетическом уровне.

Таким образом, организм располагает способами биохимической адаптации разной степени сложности, которые позволяют ему успешно приспосабливаться к изменениям окружающей среды независимо от скорости последних (эту скорость, конечно, следует оценивать в сопоставлении с временем генерации данного организма).

## Компенсаторная и наступательная (эксплуатативная) адаптация

При любом способе биохимической адаптации (количественные и качественные изменения макромолекул, их микроокружения или скоростей ферментативных реакций) этот процесс, каковы бы ни были его временные масштабы, может привести к благоприятным последствиям двоякого рода. Адаптация может завершиться восстановлением биохимических функций, нарушенных воздействием внешней среды; такого рода адаптацию мы будем называть «компенсаторной». Она может в равной мере обеспечить как гомеостаз, так и энантиостаз. Обычно в качестве примера приводят компенсацию влияния температуры у эктотермных организмов: благодаря такой компенсации интенсивность метаболизма у них сравнительно мало зависит от температуры окружающей среды. Во всех случаях компенсаторная адаптация служит средством, обеспечивающим стационарное состояние тех или иных структур или функций.

Этим консервативным по своей сути адаптациям можно противопоставить более радикальные биохимические изменения, придающие организмам новые благоприятные для них свойства. Такая наступательная («эксплуатативная») адаптация может приводить к освоению новых местообитаний, новых источников питания и т. п., словом, наделять организм дополнительными способностями, позволяющими извлекать пользу из окружающей среды. Превосходный пример такого рода адаптации — молекулы антифриза, имеющиеся у полярных рыб. Другим примером могут служить симбиотические отношения между сульфид-окисляющими хемоавтотрофными бактериями и животными в зоне глубоководных термальных источников. Именно такие адаптивные процессы вносят главный вклад в эволюцию и наглядно показывают, как биохимические изменения могут приводить к освоению новых местообитаний или использованию новых ресурсов прежнего местообитания.

### Почему нужно изучать биохимическую адаптацию?

Что, кроме радости чистого познания, дает ученому проникновение в механизмы приспособительных реакций биологических систем? И есть ли нечто такое, что можно узнать *только* при изучении разнообразных форм биохимической адаптации? Мы не сомневаемся в утвердительном ответе на последний вопрос. Нашу убежденность в важности анализа адаптивных процессов на биохимическом уровне можно обосновать следующим образом: для полного раскрытия «главных тем» биологии необходимо знакомиться со всеми их вариациями — только такой сравнительный подход позволит нам уяснить себе фундаментальные

принципы конструкции живых организмов. Поясним эту мысль на примере. Можно потратить десятилетия на изучение различных свойств какого-либо фермента, имеющегося у данного вида животных, например у кролика. Итогом наших трудов явится длинный перечень свойств этого фермента. Какие же из них следует отнести к важнейшим свойствам, присущим всем ферментам или хотя бы всем гомологам данного фермента у разных видов? А какие свойственны только кроличьему варианту и никаким другим? Ни на один из этих вопросов невозможно ответить, не исследовав гомологичные белки. Только такое изучение позволит выявить то, что действительно важно для работы любых ферментов, а также те специфические особенности, которые нужны, чтобы фермент мог функционировать в организме теплокровного (эндотермного) животного, например кролика. Мы будем постоянно — на протяжении всей книги — проводить такого рода сравнительный анализ биохимических процессов. Вычлняя каждый раз те свойства, которые обнаруживаются у всех изученных объектов, мы сможем особенно хорошо понять все то, что играет ключевую роль в конструкции биохимических систем.



# «Конструкция» клеточного метаболизма

## Введение

Будучи конечным результатом ряда циклов мутирования и отбора, живые организмы могут в известном смысле рассматриваться как «сконструированные» системы, вполне аналогичные продуктам технического конструирования. Хотя организмы были созданы в процессе адаптации, а не руками инженеров, как машины, тем и другим системам свойственны *функция* и *цель* (понятия, неприменимые, конечно, к природным неодушевленным объектам). Создание тех и других систем связано с испытанием различных вариантов и отбором тех из них, которые оказываются эффективными. Историю создания тех и других конструкций и их свойства невозможно выяснить, опираясь на одни только принципы физики и химии; даже исчерпывающее познание всех физических и химических свойств белков, жиров и углеводов не позволит нам предсказать форму тела быстро плавающей рыбы. Для понимания свойств и предсказания поведения любых таких систем (созданы ли они руками человека или процессами эволюции) необходимо знать *правила или принципы их построения в каждом данном случае*. Какие ограничения свойственны данной системе? Каковы пределы ее адаптивных возможностей? Только располагая такой информацией, судостроитель сможет предвидеть, как скажутся на скорости движения и прочности судна изменения в форме его корпуса, в полимерном покрытии или в расположении парусов. В подобной же информации нуждается биомеханик, чтобы сказать, как отразится на скорости и экономичности движения данной пелагической рыбы изменение формы ее тела, положения плавников или конфигурации хвоста. В области биохимии общие конструктивные принципы разработаны не так хорошо, как в большинстве областей техники; и все же биохимиков сильно воодушевило осознание того, что 1) такие принципы существуют и 2) они поддаются расшифровке (и в ряде областей биохимии уже хорошо поняты). Главная задача этой главы — выяснить, как далеко продвинулись ученые по пути выявления основных принципов организации клеточного метаболизма. Здесь потребуется весьма детальный анализ этой организации, но он послужит

лишь основой для последующего обсуждения механизмов биохимической адаптации, благодаря которым метаболические процессы как в качественном, так и в количественном отношении столь точно соответствуют условиям внешней среды.

### Функциональные блоки в системе метаболизма и их сопряжение

Обсуждение процессов клеточного метаболизма обычно начинают с трех важнейших условий, необходимых для поддержания жизни любых клеток (микробных, растительных и животных). Это наличие энергии, запасенной в форме АТФ (аденозинтрифосфата), восстановительной силы в форме NADPH (восстановленного никотинамид-адениндинуклеотидфосфата) и исходных материалов для процессов биосинтеза. Любопытно, что на подробных картах метаболических путей сущность этих условий и способы их достижения часто теряются среди множества деталей метаболизма. Сложность и запутанность таких карт порою мешает видеть основные принципы организации метаболических процессов в клетке. Как подчеркнул Эткинсон (Atkinson, 1977), схемы биохимических процессов во многом сходны со схемами электронных устройств. Как и в электронике, при описании метаболизма для объяснения сути общих принципов проще всего использовать функциональные блок-схемы. Такого рода блок-схема (рис. 2-1) показывает, что метаболизм живой клетки можно представить в виде трех функциональных блоков:

1. Блок катаболизма (I), в котором различные вещества пищи окисляются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , а большинство высвобождающихся при этом электронов переносится на  $\text{O}_2$ ; с этим процессом сопряжено образование АТФ (так называемое окислительное фосфорилирование). При полном отсутствии  $\text{O}_2$  или его недостатке окисление не доходит до конца, и электроны переносятся на различные органические соединения, которые при этом восстанавливаются и в такой восстановленной форме накапливаются в клетке в качестве конечных продуктов обмена. Важнейшие метаболические пути этого блока — гликолиз,  $\beta$ -окисление жирных кислот, цикл Кребса и пути распада аминокислот; все они обеспечивают не только поступление электронов и протонов в электрон-транспортную систему, но также и (наряду с несколькими другими путями) образование углеродсодержащих соединений, используемых затем в качестве предшественников во всех биосинтетических процессах. Для эукариот особую проблему представляет освобождение от конечных продуктов катаболизма (у прокариот они просто выводятся в окружающую среду). Некоторые конечные продукты, например  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ,

относительно безвредны (хотя даже  $\text{CO}_2$  нельзя считать абсолютно безобидным веществом, так как его образование ставит перед организмом задачу регуляции кислотно-щелочного равновесия); в то же время ряд других соединений — конечные продукты анаэробного метаболизма, отходы, содержащие азот или

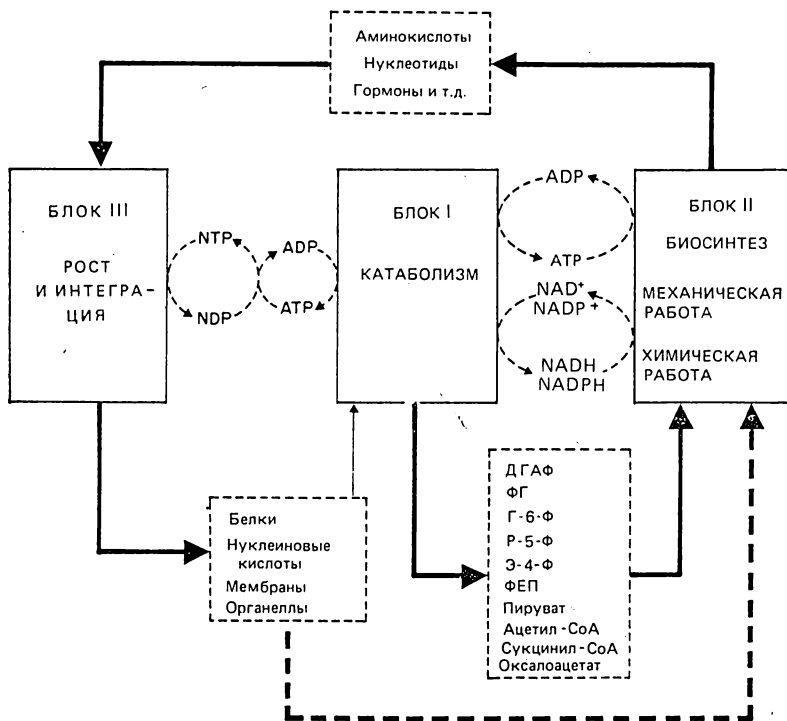


Рис. 2-1. Блок-схема главных функциональных элементов клеточного метаболизма. NTP — нуклеотидтрифосфат; NDP — нуклеотиддифосфат; ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат; ФГ — фосfogлицерат; Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат; Р-5-Ф — рибулозо-5-фосфат; Э-4-Ф — эритрозо-4-фосфат; ФЕП — фосфоенолпируват.

серу, — представляют для организма реальную (или потенциальную) опасность. Таким образом, для того чтобы избежать «самозагрязнения», блок I у эукариот должен быть снабжен специальными системами для выведения, обезвреживания, накопления или реутилизации потенциально вредных конечных продуктов катаболизма.

2. Блок анаболизма (II) в химическом отношении гораздо сложнее. В основном он представлен процессами, протекающими с потреблением АТФ. В некоторых клетках это главным образом процессы биосинтеза, в которых соединения, поставляемые бло-

ком I, превращаются в сотни специфических клеточных компонентов. В других клетках (например, в мышечных) энергия, запасенная в форме АТФ, расходуется в основном на совершение механической работы. Есть также клетки, специализированные для выполнения того или иного вида химической работы (например, для перекачивания ионов). В клетках двух последних категорий, однако, должны в то же время идти и процессы биосинтеза, хотя бы с умеренной интенсивностью. Во всех этих процессах АТФ используется как универсальный преобразователь энергии, а там, где возникает потребность в ионах  $H^+$ , роль восстановителя выполняет NADPH.

3. Третий блок — блок роста и дифференцировки — можно было бы назвать также сборочным цехом. Из продуктов блока II он отбирает те соединения, которые служат ключевыми предшественниками при биосинтезе сложных макромолекул, составляющих основу всей жизнедеятельности клетки: белков, нуклеиновых кислот, компонентов мембран, органелл и т. п. Создаваемые здесь клеточные компоненты — это, по существу, и есть тот «машинный парк», который работает в катаболическом и анаболическом блоках. В процессах блока III тоже используется энергия, запасенная в форме АТФ, но, как правило, не непосредственно, а в форме образующихся при участии АТФ производных гуанозина, уридина и цитидина (GTP, UTP или CTP соответственно). Такая специализация функций нуклеозидтрифосфатов, по-видимому, повышает эффективность регуляции метаболизма, позволяя клетке должным образом распределять АТФ между разными метаболическими путями (Atkinson, 1977). Циркуляция АТФ между блоками I и III служит важным механизмом функционального сопряжения этих блоков.

Обратимся вновь к схеме, представленной на рис. 2-1. Будучи преднамеренно упрощенной, эта схема подчеркивает ряд важных моментов. Во-первых, можно видеть, что катаболизм служит движущей силой для функционирования живых систем. Во-вторых, сама возможность отобразить в такой простой модели множество сложных биологических процессов и взаимоотношений наглядно демонстрирует единство биохимических принципов, лежащих в основе всех клеточных функций. В-третьих (и это, пожалуй, наиболее поучительно), схема показывает, что между блоками имеется лишь небольшое число связей, причем особую роль в этих связях играют АТФ и NADPH — это главные сопрягающие агенты во всем метаболизме, единственные вещества, основное назначение которых состоит в сопряжении главных функциональных блоков. Функции других сопрягающих агентов тоже существенны, но ни один из них не используется столь широко. Например, восстановленные формы никотинамид-адениндинуклеотида (NADH) и флавин-адениндинуклеотида

(FADH<sub>2</sub>), которые участвуют в работе катаболического блока, перенося при окислительном фосфорилировании электроны с субстрата на кислород (см. ниже), не играют значительной роли в сопряжении главных функциональных блоков.

Важной особенностью этих сопрягающих агентов является циклический характер их функционирования. В реакциях блока II АТФ превращается в аденозиндифосфат (ADP) или аденозинмонофосфат (AMP), а NADPH — в NADP<sup>+</sup>; поэтому для регенерации исходных веществ достаточно, чтобы в ходе каких-либо катаболических процессов произошло рефосфорилирование или соответственно восстановление (при окислении субстрата). Именно это отличает АТФ и NADPH от группы других соединений, которые тоже можно рассматривать как сопрягающие интермедиаты (рис. 2-1). Такие соединения в отличие от АТФ и NADPH синтезируются в реакциях одного блока и разрушаются при использовании в другом блоке. В реакциях блока II (в основном в процессах биосинтеза) расходуется около 10 веществ, образующихся в блоке I в реакциях гликолиза, цикла Кребса, пентозофосфатного пути и в ряде анаэробных реакций. В эту группу сопрягающих интермедиатов входят следующие соединения: четыре сахарофосфата — триозофосфат [дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ) или 3-фосfogлицеральдегид], тетрозофосфат, пентозофосфат и гексозофосфат; три 2-оксокислоты — пируват, оксалоацетат и 2-оксоглутарат; две активированные карбоновые кислоты — ацетил-СоА и сукцинил-СоА; и наконец, фосфоенолпируват (в этот перечень не включены изомеры и легко взаимопревращаемые соединения). Поступив в блок II, эти десять веществ расщепляются, и поэтому запас их должен все время пополняться за счет соответствующих катаболических процессов блока I. В отличие от АТФ и NADPH, регенерируемых и снова используемых в клетке, эти соединения рано или поздно включаются в состав более сложных клеточных компонентов.

Аналогичная, но гораздо более обширная группа интермедиатов образуется в биосинтетических процессах блока II. Эти вещества поступают затем в блок III, где используются как предшественники макромолекул или обеспечивают работу этого блока иным путем; их потоки тоже обеспечивают сопряжение функций второго и третьего блоков.

Продукты блока III (гены, белки, мембраны, органеллы) обеспечивают функционирование всех трех блоков. Хотя они тоже «протекают» через систему (у каждого из них есть определенный период полураспада), полная аналогия здесь невозможна, так как массовый распад таких клеточных элементов происходит лишь при каких-либо необычных обстоятельствах.

### Адаптация «оборудования» и адаптация его «производительности»

Биохимические адаптации возможны во всех трех функциональных блоках. В блоке I они влияют на пути и скорости образования АТФ и сопрягающих интермедиатов; при этом могут изменяться конечные продукты катаболизма и приниматься меры, предотвращающие их накопление — «загрязнение фабрики». Адаптации в блоке II изменяют потребность в специфических продуктах биосинтеза и/или в АТФ (в связи с той или иной клеточной функцией). В первых главах этой книги мы будем в основном рассматривать именно такие адаптивные процессы.

В блоке III осуществляются адаптивные изменения совершенно иного рода. В отличие от первых двух блоков, где обычно модулируются скорости определенных метаболических процессов или интенсивность работы, идущей с потреблением АТФ (перенос ионов, сокращение и т. п.), в блоке III адаптация затрагивает структурные (и как следствие — функциональные) компоненты клетки. Таким образом, происходит адаптация метаболизма клетки и — в широком смысле — всей ее биологии к специфическим внешним условиям. Например, ферменты адаптируются к определенной температуре, давлению, солёности среды; каждый изотип по своим кинетическим особенностям приспособлен к функционированию в каких-то конкретных условиях; от набора имеющихся в клетке терминальных дегидрогеназ зависит, какими будут конечные продукты при ограниченном доступе кислорода. Структурная организация ионных насосов, встроенных в мембраны, может определять как направление, так и скорость переноса ионов. Все подобные адаптации (и многие другие, которые мы детально обсудим позже) можно сравнить с техническим переоснащением фабрики или цеха: суть дела в обоих случаях состоит в замене оборудования. Таким образом, при адаптации на уровне блока III модифицируется «метаболическая машина» клетки и механизмы, используемые для совершения различной работы. При адаптации же блоков I и II изменяется лишь производительность уже действующих машин и механизмов. И хотя, как правило, для удобства изложения мы будем обсуждать эти два типа адаптаций отдельно, очевидно, что в основе всех адаптивных изменений, происходящих в блоках I и II, лежат адаптации блока III.

### АТФ-эквиваленты

В схеме на рис. 2-1 аденилаты занимают центральное положение, и поэтому их роль необходимо рассмотреть подробнее. Во многих отношениях аденилатная система — это одна из са-

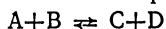
мых удивительных конструктивных особенностей клетки. Уже более 30 лет известно, что АТФ участвует в работе почти всех достаточно длинных метаболических путей. Никакой другой метаболит не может даже отдаленно сравниться в этом с аденилатами: они действуют повсюду — в энергетическом обмене, реакциях биосинтеза, мышечном сокращении, транспорте ионов и т. д. Энергию, передаваемую в сопряженных процессах, принято измерять в АТФ-эквивалентах; один такой эквивалент соответствует энергии, высвобождающейся при превращении АТФ в АДФ (или затрачиваемой при обратной реакции). Поскольку любые превращения метаболитов могут быть в энергетическом отношении соотнесены с реакцией  $\text{АТФ} \rightarrow \text{АДФ}$ , их можно оценивать числом АТФ-эквивалентов. Например, «цена» окисления  $\text{NADH}$  в  $\text{NAD}^+$  составляет три АТФ-эквивалента, а реакции  $\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD}^+$  — два АТФ-эквивалента; цена же окисления  $\text{NADPH}$  в  $\text{NADP}^+$  более высока и равна четырем АТФ-эквивалентам (см. ниже).

Поскольку аденилаты участвуют в сопряжении обменных процессов, для каждого конкретного метаболита можно подсчитать число АТФ-эквивалентов, получаемых при его окислении (или сбраживании — у анаэробов) или же необходимых для его биосинтеза. Таким образом сахара и полисахариды, аминокислоты и белки, жирные кислоты, жиры и ДНК (и даже такой сложный процесс, как рост) можно соотнести с определенным количеством АТФ-эквивалентов, которые были фактически затрачены или потенциально необходимы для их синтеза или образовались при их расщеплении.

Важно, однако, иметь в виду, что такого рода оценка веществ вполне равнозначна определению их энергетической ценности по выходу энергии при их гидролизе, выраженному в калориях на 1 моль. Преимущество АТФ-эквивалента в качестве единицы состоит в том, что именно АТФ служит внутренней «энергетической валютой» клетки. Не менее существенно и то, что при этом подчеркивается первостепенная роль АТФ во временном хранении и переносе химической энергии в клетке. Химическая основа сопряжения реакций, представленного на рис. 2-1, как раз и состоит в переносе энергии между блоками в форме АТФ; поэтому важно понять, как происходит такой перенос.

### Роль аденилатов в запасании и переносе энергии

При постоянной температуре и постоянном давлении изменение свободной энергии в химической реакции



выражается уравнением, известным из курса термодинамики:

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{eq}} + RT \ln Q.$$

Параметр  $Q$ , характеризующий реакцию, равен  $[C][D]/[A][B]$ , где буквы в скобках обозначают химическую активность (или концентрацию в случае разбавленных растворов, когда можно пренебречь ионными и другими взаимодействиями),  $K_{eq}$  — константа равновесия,  $R$  — газовая постоянная,  $T$  — абсолютная температура, а  $\Delta G$  — изменение свободной энергии при превращении 1 моля  $A$  и 1 моля  $B$  в  $C$  и  $D$  при условии постоянства концентраций (точнее, активностей) всех компонентов. Объединяя члены в правой части приведенного выше уравнения, получим

$$\Delta G = RT \ln Q/K_{eq}.$$

Состояние клеточного метаболизма в этом уравнении отражает главным образом величина  $Q$ , которая позволяет судить, как далеко отклонилась система от равновесия (и в какую сторону). Когда  $Q = K_{eq}$ ,  $\Delta G = 0$  и суммарный поток метаболитов в данной реакции в условиях изоляции равен нулю. При  $\Delta G < 0$  (т. е. при  $Q < K_{eq}$ ) реакция идет в прямом направлении (как это показано выше). При  $\Delta G > 0$  прямая реакция становится невозможной; реакция должна теперь протекать в обратном направлении.

«Хорошим» в химическом отношении топливом (т. е. источником химической потенциальной энергии) может служить любой субстрат, удовлетворяющий следующим требованиям:

1) распад этого субстрата должен сопровождаться значительным уменьшением свободной энергии, т. е.  $\Delta G$  для этого процесса  $\ll 0$ ;

2) при хранении субстрат не должен самопроизвольно распадаться;

3) при необходимости мобилизации субстрата должны создаваться условия, позволяющие преодолеть кинетический барьер.

Это всё необходимые условия, так как химическая энергия субстрата может быть использована только в том случае, если, с одной стороны, существует возможность его метаболического расщепления, а с другой — система «субстрат — продукт его распада» не находится в состоянии равновесия. При этом такая система должна быть достаточно инертной до тех пор, пока ее энергия не потребуется; в противном случае эта система не сможет быть приемлемой формой энергетического резерва.

Главные виды клеточного «топлива» удовлетворяют этим требованиям. В присутствии кислорода углеводы, жиры и белки термодинамически нестабильны, однако кинетически очень устойчивы. Для их мобилизации в клетке активируются надлежащие ферментные системы (рассмотренные ниже), катализирующие реакции, для которых  $\Delta G \ll 0$ .

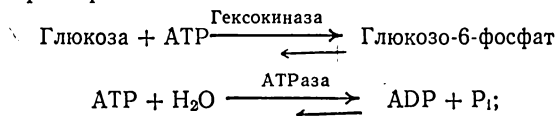
Рассмотренными выше качествами обладают и аденилаты; АТР тоже можно рассматривать как «топливо» для тех реакций



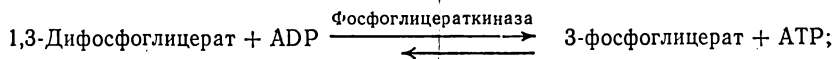
и метаболических процессов, в которых он используется. Однако роль аденилатов в переносе энергии и в обеспечении ею клеточных функций несколько отличается от роли обычных субстратов. Любая система, в том числе аденилатная, может служить источником энергии только тогда, когда она не находится в равновесии. Поскольку все реакции идут по направлению к равновесию, система не может сохранять энергию при тех же условиях, при которых она ее переносит и отдает.

В живых организмах используется следующий принцип: системы, переносящие энергию, заряжаются в одних условиях, а разряжаются в других (в первом случае система удаляется от того равновесия, к которому она будет возвращаться во втором). На этом принципе работает и аденилатная система переноса энергии. Ее зарядка происходит путем фосфорилирования ADP в реакциях, для которых равновесие достигается при высоком отношении  $[ATP]/[ADP]$ . Все известные реакции, протекающие с образованием АТР (например, пируваткиназная), характеризуются высокими значениями константы равновесия для прямой реакции (в направлении образования АТР), т. е. для них  $\Delta G \ll 0$ . В присутствии кислорода большая часть АТР в клетке генерируется в процессе фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, и в этих реакциях равновесие тоже сильно сдвинуто в сторону образования АТР.

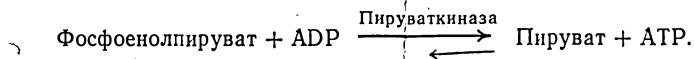
Разрядка аденилатной системы происходит путем расщепления АТР в тех или иных энергозависимых процессах. Условия для разрядки существенно отличаются от тех, в которых происходил синтез АТР; хотя константа равновесия и в этом случае достаточно велика, она теперь благоприятна для гидролиза АТР с образованием ADP. При разрядке АТР отдает фосфорильную группу, например:



напротив, при синтезе АТР происходит присоединение фосфорильной группы к молекуле АДР:



или



Те и другие реакции сопровождаются большим снижением свободной энергии, поэтому разрядка аденилатной системы может

доставлять энергию для осуществления других химических реакций (например, в процессах биосинтеза) или для совершения механической работы, для переноса ионов и т. п. Именно таким образом все реакции блока II (анаболические или связанные с выполнением клеткой работы) сопряжены с реакциями блока I, приводящими к синтезу АТФ (рис. 2-1). Рассмотрим теперь более подробно метаболические процессы, благодаря которым в животной клетке могут синтезироваться АТФ и другие сопрягающие метаболиты. Эти процессы обычно подразделяют на аэробные и анаэробные.

### Анаэробный гликолиз и гликогенолиз

Наиболее распространенными формами анаэробного метаболизма в клетках позвоночных являются гликолиз (сбраживание глюкозы) и гликогенолиз (при котором используется резервный субстрат — гликоген). Это обычный процесс брожения, подробно описанный в любом вводном курсе биохимии. Путь сбраживания гликогена или глюкозы до лактата может быть схематически представлен в виде линейной последовательности реакций (рис. 2-2). Он имеет ряд характерных особенностей. Во-первых, ферменты этого пути, как правило, находятся в цитозоле — единственное известное нам исключение составляет лактатдегидрогеназа спермий, локализованная в митохондриях. Во-вторых, один окислительный этап (катализируемый глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой) сбалансирован с последующим восстановлением, протекающим при участии лактатдегидрогеназы. В результате такого сопряжения окислительной и восстановительной реакций анаэробный распад глюкозы приводит к накоплению лактата, который является здесь конечным продуктом. Важно отметить, что накопление конечного продукта связано только с необходимостью поддерживать окислительно-восстановительный баланс в условиях, когда конечным акцептором служит не кислород, а какое-либо органическое соединение (в данном случае пируват).

На первый взгляд может показаться, что наличие в цепи гликолиза двух подготовительных реакций, протекающих с расходом АТФ (на этапах, катализируемых гексокиназой и фосфофруктокиназой), снижает его эффективность. Однако не следует обвинять клетку в расточительности. Эти реакции, предшествующие образованию АТФ (на этапах, катализируемых фосфоглицераткиназой и пируваткиназой), очень важны для клетки, так как они позволяют ей поддерживать значительно более высокую внутреннюю концентрацию гексоз: плазматическая мембрана непроницаема для фосфорилированных сахаров. Таким образом, клетка «расплачивается» за высокий уровень

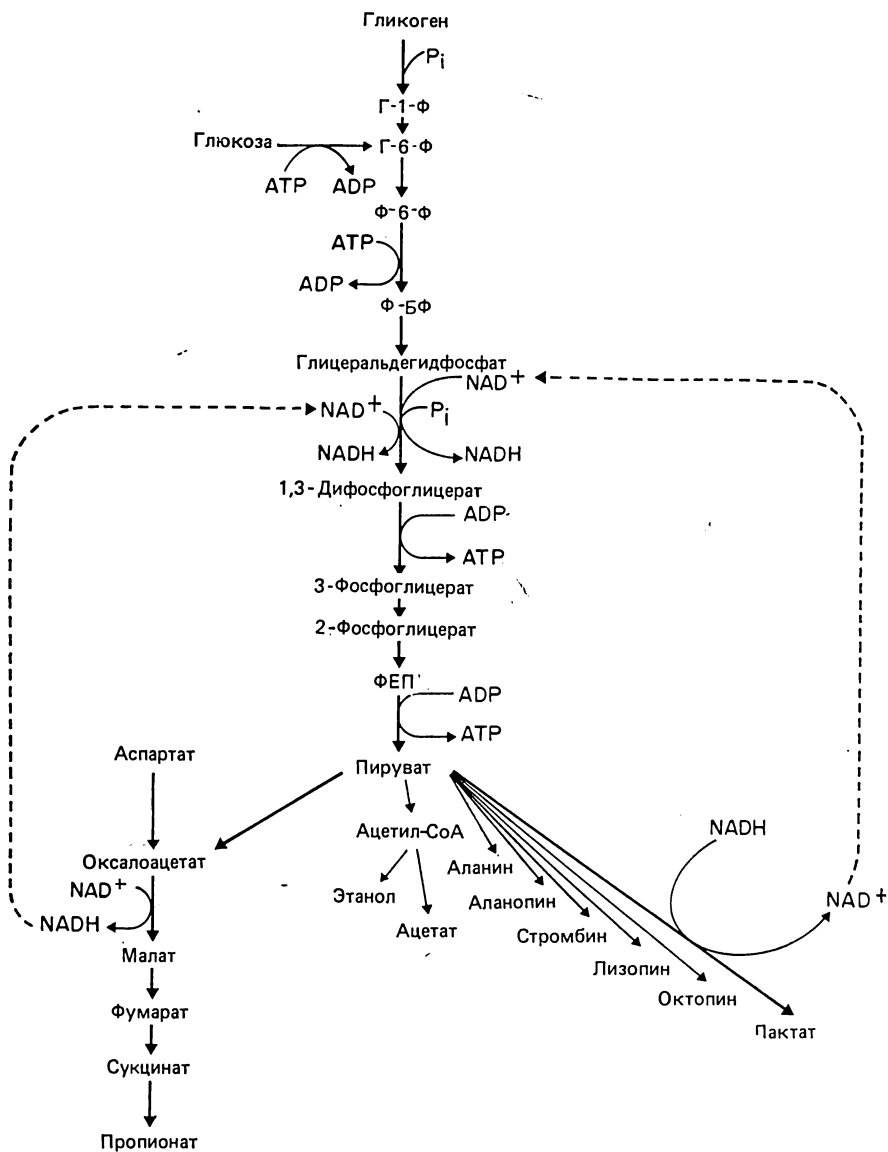


Рис. 2-2. Главные пути брожения в животных тканях. ФБФ — фруктозобисфосфат.

нужных ей субстратов снижением энергетической эффективности гликолиза в целом.

Путь гликолиза филогенетически очень древний, поэтому в традиционных курсах биохимии его нередко характеризуют как устойчивый и консервативный. Вряд ли найдется другое утверждение, столь далекое от истины, и необходимо сразу же сказать, что по крайней мере некоторые отрезки гликолитического пути явно подвержены изменениям и адаптивным перестройкам. Такие перестройки наблюдаются как минимум в четырех участках — на уровне гликогена, триозофосфата, фосфоенолпирувата и пирувата. Каждый из этих уровней заслуживает отдельного рассмотрения, так как их роль может быть различной в разных условиях, а также (как мы увидим в последующих главах) у разных организмов.

### Гликоген как форма хранения энергии

Гликоген обычно откладывается главным образом в цитозоле в форме гранул диаметром 100—400 Å, так называемых  $\beta$ -частиц. Именно эта форма гликогена известна большинству студентов;  $\beta$ -частицы встречаются на электронных микрофотографиях самых разнообразных тканей и клеток. Но существует и другая форма — крупные  $\alpha$ -частицы диаметром до 1000 Å. Это, по-видимому, более компактный способ упаковки внутриклеточного гликогена, так как  $\alpha$ -частицы обычно встречаются в тех тканях или органах, где запасы гликогена особенно велики. Например, их постоянно находят в печеночных клетках человека, но они редко встречаются в других его органах. Эта же форма гликогена типична для печени золотой рыбки и черепах, сердечной мышцы тюленя или мышечной ткани двоякодышащих рыб. Для всех этих тканей характерно очень высокое содержание гликогена; например, в печени золотой рыбки концентрация его составляет около 1 М (Hochachka, 1982).

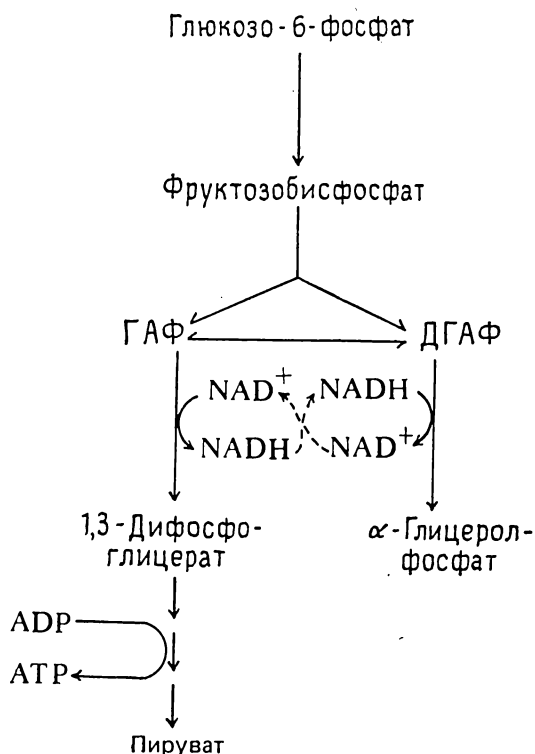
Наряду с  $\beta$ - и  $\alpha$ -частицами встречаются и другие формы — гликогеновые тельца или гликоген-мембранные комплексы. Наиболее изучены гликоген-мембранные комплексы сравнительно активных тканей, таких как сердечная мышца двоякодышащих рыб или глазные мышцы млекопитающих; содержание гликогена и гликолитических ферментов в них необычно велико.

Так как ферменты, участвующие в мобилизации гликогена, и каскад ферментов, регулирующих этот процесс, *in situ* пространственно объединены с гликогеном, естественно предположить, что конкретная форма запасов гликогена, свойственная данной клетке, в значительной мере определяет пути и способы его утилизации. Эти взаимосвязи еще мало изучены, но зато

уже многое известно о другом звене гликолиза — о процессах, приводящих к образованию триозофосфата, которые могут существенным образом видоизменяться при адаптации.

### Роль $\alpha$ -глицеролфосфат-дегидрогеназы

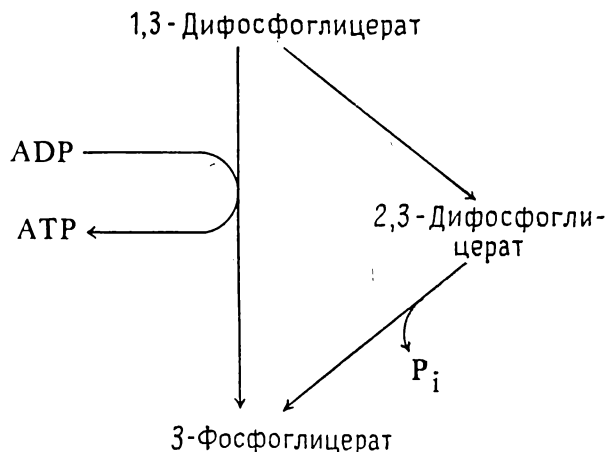
Расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата альдолазой приводит к образованию дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата, который необходим для заключительных этапов гликолиза. Поскольку, однако, в большинстве клеток поддерживается высокое содержание  $\alpha$ -глицеролфосфат-дегидрогеназы ( $\alpha$ -ГФДГ), дигидроксиацетонфосфат превращается с помощью этого фермента в  $\alpha$ -глицеролфосфат, который может затем поступать в глицеролфосфатный цикл или использоваться для биосинтеза триацилглицеролов. Таковы функции  $\alpha$ -ГФДГ в аэробных условиях. В анаэробных же условиях из-за высокой активности  $\alpha$ -ГФДГ (например, в летательных мышцах некоторых насекомых) этот второй путь начинает конкурировать с основным гликолитическим путем:



При этом возникает опасность, что только половина углеродных атомов, входивших в состав глюкозы, будет переходить в пируват с полутным образованием двух молекул АТР. А поскольку на образование одной молекулы фруктозо-1,6-бисфосфата были ранее затрачены две молекулы АТР, то общая эффективность процесса окажется равной нулю. Неудивительно поэтому, что активность  $\alpha$ -ГФДГ регулируется с большой точностью в соответствии с видовыми особенностями организма и потребностями данной ткани — так, чтобы этот фермент мог выполнять свои функции без риска возникновения энергетического «короткого замыкания» (Gurru, Noshachka, 1978).

### Регуляция на уровне фосфоглицератов

Как полагают, зрелый эритроцит млекопитающего полностью удовлетворяет свои ограниченные энергетические нужды за счет анаэробного гликолиза. Особенно интересно то, что и в этой относительно простой системе гликолиз регулируется и модифицируется в соответствии со специфическими нуждами клетки. Переключение здесь может происходить на уровне 1,3-дифосфоглицерата, который либо вступает на главный путь гликолиза, либо превращается в 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ):



2,3-ДФГ в эритроцитах млекопитающих влияет на связывание  $O_2$  гемоглобином. Он содержится обычно в достаточно высокой концентрации (около 6 мкмоль на 1 мл цельной крови), которая регулируется как на уровне синтеза этого вещества (изменение доли углеродных атомов, отвлекаемых с главного пути гликолиза), так и путем изменения скорости его расщепления до 3-фос-

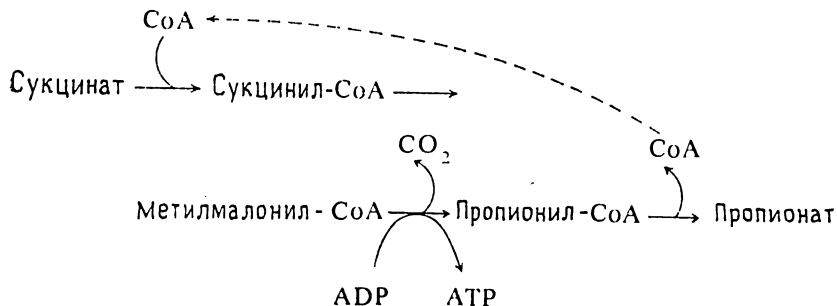
фоглицерата. Последний оказывается опять на главном пути и метаболизируется далее обычным образом.

Очевидно, что образование 2,3-ДФГ идет в обход фосфоглицераткиназного этапа, приводящего к образованию АТР. Следовательно, клетке приходится расплачиваться за это отклонение от главного пути гликолиза: при образовании одного моля 2,3-ДФГ из одного моля глюкозы синтез АТР (энергетический выход гликолиза) снижается с двух до одного моля на моль глюкозы. Однако такие потери энергии имеют место лишь при значительном повышении концентрации 2,3-ДФГ, в стационарных же условиях обходный путь может и не сказываться на энергетическом выходе гликолиза.

### Регуляция на уровне фосфоенолпирувата

У многих беспозвоночных (гельминтов, аннелид, морских двустворчатых моллюсков) классический путь гликолиза существенно видоизменен на уровне фосфоенолпирувата, который может либо карбоксилироваться с образованием оксалоацетата, либо превращаться в пируват (см. рис. 2-2). Образующийся оксалоацетат часто восстанавливается до сукцината, который в анаэробных условиях может накапливаться как конечный продукт. В некоторых случаях оксалоацетат образуется также из аспартата и при определенных окислительно-восстановительных условиях окисляется вместе с глюкозой (Ночачка, 1980). При таких условиях распад как глюкозы, так и аспартата приводит к накоплению сукцината. Такой принцип параллельного сбраживания углеводов и аминокислот реализуется у представителей весьма различных групп животных.

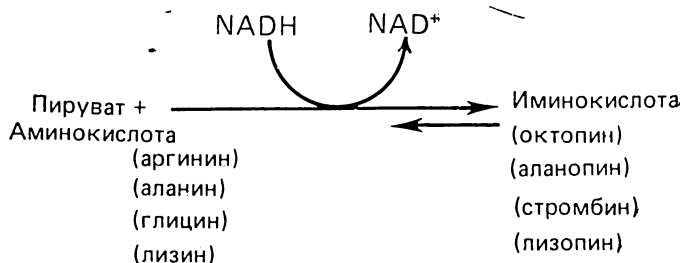
У некоторых организмов (гельминтов, например *Fasciola*; аннелид, например *Arenicola*) сукцинат может затем превращаться в пропионат. Этот путь образования пропионата в настоящее время изучается. У гельминтов и двустворчатых моллюсков превращение сукцината в пропионат происходит, вероятно, по следующей схеме (De Zwaan, 1983):



Как бы то ни было, важный вывод состоит в том, что начальные этапы расщепления глюкозы у этих организмов соответствуют классической схеме гликолиза, но на уровне фосфоенолпирувата углерод может переключаться на путь образования сукцината или даже пропионата. Осуществление такой последовательности реакций (глюкоза → пропионат) повышает выход АТФ с двух до шести молей в пересчете на моль глюкозы (Ночачка, 1982; De Zwaan, 1983).

### Регуляция на уровне пирувата

Разнообразные модификации гликолитического пути встречаются и на заключительных его этапах (см. рис. 2-2). Как уже говорилось, при обычном гликолизе пируват служит акцептором водорода и восстанавливается до лактата; смысл этой реакции в поддержании окислительно-восстановительного потенциала, необходимого для протекания самого гликолиза. Однако у некоторых организмов судьба пирувата может быть иной. Например, он может превращаться в ацетат (у ряда гельминтов) или этанол (что происходит, например, в тканях золотой рыбки и у личинок *Chironomus*) (Shoubridge, Ночачка, 1981); возможно также превращение его в разнообразные аминокислоты (аланопин, стромбин, лизопин, октопин) путем восстановительной конденсации с соответствующей аминокислотой. У беспозвоночных для этого, по-видимому, чаще всего используются аргинин, аланин, глицин и лизин, хотя есть также данные о возможном участии в этих процессах треонина, орнитина и пролина (Storey, Storey, 1983). Все эти реакции можно представить следующим образом:



Реакции такого типа представляют особый интерес, так как это особый случай сопряжения путей распада углеводов и аминокислот у беспозвоночных животных.



### Окислительный метаболизм: центральная роль цикла Кребса

Жизнь большинства животных невозможна в отсутствие кислорода, и поэтому почти все органические субстраты в их организме полностью распадаются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Пируват, образующийся при аэробном расщеплении углеводов, поступает в цикл Кребса в виде ацетил-СоА. Реакция образования этого соединения является ключевой для всего метаболизма, и поэтому активность катализирующего ее фермента — пируватдегидрогеназы — находится под строгим контролем. Она снижается под влиянием ацетил-СоА,  $\text{NADH}$  и  $\text{GTP}$  и возрастает в присутствии  $\text{AMP}$ . Кроме того, она регулируется механизмом фосфорилирования/дефосфорилирования фермента. Фосфорилирование инактивирует его, и этот эффект возрастает при высоком отношении  $\text{ATP} : \text{ADP}$  и  $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ . Пируватдегидрогеназа обеспечивает подключение пути гликолиза к первому участку цикла Кребса (рис. 2-3), где действуют три фермента: цитратсинтаза, аконитаза и изоцитратдегидрогеназа. Последний фермент катализирует образование 2-оксоглутарата, с которого начинается второй участок цикла Кребса — регенерация оксалоацетата из 2-оксоглутарата (через сукцинил-СоА, сукцинат, фумарат и малат). На этом участке действуют 2-оксоглутаратдегидрогеназа, сукцинат-тиокиназа, сукцинатдегидрогеназа, фумараза и малатдегидрогеназа (рис. 2-3).

Цикл Кребса занимает центральное место в метаболизме клетки, так как в нем завершаются процессы полного окисления углеводов, белков и жиров. Мы уже говорили о включении пирувата, образующегося из глюкозы, в цикл Кребса в форме ацетил-СоА. При окислении жирных кислот тоже образуется ацетил-СоА, который поступает в цикл Кребса в начале его первого участка для полного окисления. Поскольку клетка располагает двумя источниками образования ацетил-СоА — глюкозой и жирными кислотами, очевидно, что они могут конкурировать между собой за подключение к циклу Кребса; поэтому обычно существуют антагонистические отношения между катаболизмом глюкозы и окислением жирных кислот.

#### Полное окисление жиров начинается в цитозоле

Катаболизм липидов в клетке (рис. 2-4) начинается с экзогенных свободных жирных кислот или с эндогенных триацилглицеролов (триглицеридов). Хотя у млекопитающих большинство тканей (за исключением мозга) способно к мобилизации триацилглицеролов, главным депо липидов служит жировая ткань, которая в экстремальных условиях (продолжительное го-

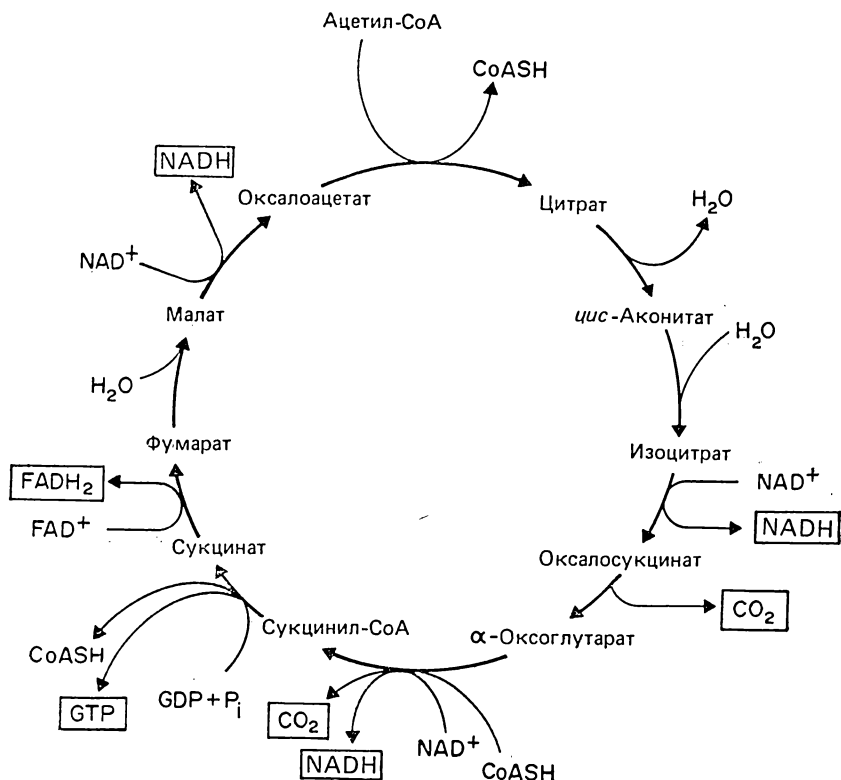


Рис. 2-3. Цикл Кребса, занимающий центральное положение в метаболизме клетки.

лодание или длительная работа без отдыха) удовлетворяет практически всю потребность организма в жирных кислотах. Так же как и при мобилизации гликогена, в процессе расщепления триацилглицеролов ключевую стратегическую позицию занимает первый фермент данного пути. Поэтому триацилглицероллипазы, особенно в жировых депо, находятся под строгим контролем (рис. 2-4); как сейчас полагают, регуляция этих ферментов осуществляется с помощью каскада реакций фосфорилирования и дефосфорилирования, сходного с механизмом регуляции гликогенфосфорилазы (детальное описание см. Steinberg, Khoo, 1977).

В результате полного гидролиза триацилглицеролов образуются глицерол и свободные жирные кислоты. Глицерол затем либо выводится из клетки для использования в другом месте

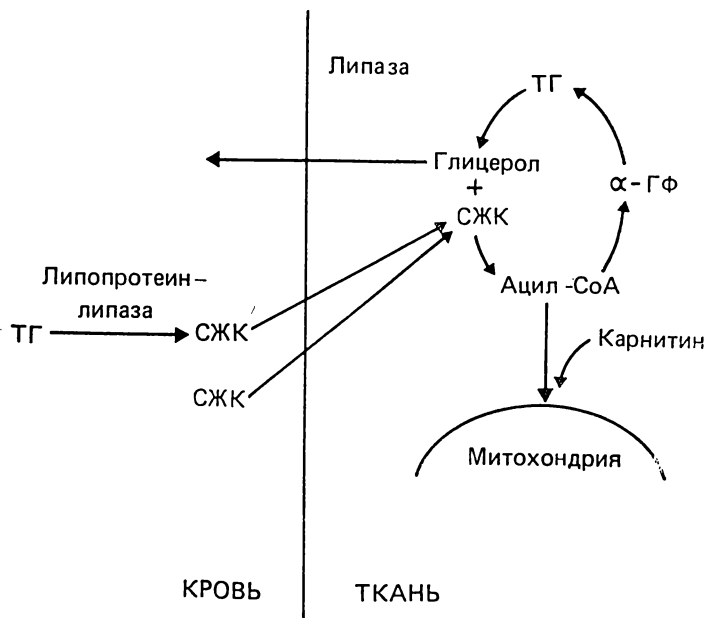
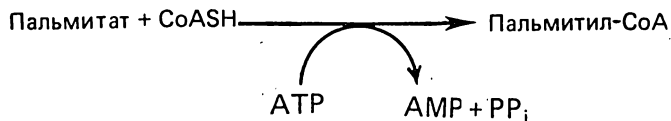


Рис. 2-4. Главные источники ацил-СоА с длинной цепью для  $\beta$ -окисления в митохондриях (упрощенная схема). ТГ — триацилглицеролы; СЖК — свободные жирные кислоты.

(например, в печени), либо метаболизируется *in situ* (обычно в процессах гликолиза или глюконеогенеза). Свободные жирные кислоты — второй продукт гидролиза триацилглицеролов — служат главным «топливом», используемым при распаде липидов.

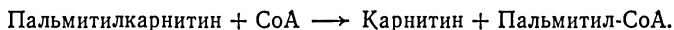
Интересно, что в свободном виде жирные кислоты не катаболизируются. Их распад начинается с активации — процесса, в котором они превращаются в ацилпроизводные СоА при участии фермента ацил-СоА-синтетазы. Приведем в качестве примера схему активации пальмитата:



Активация жирных кислот происходит в цитозоле; образующиеся при этом ацилпроизводные СоА должны быть транспортированы **внутри** митохондрий, где они расщепляются в процессе  $\beta$ -окисления.

Механизм переноса ацил-СоА через внутреннюю мембрану митохондрий до сих пор полностью не выяснен, хотя известно, что он происходит только в присутствии карнитина. Данные, полученные в последние годы, говорят в пользу того, что он осуществляется в процессе обменной диффузии при участии транслоказы (Vary et al., 1981). В межмембранном пространстве митохондрий ацил-СоА взаимодействует с карнитином в реакции, катализируемой карнитин-ацилтрансферазой I, и образующийся ацилкарнитин транспортируется через внутреннюю митохондриальную мембрану в обмен на карнитин. Оказавшись на внутренней стороне этой мембраны, ацилкарнитин распадается на карнитин и ацил-СоА при участии другого фермента — карнитин-ацилтрансферазы II. Освободившийся карнитин может вновь участвовать в переносе ацильных групп.

Таким образом, карнитинтрансферазы играют ключевую роль в катаболизме жирных кислот. Из них лучше всего изучены карнитин-пальмитилтрансферазы (КПТ), которые известны в двух различных формах. Первая из них, КПТ I, по-видимому, находится на наружной поверхности внутренней мембраны митохондрий и катализирует легко обратимую реакцию. Вторым ферментом, КПТ II, располагаясь на внутренней стороне той же мембраны и обычно участвует в реакции образования ацил-СоА с длинной цепью, например:



Этим завершается перенос ацильных групп в митохондрию, и теперь они могут быть подвергнуты  $\beta$ -окислению.

### Спираль $\beta$ -окисления

В митохондриях млекопитающих окисление жирных кислот осуществляется почти исключительно по так называемой спирали  $\beta$ -окисления. На каждом ее витке от карбоксильного конца молекулы отщепляется в форме ацетил-СоА по два углеродных атома. Как полагают, этот процесс состоит из четырех этапов:

1. Ацил-СоА +  $\text{FAD}^+$   $\longrightarrow$   $\alpha, \beta$ -Ненасыщенный ацил-СоА +  $\text{FADH}_2$ .
2.  $\alpha, \beta$ -Ненасыщенный ацил-СоА +  $\text{H}_2\text{O}$   $\longrightarrow$   $\beta$  Гидроксиацил-СоА.
3.  $\beta$ -Гидроксиацил-СоА +  $\text{NAD}^+$   $\longrightarrow$   $\beta$ -Оксоацил-СоА +  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .
4. Оксоацил-СоА +  $\text{CoASH}$   $\longrightarrow$  Ацил-СоА ( $-2$  атома углерода) + Ацетил-СоА.

Активность ферментов, катализирующих  $\beta$ -окисление, в скелетной мышце и печени крысы примерно на порядок выше активности ацил-СоА-синтетазы и карнитин-ацилтрансферазы I; поэтому скорость  $\beta$ -окисления лимитируется скоростью образования ацил-СоА.

При расщеплении пальмитилкарнитина в митохондриях печени крысы должно образовываться 27 промежуточных соединений, однако практически удается обнаружить только ряд ацилпроизводных CoA с различной длиной углеродной цепи (C-14, C-12, C-10, C-8); однако и они не накапливаются, так как каждый из них после завершения одного из витков спирали  $\beta$ -окисления сразу включается в последующий. Другие промежуточные продукты (ненасыщенные ацил-CoA и 3-гидроксиацилпроизводные) удается выявить, лишь ингибировав предварительно окисление NADH (например, ротеноном). Эти наблюдения позволяют предполагать, что относительная активность различных ферментов, участвующих в  $\beta$ -окислении, регулируется достаточно тщательно.

Как показали недавние исследования, проведенные на интактном сердце, процесс  $\beta$ -окисления регулируется на уровне реакций, катализируемых FAD<sup>+</sup>-зависимой и NAD<sup>+</sup>-зависимой дегидрогеназами; из них более важны в регуляторном отношении реакции, идущие с участием NAD<sup>+</sup> (Vary et al., 1981).

### **Белки и аминокислоты как потенциальные источники энергии**

Организм может катаболизировать белки и аминокислоты, поступающие из двух источников: во-первых, это белки пищи, которые гидролизуются до аминокислот при переваривании; во-вторых, это клеточные белки, тоже непрерывно подвергающиеся расщеплению до аминокислот, которые смешиваются с аминокислотами пищевого происхождения. Так создается общий аминокислотный пул, доступный (через посредство крови) для всех тканей. В условиях достаточного питания содержание белков в растущем (взрослом) организме поддерживается на постоянном уровне, поэтому избыток аминокислот примерно равен тому их количеству, которое поступает с пищей, и эта часть аминокислот распадается. Однако при недостатке пищи источником энергии и углерода могут служить и собственные белки организма. В экстремальных условиях они могут оказаться даже единственным источником энергии.

### **Гидролиз белка**

Насколько нам сегодня известно, в организме нет каких-либо специальных запасных форм белка, служащих источником энергии. Организм может использовать с этой целью любые клеточные белки (что отличает белковый метаболизм от углеводного и липидного). Протеолитические ферменты, вызывающие гидролиз белка, находятся главным образом во внутриклеточных ор-

ганеллах, называемых лизосомами (эти органеллы содержат и ряд других гидролитических ферментов); только в некоторых тканях (например, мышцах) имеются внеклеточные протеазы, обладающие несколько большей субстратной специфичностью.

Протеолитические ферменты действуют на первом ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, и в этом отношении роль их в клеточном метаболизме аналогична роли гликогенфосфорилазы в расщеплении гликогена и триацилглицероллипазы в мобилизации жиров. В отличие от двух последних ферментов, активность которых строго регулируется реакциями фосфорилирования и дефосфорилирования, протеазы, по-видимому, не находятся под столь строгим контролем. Впрочем, исследования в этом направлении продвигаются очень быстро, и не исключено, что такого рода механизмы еще будут обнаружены. Однако было бы неверно думать, что протеолитические процессы вообще не регулируются. Как уже упоминалось, важную роль в протеолизе играют лизосомы. Этот процесс регулируется в основном путем изменения количества лизосомных ферментов (что требует значительных затрат времени). Внелизосомный протеолиз служит, как правило, для разрушения аномальных белков, которые расщепляются гораздо быстрее, чем нормальные.

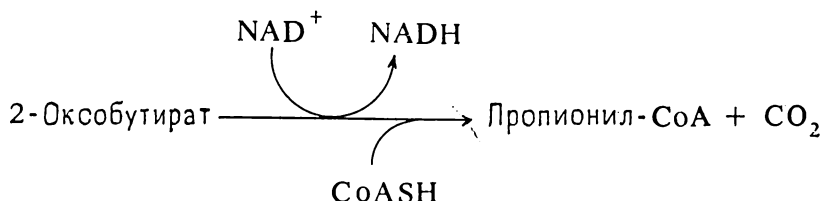
При гидролитическом расщеплении белков обычно образуется около двадцати различных аминокислот, поэтому дать полное описание процессов их последующего метаболизма гораздо труднее, чем описать обмен глюкозы или жиров. И тем не менее нужно подавить в себе желание обойти этот вопрос стороной и пойти дальше, так как расщепление аминокислот для многих организмов имеет не менее фундаментальное значение, чем метаболизм любых других субстратов. Нередко именно обмен аминокислот оказывается главным (или единственным) процессом, поддерживающим жизнедеятельность. Поэтому очень важно разобраться в судьбе этих продуктов белкового гидролиза.

### Дезаминирование и трансаминирование

Метаболизм многих аминокислот начинается с отщепления азота. Дальнейшая судьба азотсодержащей группы уже не связана с превращениями углеродного скелета аминокислоты. Избыточный азот в конце концов выводится из организма в составе какого-либо конечного продукта. У некоторых организмов таким продуктом является  $\text{NH}_4^+$  — одно из самых простых азотсодержащих соединений у животных. У млекопитающих избыточный азот в основном включается в молекулу глутамина. В этой форме он может храниться некоторое время «про запас» или переноситься к местам последующего использования. Азот выводится из организма млекопитающих в виде мочевины или производных

мочевой кислоты. Накопление азотистых конечных продуктов обмена создает для клетки потенциальную опасность, и поэтому в процессе эволюции выработался ряд механизмов, спасающих клетку от этих «загрязнений».

Известны два основных механизма отщепления аминокруппы от аминокислоты. В одном из них (реакции прямого дезаминирования) непосредственное отщепление аминокруппы приводит к образованию свободного  $\text{NH}_4^+$  и соответствующей оксокислоты. В живых организмах в реакции прямого дезаминирования вступают только две аминокислоты — серин и треонин; при этом образуются соответственно пируват и 2-оксобутират. Пируват поступает в цикл Кребса в результате реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой (ПДГ), а 2-оксобутират превращается в пропионил-СоА (эта реакция аналогична реакции с участием ПДГ):

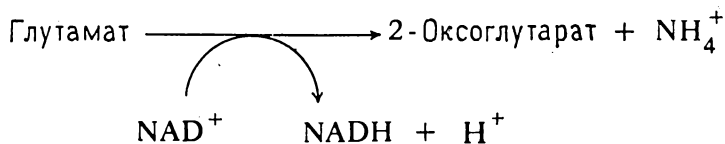


Пропионил-СоА может поступать в цикл Кребса, превращаясь в сукцинил-СоА.

Гораздо чаще отщепление аминокрупп происходит в реакциях трансаминирования. При этом аминокруппа переносится на оксокислоту, что приводит к образованию новой аминокислоты, обычно глутамата. В свою очередь глутамат может быть окислен с образованием  $\text{NH}_4^+$  и оксокислоты, которая может в дальнейшем вступить в цикл Кребса, где произойдет ее дальнейшее расщепление.

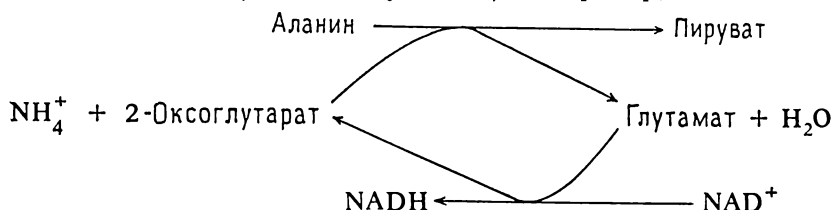
#### Трансаминазы и глутаматдегидрогеназы

Окислительное дезаминирование глутамата катализирует глутаматдегидрогеназа — фермент, локализованный в митохондриях:



Реакции трансаминирования приводят к определенному равновесию между глутаматом и другими аминокислотами; в поддер-

жании этого равновесия участвует ряд ферментов, каждый из которых способен дезаминировать лишь одну из аминокислот или небольшое их число. Важная особенность такой взаимосвязи реакций, катализируемых глутаматдегидрогеназой и трансаминазами, состоит в том, что все идет так, как если бы в них участвовали только дегидрогеназы, строго специфичные для других аминокислот (помимо глутамата). Например, для аланина:

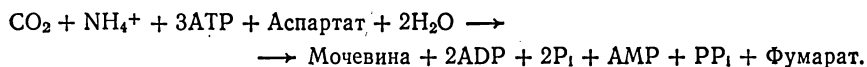


Трансаминаза и глутаматдегидрогеназа совместно вызывают такой же эффект, какой вызывала бы специфическая аланиндегидрогеназа, поскольку уравнение суммарной реакции отражает лишь исчезновение аланина и  $\text{NAD}^+$  с образованием пирувата,  $\text{NADH}$  и  $\text{NH}_4^+$ .

### Судьба аммиака

Хотя  $\text{NH}_4^+$ , образующийся при распаде аминокислот, может быть в какой-то мере использован организмом для синтеза азотсодержащих соединений, большая его часть в конечном итоге выделяется в виде того или иного азотистого продукта. В организме большинства наземных позвоночных избыток  $\text{NH}_4^+$  превращается для экскреции в мочевину; у птиц и рептилий из него образуется мочевая кислота, которая и выводится из организма; многие водные животные экскретируют непосредственно  $\text{NH}_4^+$ . По указанному признаку позвоночных подразделяют соответственно на *уреотелические*, *урикотелические* и *аммонотелические* формы. У наземных позвоночных мочевина синтезируется в цикле мочевины. Один из атомов в синтезированной молекуле мочевины принадлежал ранее аммиаку, второй — аспартату, а атом углерода входил в состав  $\text{CO}_2$ . Переносчиком всех этих атомов азота и углерода в цикле мочевины служит орнитин (рис. 2-5).

Суммарное уравнение реакций синтеза мочевины можно записать так:



Образующийся пиродифосфат быстро гидролизуется, так что фактически на синтез одной молекулы мочевины расходуется четыре



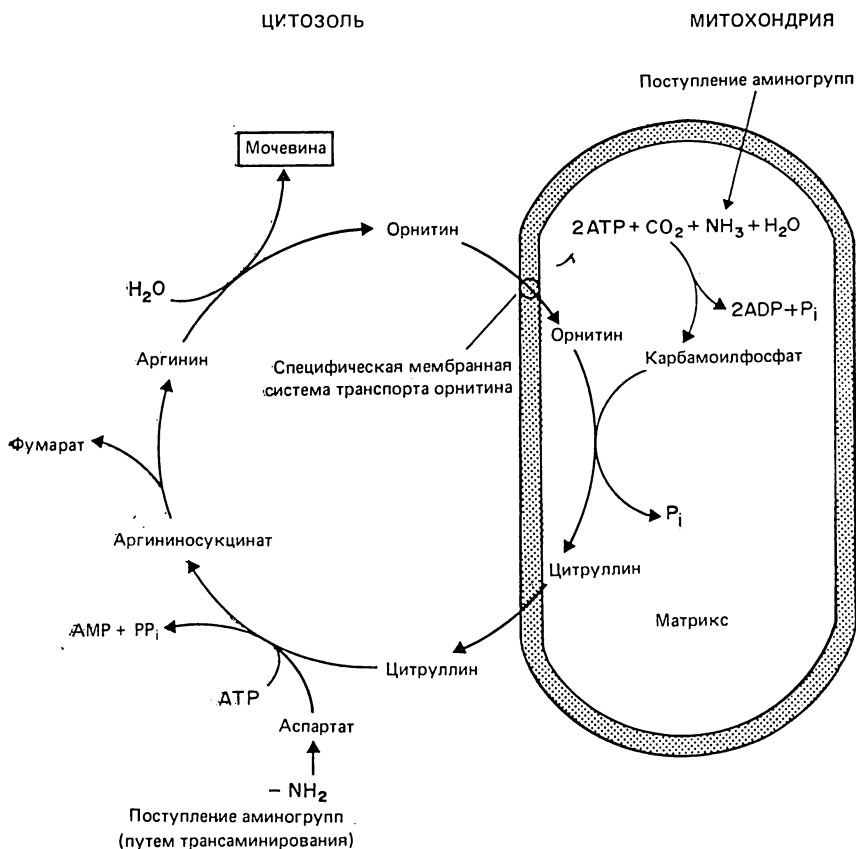


Рис. 2-5. Цикл мочевины. Распределение реакций между цитозолем и митохондриями.

высокоэнергетические фосфатные связи — такова цена обезвреживания аммиака для уреотелических организмов. Однако, судя по тому, насколько широко распространен в животном царстве такой способ удаления аммиака, эта цена, видимо, приемлема.

#### Филогенез цикла мочевины

Цикл мочевины, несомненно, сложился еще на ранних этапах эволюции многоклеточных животных. Уже некоторые наземные плоские черви выделяют избыточный азот в форме мочевины, что можно рассматривать как адаптивную реакцию на недостаток воды. По-видимому, этим же обусловлена и экскреция мочевины у позвоночных. Рыбы используют различные способы

выведения аммиака. Например, у пластиножаберных мочевины накапливается в больших количествах в жидкостях тела и служит для целей осморегуляции. Костистые же рыбы в основном относятся к аммонiotелическим организмам.

Интересно отметить, что костистые рыбы — предки наземных позвоночных. — скорее всего были уреотелическими. Наиболее близкие к ним современные южноамериканские и африканские двоякодышащие рыбы и *Latimeria* (целакант) тоже используют уреотелический способ выведения аммиака. В связи с этим естественно предположить, что ферменты цикла мочевины уже были у прямых предков примитивных земноводных еще до того, как они приспособились к жизни на суше.

После выхода на сушу произошла дивергенция механизмов переработки и выведения избыточного азота у разных групп позвоночных. Хотя первые рептилии использовали уреотелический способ выведения аммиака, для большинства современных пресмыкающихся (и птиц) характерна урикотелия (выделение мочевой кислоты). Однако и у сумчатых, и у плацентарных млекопитающих сохранилась уреотелия.

Любая конкретная форма экскреции избыточного азота, свойственная тому или иному организму, может служить примером биохимической адаптации к окружающим условиям, особенно к степени доступности воды, которая могла бы вымывать конечные продукты. Вероятно, наиболее яркий пример этого — двоякодышащие рыбы и некоторые земноводные, приспособленные на разных стадиях к жизни в воде и на суше. Переход от водного образа жизни к наземному сопровождается у них заменой аммонiotелии на уреотелию, что превосходно иллюстрирует одну из главных стратегий биохимической адаптации — образование в ответ на изменение условий среды новых типов ферментов, способствующих выживанию организма и освоению им нового жизненного пространства.

### Судьба углеродного скелета аминокислот

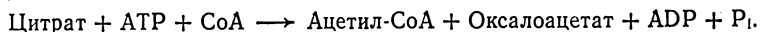
С функциональной точки зрения процесс деградации аминокислот сводится в основном к распаду их углеродного скелета; освобождающаяся при этом энергия запасается в форме АТФ благодаря участию митохондриальной цепи переноса электронов. При гидролизе белков (в отличие от сахаров и жиров) образуется набор разнообразных аминокислот, которые поступают в цикл Кребса на том или ином его этапе и подвергаются полному окислению. Углеродные фрагменты некоторых из них, например лейцина, вступают в этот цикл в форме ацетил-СоА; другие, например продукты превращения аспартата, включаются на уровне реакции, катализируемой малатдегидрогеназой. Глу-

тама, пролин, аргинин и орнитин предварительно превращаются в оксоглутарат. Наконец, углеродный скелет аминокислот с разветвленной цепью поступает в цикл Кребса на уровне сукцинил-СоА (рис. 2-6). Таким образом, метаболизм белков у животных (после образования свободных аминокислот) — процесс достаточно сложный, полная картина которого только сейчас выясняется.

У млекопитающих, например, распад углеродных скелетов аминокислот начинается в печени (исключение составляют аминокислоты с разветвленной цепью, аланин и глутамат, которые могут расщепляться и в других тканях). Однако окислительные возможности печени весьма ограничены, и здесь происходит в основном превращение углеродных скелетов аминокислот в глюкозу, жирные кислоты или кетонные тела (ацетоацетат и 3-гидроксibuтират). Таким образом, в печени из аминокислот образуются более «стандартные» виды топлива, которые могут использоваться другими тканями и органами в соответствии с их потребностями. Многим беспозвоночным и низшим позвоночным свойственна иная организация аминокислотного обмена — для них более характерны прямые пути утилизации аминокислот. Процессы расщепления той или иной аминокислоты довольно однотипны у разных видов и не зависят от органа или ткани. В последующих главах мы будем возвращаться к этому вопросу.

### Участие промежуточных продуктов цикла Кребса в катаболических и анаболических процессах

Цикл Кребса выполняет, как уже отмечалось, две функции, участвуя как в катаболизме веществ, так и в образовании различных предшественников, необходимых для процессов анаболизма. В частности, два промежуточных продукта этого цикла — 2-оксоглутарат и оксалоацетат — служат соответственно предшественниками глутамата и аспартата, которые образуются из них путем трансаминирования. Цитрат тоже может выводиться из цикла Кребса и использоваться для синтеза митохондриального ацетил-СоА (материала для построения жирных кислот) при участии АТР-цитрат-лиазы:



Сукцинил-СоА тоже может выводиться из цикла Кребса и затем использоваться в биосинтезе гема. Таким образом, в случае интенсивного отбора промежуточных продуктов цикла Кребса для нужд анаболизма (блок II) их могло бы не хватать для выполнения циклом его энергетических функций. Эта проблема разрешается благодаря анаплеротическим реакциям — процессам, восполняющим убыль интермедиатов.

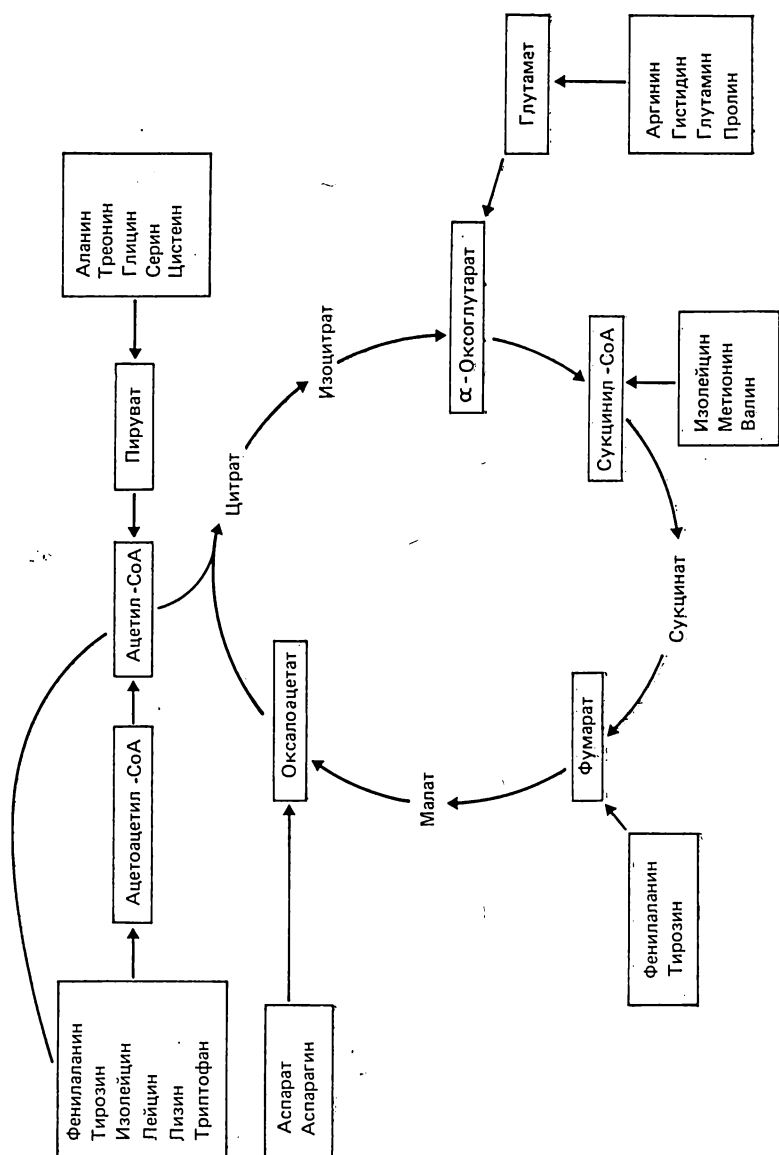
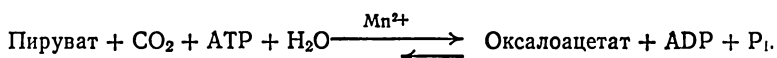


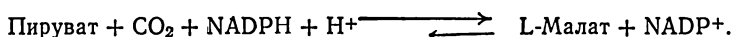
Рис. 2-6. Места вхождения свободных аминокислот в цикл Кребса.

## Восполнение убыли промежуточных продуктов цикла Кребса

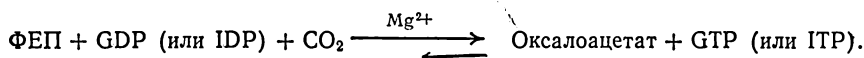
Анаплеротическими называют такие реакции цикла Кребса, которые вводят в него дополнительные атомы углерода; обычно это одноэтапные ферментативные процессы. Важнейшую из таких реакций в печени и почках млекопитающих катализирует митохондриальный фермент пируваткарбоксилаза:



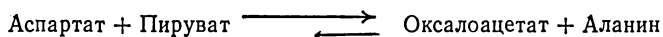
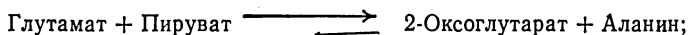
Известны и другие реакции, служащие для пополнения цикла Кребса промежуточными продуктами. К ним относятся, в частности, карбоксилирование пирувата при участии яблочного фермента:



и (особенно у беспозвоночных) карбоксилирование фосфоенолпирувата (ФЕП), катализируемое ФЕП-карбоксикиназой:



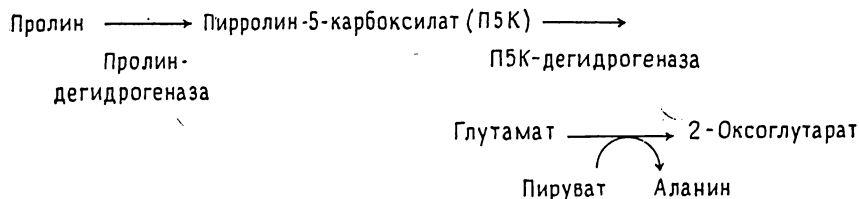
Промежуточные продукты цикла могут также образовываться из аспартата и глутамата в результате их превращения (при участии аминотрансфераз) соответственно в оксалоацетат и 2-оксоглутарат:



NADP<sup>+</sup>-зависимая изоцитратдегидрогеназа, катализирующая карбоксилирование 2-оксоглутарата, строго говоря, не является ферментом цикла Кребса (в отличие от ее NAD<sup>+</sup>-зависимого аналога). Однако она иногда используется в реакциях образования NADPH, необходимого для биосинтеза жиров. Источником углерода для этой реакции обычно служит глутамат; трансаминирование его приводит к образованию 2-оксоглутарата, который и подвергается декарбоксилированию. При этом наряду с NADPH образуется изоцитрат, что способствует увеличению пула промежуточных продуктов цикла Кребса.

В принципе любые метаболиты, способные превращаться в промежуточные продукты цикла Кребса, могут быть использованы для увеличения (или восполнения убыли) общего пула этих продуктов. Кроме перечисленных выше реакций упомянем еще об одном способе пополнения этого пула, используемом,

например, в летательных мышцах мясной мухи. В этом случае в цикл Кребса включается пролин:



Можно видеть, что углеродные атомы пролина переходят в 2-оксоглутарат и другие промежуточные продукты цикла Кребса, тогда как азот включается в аланин (Weeda et al., 1980). В мышцах млекопитающих пополнение цикла Кребса может также происходить за счет использования аминокислот с разветвленной цепью (см. рис. 2-6).

### Реакции декарбоксилирования, сопряженные с переносом электронов на $\text{NAD}^+$ или $\text{FAD}^+$

Независимо от природы исходных субстратов, окисляемых в цикле Кребса, только в двух его реакциях происходит образование  $\text{CO}_2$ . Одну из них катализирует изоцитратдегидрогеназа, другую — 2-оксоглутаратдегидрогеназа. При полном расщеплении жирных кислот это единственные реакции, приводящие к освобождению  $\text{CO}_2$ . При распаде глюкозы  $\text{CO}_2$  образуется еще и в цепи реакций, катализируемых пируватдегидрогеназой. В аналогичных реакциях, идущих с участием соответствующих дегидрогеназ, происходит отщепление  $\text{CO}_2$  от оксокислот, образующихся из некоторых аминокислот, в частности лейцина, изолейцина, валина и треонина. Кроме того, при полном расщеплении ряда важных аминокислот (пролина, глутамата, аргинина и орнитина) происходит декарбоксилирование на уровне яблочного фермента (который может быть  $\text{NAD}^+$ - или  $\text{NADP}^+$ -зависимым).

Практически во всех этих реакциях осуществляется перенос электронов и протонов на молекулы  $\text{NAD}^+$  или  $\text{FAD}^+$ ; окисление этих восстановленных форм коферментов (связанное с переносом электронов и протонов на  $\text{O}_2$ ) сопряжено с образованием АТФ. Из этого следует очень важный вывод: почти все процессы окислительного метаболизма (включая собственно цикл Кребса и ведущие к нему пути) не требуют присутствия кислорода и непосредственно не приводят к образованию макроэргических связей, если не считать единственной молекулы АТФ, которая образуется в реакции субстратного фосфорилирования, катализируемой сукцинил-СоА-синтетазой.

## Типы ферментов — переносчиков электронов

Из сказанного выше очевидно, что животные клетки должны содержать по меньшей мере два типа ферментов, переносящих электроны с органических субстратов на  $O_2$ : 1) пиридиннуклеотид-зависимые дегидрогеназы, использующие в качестве кофермента  $NAD^+$  или  $NADP^+$ , и 2) флавиннуклеотид-зависимые дегидрогеназы, простетические группы которых представлены флавин-адениндинуклеотидом ( $FAD^+$ ) или флавиномононуклеотидом (FMN). Роль этих двух типов ферментов — переносчиков электронов — в клеточном метаболизме необычайно велика, так как они «стыкуют» между собой метаболические процессы генерации электронов с системой, обеспечивающей перенос этих электронов на  $O_2$ . Заключительные этапы митохондриального транспорта электронов идут также с участием растворимого в липидах кофермента Q (убихинона) и цитохромов — белков, простетическая группа которых представлена железопорфиринами.

Таким образом,  $NADH$  и  $FADH_2$  служат главными посредниками между основными путями катаболизма и ферментами, находящимися во внутренней мембране митохондрий, которые переносят электроны и протоны к молекулярному кислороду, восстанавливая его при этом до воды. Этот процесс называется дыханием, а комплекс ферментов — переносчиков электронов (локализованный во внутренней мембране митохондрий) получил наименование дыхательного ансамбля или электрон-транспортной цепи.

## Дыхательная цепь в митохондриях млекопитающих

Полная последовательность реакций электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), начиная от  $NADH$  и кончая  $O_2$ , которая сегодня уже достаточно хорошо изучена, представлена на рис. 2-7. Электроны от различных субстратов в ходе окислительно-восстановительных реакций (главным образом в цикле Кребса) передаются  $NAD^+$ , восстанавливая его до  $NADH$ , а затем при участии флавопротеина ( $FP_I$  на рис. 2-7), входящего в состав  $NADH$ -дегидрогеназного комплекса, переносятся в ЭТЦ. В тех случаях, когда окисление субстрата катализирует флавин-зависимая дегидрогеназа (например, сукцинатдегидрогеназа в цикле Кребса или ацил-СоА-дегидрогеназа при окислении жирных кислот), электроны поступают прямо в ЭТЦ на уровне кофермента Q. Места вхождения электронов в ЭТЦ при окислении различных веществ указаны на рис. 2-7 и 2-8. Важно отметить, что от места их поступления в ЭТЦ зависит энергетический выход (в виде

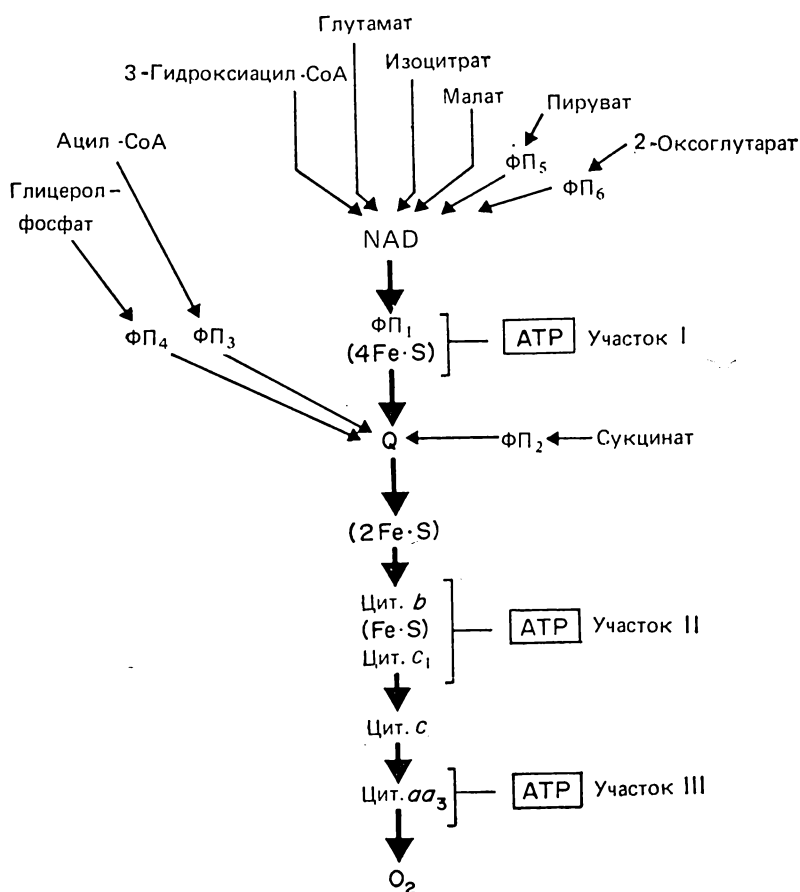


Рис. 2-7. Электрон-транспортная цепь. Указаны три участка генерации АТФ и места поступления электронов и протонов от различных субстратов. (По Lehninger, 1975.) ФП — флавопротеины; Цит. — цитохромы.

молекул АТФ) реакций окисления того или иного субстрата. Электроны, поступающие от NADH, проходят через все те участки ЭТЦ, где может происходить образование АТФ; если же их переносчиком служит FADH<sub>2</sub>, они минуют первый из этих участков. В случае переноса электронов от NADH, находящегося в цитозоле, к ЭТЦ и далее к O<sub>2</sub> возникает затруднение, связанное с тем, что мембрана митохондрий непроницаема для NADH; это затруднение преодолевается с помощью челночных механизмов переноса водорода через мембрану.



## Почему необходимы челночные механизмы переноса водорода?

Митохондриальная мембрана непроницаема для NADH, и поэтому во всех клетках, генерирующих NADH в цитозоле в процессе аэробного гликолиза, должны действовать челночные механизмы, переносящие водород в митохондрии и тем самым обеспечивающие поступление восстановительных эквивалентов в ЭТЦ. В тканях млекопитающих выявлены два таких механизма. Один из них — малат-аспартатный челночный механизм (рис. 2-9) — включает 1) цитозольную и митохондриальную фор-

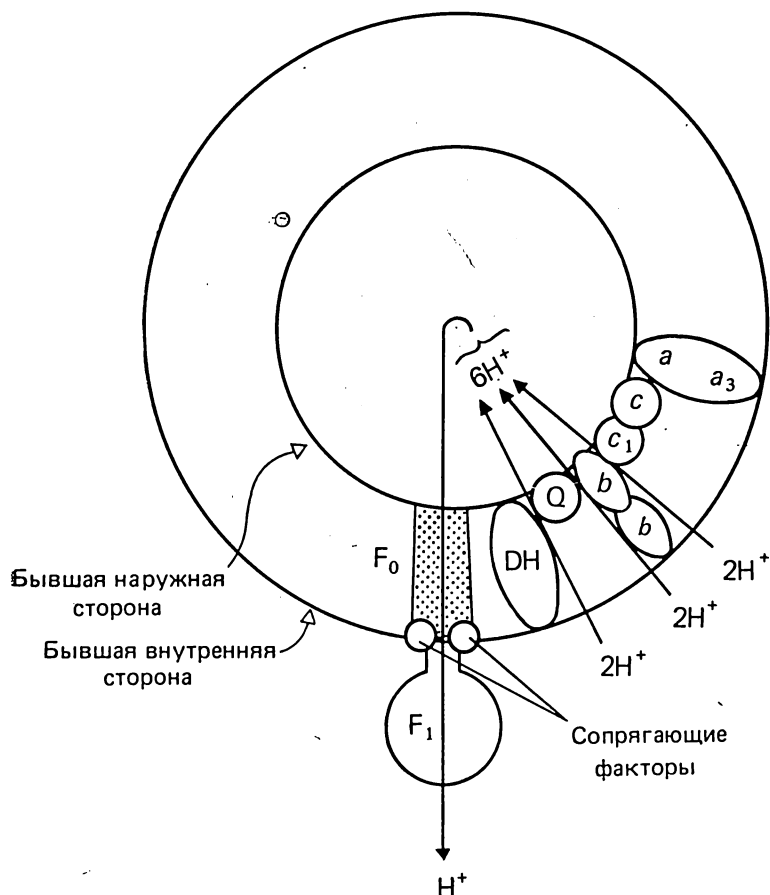


Рис. 2-8. Схема расположения отдельных компонентов электрон-транспортной цепи и АТР-синтезирующей системы в субмитохондриальной частице. (По Alfonzo, Racker, 1979).

мы ферментов аспартат-аминотрансферазы и малатдегидрогеназы и 2) по меньшей мере два мембранных переносчика (один из них переносит внутрь митохондрии малат в обмен на 2-оксоглутарат, а другой — глутамат в обмен на аспартат).

Из новейших экспериментальных данных (см. Williamson et al., 1973) следует, что системы транспорта малата, 2-оксоглутарата и глутамата могут обеспечивать перенос этих соединений в обоих направлениях, не требуя значительных затрат энергии; однако транспорт аспартата осуществляет энергозависимая си-

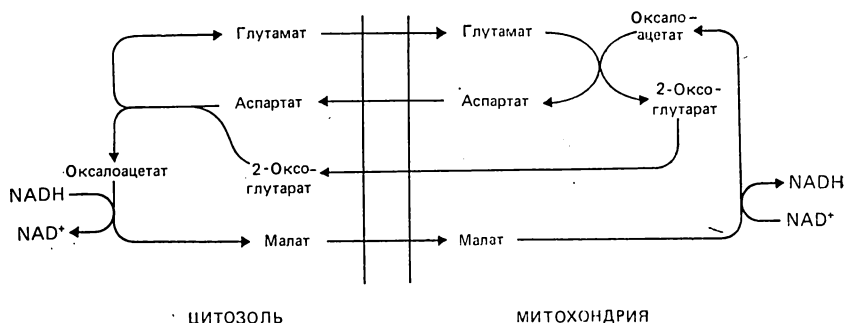


Рис. 2-9. Малат-аспартатный челночный механизм переноса восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрию.

стема, переносящая восстановительные эквиваленты против градиента  $\text{NADH}$ , поскольку соотношение  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  внутри митохондрий сдвинуто в сторону большего содержания восстановленной формы.

Второй механизм переноса водорода  $\text{NADH}$  в митохондрии —  $\alpha$ -глицеролфосфатный цикл — несколько проще малат-аспартатного. В глицеролфосфатном цикле дигидроксиацетонфосфат восстанавливается цитозольным  $\text{NADH}$  до  $\alpha$ -глицеролфосфата ( $\alpha$ -ГФ) в реакции, катализируемой цитозольной  $\alpha$ -глицеролфосфатдегидрогеназой. Окисление  $\alpha$ -глицеролфосфата происходит в присутствии другого фермента —  $\text{FAD}^+$ -зависимой  $\alpha$ -глицеролфосфатоксидазы, находящейся во внутренней мембране митохондрий (рис. 2-10). Перенос электронов на  $\text{O}_2$  в этой системе, так же как и во всех других реакциях, идущих с участием  $\text{FAD}^+$ , осуществляется в обход первого участка ЭТЦ, в котором может происходить генерация АТФ. Таким образом, использование любого из этих челночных механизмов снижает выход молекул АТФ при окислении цитозольного  $\text{NADH}$  по сравнению с окислением митохондриального  $\text{NADH}$ .

### Каким образом перенос электронов на кислород приводит к синтезу АТФ?

Несмотря на почти тридцатилетнее изучение механизмов, благодаря которым часть энергии, высвобождающейся при переносе электронов к  $O_2$ , запасается в форме АТФ, они еще не вполне понятны. По-прежнему обсуждаются три гипотезы: о химическом сопряжении, о конформационном сопряжении и хемиосмотическая гипотеза. Мы не будем рассматривать их сравнительные преимущества, а скажем лишь, что сейчас наибольшую поддержку получила гипотеза хемиосмотического сопряжения, и вкратце изложим ее суть.

До того чтобы ясно понять главные особенности хемиосмотической теории образования АТФ, необходимо осознать следующее: хотя химический смысл процесса окисления заключается в переносе водорода, это не означает, что на всех этапах этого процесса непременно должны транспортироваться полные атомы Н. Согласно обсуждаемой теории, в дыхательной цепи переносчики водорода чередуются с молекулами, переносящими только электроны. Переносчики электронов могут использоваться

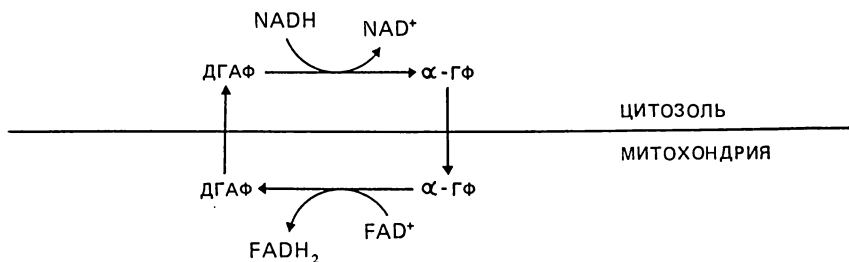


Рис. 2-10.  $\alpha$ -Глицеролфосфатный челночный механизм переноса водорода.

здесь благодаря тому, что протоны (в отличие от электронов) растворимы в воде и в водной фазе клетки. Когда молекула, содержащая целый атом водорода, взаимодействует с другой молекулой, способной принимать только электроны, протон переходит в раствор. А когда переносчик электронов в свою очередь передает электроны переносчику водорода, тот присоединяет к себе протон из окружающей воды, что снова приводит к образованию атома Н.

Согласно современным моделям митохондриального дыхания (рис. 2-11), при переносе каждой пары электронов от NADH на кислород через митохондриальную мембрану выводится наружу шесть протонов. Счет их ведется на пары, поскольку как в самом начале дыхательной цепи (на уровне NADH), так и

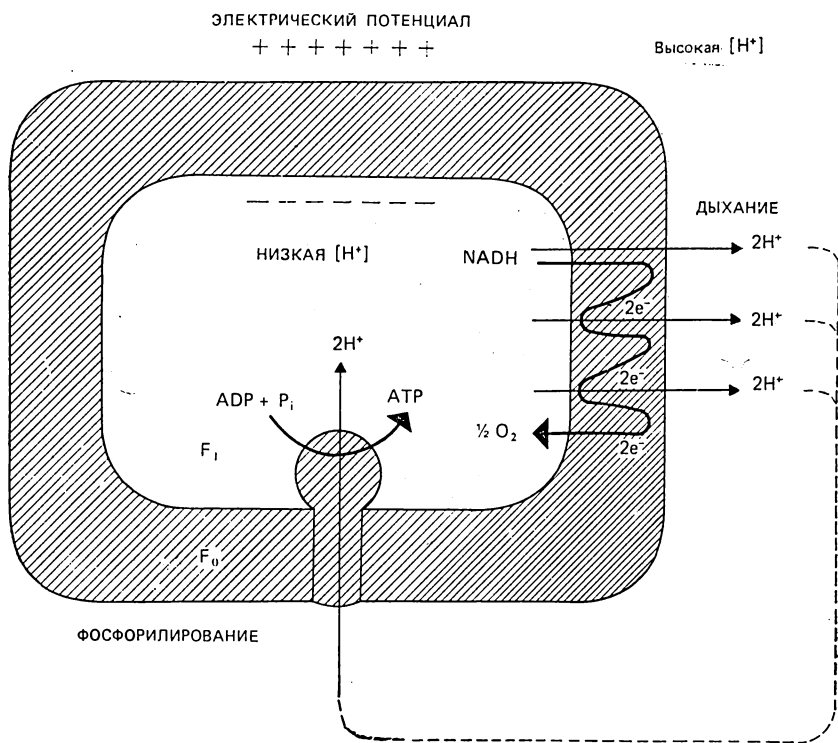


Рис. 2-11. Схема процессов окислительного фосфорилирования согласно хемиосмотической теории,

в ее конце (где они восстанавливают атомы  $O_2$  до  $H_2O$ ) одновременно фигурируют всегда по два электрона. При переносе же электронов внутри дыхательной цепи они могут передаваться по одному или парами в зависимости от природы переносчика.

В итоге всех этих процессов энергия, освобождающаяся при переносе электронов, временно запасается в форме потенциальной энергии протонного градиента. Одна из составляющих этого градиента обусловлена различием в концентрации (или химической активности) протонов по обе стороны митохондриальной мембраны. Когда путь для них через мембрану открыт, протоны диффундируют из области высокой концентрации в область низкой концентрации.

Вторая составляющая протонного градиента обусловлена неравномерным распределением электрических зарядов по обе стороны мембраны. Суммарное перемещение зарядов через мембрану создает трансмембранную разность потенциалов,

и возникает электростатическое поле, действующее на все находящиеся в нем заряженные частицы. Таким образом, общая энергия электрохимического протонного градиента равна сумме энергий концентрационного (или осмотического) и электрического градиентов.

Различия в концентрации протонов и величине электрического потенциала по обе стороны митохондриальной мембраны приводят к тому, что на протон, выведенный наружу, действует сила, стремящаяся возратить его в матрикс. Согласно хемиосмотической теории, перемещение протона под действием этой силы сопряжено с синтезом АТФ (рис. 2-11).

Ферменты, обеспечивающие сопряжение этих двух процессов (обратного тока протонов через мембрану и синтеза АТФ), на электронных микрофотографиях имеют вид сферических выступов на поверхности мембраны. Такой выступ образован растворимым белком (обозначается  $F_1$ ), состоящим из субъединиц пяти типов, представленных одной или несколькими копиями. Белок  $F_1$  прикреплен к мембране с помощью белка  $F_0$ , который встроен в мембрану и, как полагают, пронизывает ее насквозь.  $F_1$  довольно легко отделяется от мембраны — в отличие от  $F_0$ , для выделения которого приходится разрушать мембрану, обрабатывая ее детергентами. Очевидно, именно  $F_0$  играет роль канала, через который протоны проходят к  $F_1$ . Вся эта система ферментов получила название комплекса  $F_0F_1$ .

В митохондриях и бактериальных клетках комплекс  $F_0F_1$ , расположенный на внутренней поверхности мембраны, обращен выступающей «головкой» внутрь. Судя по экспериментальным данным, на каждую пару протонов, прошедших через комплекс внутрь, образуется одна молекула АТФ в результате присоединения неорганического фосфата к АДФ. Существенно то, что эта реакция обратима; при определенных условиях комплекс  $F_0F_1$  расщепляет молекулы АТФ, и выделяющаяся при этом энергия может быть использована для перекачивания протонов из митохондрий или бактериальной клетки наружу. Комплекс  $F_0F_1$ , как и все ферменты, изменяет лишь скорость реакции, а направление ее определяется балансом свободной энергии.

#### Расчет энергетического баланса для процесса окисления глюкозы

Обычно в учебниках биохимии утверждается, что при переносе каждой пары электронов по дыхательной цепи от NADH до  $O_2$  могут синтезироваться три молекулы АТФ. Этому соответствует отношение  $P/O=3$  для окисления NADH и  $P/O=2$  для окисления  $FADH_2$ . В эксперименте значение  $P/O=3$  если и достигается, то крайне редко, в большинстве случаев наблюдае-

мые величины близки к  $P/O=2$ . Однако значение  $P/O=3$  (при окислении NADH) наилучшим образом соответствовало прежним теориям образования АТФ, поэтому в ранних работах более низкие величины обычно объясняли потерями энергии из-за несовершенства методов выделения митохондрий или ошибками эксперимента. Недавно этот вопрос был пересмотрен. Новая концепция состоит в том, что отношение  $P/O$  для любого окисляемого субстрата является мерой затрат клетки на синтез АТФ в митохондриях и на его транспорт из митохондрий к местам потребления против химического градиента. Новые исследования показали, что значения  $P/O$ , предсказанные хемиосмотической теорией и реально наблюдаемые в эксперименте, составляют 2 для субстратов, окисляемых NADH-зависимыми ферментами, и 1,3 для субстратов, в окислении которых участвует  $FADH_2$ . Этот факт имеет принципиальное значение при расчете физиологически значимого энергетического «бюджета» для окисления различных субстратов, поэтому нам нужно рассмотреть этот вопрос подробнее.

Согласно наиболее надежным современным оценкам энергия протонов, пересекающих митохондриальную мембрану, составляет 5,3 ккал/моль, а для образования одной молекулы АТФ в митохондриях требуется всего два протона. Это соответствует выделению свободной энергии, равной 10,6 ккал/моль, чего явно недостаточно для фосфорилирования ADP, так как потенциал фосфорилирования составляет около 15 ккал/моль. В митохондриях эта трудность преодолевается следующим образом: все реакции синтеза АТФ локализованы на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны. Благодаря высокой местной концентрации ADP и  $P_i$  и низкой концентрации АТФ изменение свободной энергии для этой реакции достигает здесь довольно значительной отрицательной величины, что уменьшает потребность в энергии для фосфорилирования. По оценке Хинкля и др. (см., например, Hinkle, 1981), для внутримитохондриального синтеза АТФ необходимо всего 11 ккал/моль, а эта величина уже достаточно хорошо соответствует энергии, получаемой от двух протонов.

Однако такое снижение энергетического «порога» фосфорилирования в митохондриях достигается не без затрат: нужна определенная энергия для концентрирования ADP и  $P_i$  внутри митохондрий и для выведения за пределы митохондрий синтезируемого АТФ. Процесс обменной диффузии ионов  $ATP^{4-}$  и  $ADP^{3-}$  сопровождается суммарным перемещением зарядов через мембрану, поэтому эффективность транспорта этих соединений может быть повышена путем создания соответствующего мембранного потенциала. В то же самое время фосфат ( $P_i$ ) переносится внутрь митохондрий, обмениваясь на ион  $OH^-$ , т. е. за счет

энергии градиента рН. В итоге всех этих процессов происходит перенос еще одного дополнительного протона на каждую молекулу АТФ, синтезированную в митохондрии и транспортированную наружу. Таким образом, общее число протонов на одну молекулу АТФ, выведенную из митохондрии, равно трем, а полная свободная энергия, отдаваемая этими протонами, составляет  $3 \cdot 5,3 = 15,9$  ккал/моль. Вот почему из стехиометрии дыхания и фосфорилирования следует, что Р/О равно 2 для процесса окисления NADH и 1,3 для окисления  $FADH_2$ .

### Выход АТФ при полном окислении глюкозы

Эти новые оценки Р/О приводят к существенно иным цифрам для выхода АТФ на моль исходного окисляемого субстрата; поэтому небесполезно будет сделать такие расчеты для некоторых наиболее распространенных веществ. Например, нетрудно показать, что выход АТФ на 1 моль окисленной глюкозы составляет 25,2 моль:

8 моль NADH, образующиеся в митохондриях на 1 моль глюкозы, дают	$8 \cdot 2 = 16,0$ моль АТФ
2 моль $FADH_2$ , образующиеся в митохондриях на 1 моль глюкозы, дают	$1,3 \cdot 2 = 2,6$ моль АТФ
При участии сукцинаттиокиназы образуется 2 моль GTP (эквивалента АТФ)	Выход эквивалентен 2,0 моль АТФ
2 моль NADH, образующиеся при гликолизе на 1 моль глюкозы, дают	$1,3 \cdot 2 = 2,6$ моль АТФ
В процессе гликолиза на 1 моль глюкозы образуется	2,0 моль АТФ
Общий выход АТФ на 1 моль полностью окисленной глюкозы	25,2 моль
Общий выход АТФ на 1 моль глюкозы, вычисленный из общепринятого значения Р/О	36 моль

### Расчет энергетического баланса для других субстратов

Не менее полезно произвести аналогичные расчеты для полного окисления других субстратов. Например, при полном окислении насыщенной жирной кислоты с 16 углеродными атомами (пальмитата) образуется 91,8 моль АТФ на 1 моль пальмитата:

8 моль NADH, образующиеся при $\beta$ -окислении, дают	$8 \cdot 2 = 16,0$ моль АТФ
--	-----------------------------

8 моль $\text{FADH}_2$ , образующиеся при $\beta$ -окислении, дают	$8 \cdot 1,3 = 10,4$ АТФ	моль
24 моль $\text{NADH}$ , образующиеся в цикле Кребса, дают	$24 \cdot 2 = 48$	моль АТФ
8 моль $\text{FADH}_2$ , образующиеся в цикле Кребса, дают	$8 \cdot 1,3 = 10,4$ АТФ	моль
8 моль $\text{GTP}$ , образующиеся при участии сукцинил- $\text{CoA}$ -синтетазы, дают	8,0 моль АТФ	
На образование пальмитил- $\text{CoA}$ затрачивается	—1,0 моль АТФ	
Общий выход АТФ на 1 моль полностью окисленного пальмитата	91,8 моль	
Общий выход АТФ, вычисленный из общепринятого значения $\text{P/O}$	129 моль	

В связи с неоднозначностью величин  $\text{P/O}$  в дальнейшем мы будем пользоваться общепринятыми значениями этого отношения ( $\text{P/O} = 3$  для окисления с участием  $\text{NADH}$ ), так как это облегчит сопоставление новых данных с результатами прежних работ. Однако при любых значениях  $\text{P/O}$  очевидно, что полезная энергия, получаемая при сгорании моля жиров, значительно выше, чем при сгорании моля глюкозы. Возможно, этот способ сравнения источников энергии не самый удачный, поскольку

Таблица 2-1. Энергетический выход при окислении некоторых распространенных видов субстратов. (По данным McGilvery, 1979, с изменениями.) Расчет произведен исходя из величин  $\text{P/O}$ , равных 3 и 2 (в скобках) для  $\text{NADH}$ -зависимых процессов окисления

Источник энергии	Выход АТФ, моль на 1 кг субстрата	Выход АТФ, моль на 1 моль $\text{O}_2$	ккал/г	(Д. К.) $\text{CO}_2/\text{O}_2$
Крахмал пищи	216 (151)	5,8 (4,2)	4,18	1,0
Жиры пищи	502 (351)	5,5 (4,0)	9,46	0,71
Животные белки пищи	215 (150)	4,8 (3,6)	4,32	0,82
Запасный гликоген мышц	228 (155)	6,2 (4,4)	—	—
Запасные жиры	510 (357)	5,6 (4,0)	—	—

исходные субстраты различаются по молекулярной массе. Выражая выход энергии на единицу массы субстрата, мы получим для крахмала и жиров, поступающих с пищей, что выход АТФ при окислении жиров примерно в 2,3 раза выше, чем при окислении углеводов (табл. 2-1), и это очень хорошо соответствует различиям в калорийности этих продуктов. Вопрос о преимуществах использования жира в качестве субстрата для полу-



чения энергии уже обсуждался ранее (Hochachka, Somero, 1973); здесь же достаточно отметить, что жир является более восстановленным субстратом, чем глюкоза, т. е. на единицу его массы приходится больше электронов и протонов, которые могут быть перенесены на  $O_2$ , и соответственно больше должен быть выход АТФ.

По степени окисления большинство аминокислот, в отличие от жирных кислот, приближается к глюкозе. Ввиду этого, а также в связи с общностью конечного пути окисления этих соединений (см. выше) неудивительно, что выход АТФ при окислении аминокислот и углеводов примерно одинаков. В этом можно убедиться на примере окисления аланина, при котором выделяется 15 моль АТФ, т. е. в пересчете на один моль субстрата ровно столько же, сколько образуется при распаде пирувата (продукта расщепления глюкозы). При окислении глутамата в реакции, катализируемой яблочным ферментом (если принять, что Р/О для процессов окисления NADH и NADPH в дыхательной цепи различаются), выход АТФ составляет 27 моль на 1 моль глутамата. [Согласно Эткинсону (Atkinson, 1977), следует учитывать, что при окислении NADPH выход АТФ выше, чем при окислении NADH. Образование пирувата при окислении глутамата или пролина в принципе может происходить с участием любого из этих коферментов; однако мы предполагаем, что яблочный фермент, катализирующий превращение малат—пируват, является  $NAD^+$ -зависимым.] У многих низших организмов в качестве источника энергии используется пролин. Выход энергии в этом случае определить трудно, так как первый этап окисления пролина может не быть сопряжен с образованием АТФ. В случае сопряжения при участии NADH на 1 моль пролина должно синтезироваться 30 моль АТФ. Такие значения выхода АТФ на 1 моль субстрата согласуются с данными о практически одинаковом выходе энергии на единицу массы окисляемых углеводов и белков, так же как и об одинаковой их калорийности (табл. 2-1).

### Регулируемые компоненты митохондриального метаболизма

Полагают, что существенные черты окислительного метаболизма митохондрий, так же как и гликолиза, филогенетически необычайно древни и весьма консервативны. Такое представление объясняется скорее всего тем, что вначале исследовали очень узкий круг объектов. Однако по мере изучения представителей разных групп животных, обитающих в разных условиях, начинает создаваться впечатление, что многие элементы митохондриального метаболизма должны быть способны к адаптации. Некоторые из таких элементов уже описаны в литературе. Их

адаптация может проявляться 1) в предпочтении тех или иных субстратов, 2) в изменении общей организации процесса и 3) в различных вариациях ферментного аппарата митохондрий у разных животных или в различных тканях и органах. Сравнительный анализ метаболизма различных объектов показывает, что его регулирование и адаптация могут быть связаны с предпочтением определенных субстратов и мест поступления в цикл Кребса или дыхательную цепь. Например, для головного мозга млекопитающих характерна высокая интенсивность окислительных процессов; у человека мозг потребляет до 20% кислорода, поступающего в организм в состоянии покоя. Преобладающим источником энергии в тканях мозга служит глюкоза, и образующийся при ее расщеплении пируват поступает в цикл Кребса на уровне реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой; возможно, это главный или даже единственный источник углерода и энергии для митохондриального метаболизма. Сердечная мышца, напротив, использует самые разнообразные субстраты: прежде всего жирные кислоты, лактат и глюкозу, а также некоторые аминокислоты. В связи с этим главным поставщиком углерода для митохондриального метаболизма здесь обычно служит ацетил-СоА, который образуется в процессе  $\beta$ -окисления; однако в цикле Кребса может также утилизироваться пируват, образующийся при расщеплении лактата или глюкозы.

В мышечных волокнах млекопитающих, способных к быстрым сокращениям (волокна гликолитического типа), интенсивность окислительных процессов относительно низка, а в качестве топлива используется главным образом глюкоза или гликоген. В отличие от этого в «медленных» волокнах (окислительного типа) расщепляются главным образом жирные кислоты, хотя наряду с ними может использоваться и пируват, образующийся из глюкозы. У тунца метаболизм белых и красных мышц в этом отношении разнится еще значительно (Girru et al., 1979). У лососей основным субстратом митохондриального дыхания в белой мускулатуре служит пируват, а также происходят взаимные превращения ряда аминокислот, что особенно характерно для периода нерестовой миграции. В красных же мышцах могут расщепляться либо жирные кислоты, либо аминокислоты, и переключение этих мышц с одного вида топлива на другой четко определен во времени и строго регулируется: на ранних этапах миграции работу красных мышц обеспечивают процессы  $\beta$ -окисления, а на более поздних — расщепление аминокислот (аланина и глутамата) (Mommson et al., 1980).

В митохондриях летательных мышц некоторых насекомых (например, перепончатокрылых) расщепляются преимущественно пируват, образующийся из глюкозы, и  $\alpha$ -глицеролфосфат. У других насекомых (например, у перелетной саранчи) глюкоза

используется только в периоды кратковременных нагрузок, а при длительном полете единственным источником энергии служат жиры. И наконец, у таких насекомых, как муха цеце или жуки-навозники, главным источником энергии *in vivo* служит пролин, и он же предпочтительно используется изолированными митохондриями *in vitro* (Weeda et al., 1980).

Особый интерес представляет окислительный метаболизм морских беспозвоночных, так как у них поддерживается большой внутриклеточный пул аминокислот. У головоногих моллюсков значительная часть этого пула нередко бывает представлена пролином, и именно он используется в периоды активного метаболизма. Неудивительно, что и в процессе дыхания митохондрий, выделенных из сердца этих животных, пролин и орнитин окисляются быстрее всех других субстратов, за исключением пирувата (Mommensen, Hochachka, 1981).

В большинстве рассмотренных выше случаев митохондриального метаболизма места поступления субстратов в цикл Кребса могут быть различными в зависимости от типа ткани. Следует напомнить, что эти вариации иногда могут сочетаться с различиями в участвующих компонентах дыхательной цепи. Например,  $\beta$ -окисление и расщепление  $\alpha$ -глицеролфосфата катализируют разные дегидрогеназы, хотя обе они используют в качестве кофермента  $FAD^+$ . Первый этап окисления пролина в летательных мышцах насекомых идет при участии  $NAD^+$ -зависимого фермента, в то время как в митохондриях млекопитающих и кальмара соответствующая оксидаза катализирует перенос электронов непосредственно с пролина на  $O_2$ . В этом случае перенос электронов и сопряженное с ним фосфорилирование осуществляется лишь на последнем участке ЭТЦ.

Наряду с рассмотренными выше вариациями возможны и адаптивные изменения самих путей переноса электронов. Особенно примечательны в этом отношении митохондрии в клетках бурого жира млекопитающих, главная функция которого состоит в выработке тепла. Эта цель достигается благодаря изящному «шунту» в дыхательной цепи, приводящему к повышенной диссипации энергии в виде тепла за счет снижения выработки АТФ (см. гл. 10). Значительные изменения состава дыхательной цепи и способа ее функционирования отмечаются и у гельминтов — факультативных анаэробов: у них по крайней мере часть синтеза АТФ осуществляется при использовании органических акцепторов электронов (например, фумарата) вместо  $O_2$  (Saz, 1981).

Значение адаптации ферментативной активности, вполне очевидное уже в системе окислительного метаболизма, еще более наглядно проявляется при рассмотрении ферментов цикла Кребса и ферментов, катализирующих включение субстратов в этот

цикл. В некоторых случаях, например в летательных мышцах саранчи, наблюдается прямая пропорциональность между активностью ферментов цикла Кребса и  $\beta$ -окисления (Nochachka, Guppy, 1977). В других системах (красные мышцы лосося, сердечная мышца кальмара) отмечаются параллельные изменения активности цикла Кребса и путей распада аминокислот, в то время как интенсивность  $\beta$ -окисления либо не согласуется с этими процессами при их усилении (у лосося), либо вообще снижается почти до нуля (у кальмара) (Ballantyne et al., 1981). Еще одним примером может служить летательная мускулатура пчелы, в которой каталитический потенциал цикла Кребса возрастает пропорционально усилению аэробного гликолиза и работы  $\alpha$ -глицеролфосфатного челночного механизма. И наконец, в иных случаях (в красных и белых мышцах тунца) каталитический потенциал цикла Кребса задает темп процессам аэробного гликолиза или  $\beta$ -окисления. Подобные факты при всем многообразии конкретных соотношений ясно показывают, что регуляция ферментного потенциала играет центральную роль в метаболической адаптации и интеграции. Поэтому в следующей главе мы начнем наш анализ биохимических адаптаций с вопроса о том, каким образом ферменты приспособлены для регуляции метаболизма.

## Адаптация ферментов к метаболическим функциям

### Сущность проблемы регуляции

Большая часть сведений о ферментативном катализе была получена при изучении отдельных реакций *in vitro*. Однако в живой клетке могут протекать тысячи различных реакций, и совершенно очевидно, что функционирование ферментов *in vivo* и *in vitro* должно быть существенно различным. Прежде всего некоторые ферменты приспособлены для того, чтобы инициировать определенные метаболические процессы, и поэтому должны контролироваться какими-то механизмами, способными «включать» и «выключать» их в нужные моменты времени. Другие ферменты действуют в местах разветвления метаболических путей, где функционирование того или иного пути должно определяться текущими потребностями клетки. Такие ферменты в условиях *in vivo* тоже должны находиться под строгим контролем, чтобы их активность была согласована с активностью других ферментов того же пути и даже других путей. Есть, наконец, ферменты, не обладающие регуляторными свойствами и действующие только как высокоэффективные катализаторы; но, поскольку через них могут проходить разные стационарные потоки метаболитов, их активность также должна согласоваться с активностью других ферментов того же пути (в том числе и тех, которые инициируют данную последовательность реакций). Процессы метаболизма в тканях или органах животных протекают не независимо друг от друга (не «в вакууме»); они должны быть интегрированы таким образом, чтобы отвечать потребностям организма как целого (например, мышечные сокращения не производятся ради самих мышц, а должны быть полезны всему организму). Таким образом, клеточный метаболический аппарат данной ткани или органа должен воспринимать сигналы, поступающие от других частей тела, и включать надлежащие процессы в нужное время и с нужной интенсивностью. И наконец, у сложноорганизованных многоклеточных животных потребность отдельных тканей или органов в различных метаболических процессах может сильно варьировать в зависимости от условий окружающей среды и стадии развития организма. Важно поэто-

му, чтобы содержание определенных ферментов или функционирование целых метаболических путей могло поддерживаться на уровне, соответствующем биологическим потребностям организма. Таким образом, необходимы механизмы, которые регулировали бы синтез ферментов в различных тканях.

Даже если не учитывать необходимость адекватных реакций на изменения внешней среды и внутреннего состояния организма, все равно потребуется как-то обеспечивать, чтобы внутриклеточные реакции протекали в нужное время, в нужном направлении и с нужной скоростью. Каким же образом осуществляется такая регуляция каталитического потенциала (количества ферментов) и каталитической активности (функционирования ферментов)?

### **Уровни регулирования концентраций ферментов: транскрипция, трансляция, сборка и расщепление**

Содержание данного фермента в клетке может регулироваться на различных этапах его образования и, конечно же, на этапе его распада. В иерархической системе регуляции метаболизма наиболее сложен механизм, влияющий на содержание ферментов путем активации и репрессии генов. В ответ на воздействие специфических сигнальных веществ — «индукторов» или «репрессоров» — в клетке может происходить соответственно инициация или прекращение *транскрипции* данной последовательности ДНК в матричную РНК (мРНК). Регуляция, осуществляемая на уровне генов, может приводить 1) к увеличению или уменьшению количества ферментов, 2) к изменению типов присутствующих в клетке ферментов и 3) к изменению относительного содержания в ней отдельных вариантов какого-либо фермента (изоформ), катализирующих одну и ту же реакцию, но несколько различающихся по своим каталитическим свойствам.

Регулирование концентраций ферментов на этом высшем уровне управления метаболическими процессами имеет очевидные преимущества и ограничения. Активация/репрессия генов позволяет высокоспецифическим образом изменять концентрации ферментов в клетке и является в этом смысле весьма гибким универсальным механизмом. Однако в клетках эукариот (а в данной книге речь идет практически только о них) активация генов происходит медленно. Обычно для того, чтобы действие сигналов, индуцирующих или репрессирующих синтез ферментов, привело к изменению их концентрации, требуется по меньшей мере несколько часов; а между тем условия среды могут заметно изменяться за считанные секунды или минуты. Поэтому для выживания организма может потребоваться, чтобы биохимическая адаптация происходила со столь же высокой скоростью.

Матричная РНК, образованная в результате транскрипции и подвергшаяся процессингу (удалению некодирующих участков — интронов), может теперь контролировать реакции, приводящие к построению полипептидных цепей. Совокупность этих реакций называют *трансляцией*, так как в ходе их осуществляется «перевод» информации, записанной на языке генетического кода, в аминокислотную последовательность белка или полипептида. Механизм регуляции белкового синтеза на этом уровне плохо изучен. Теоретически эта регуляция может осуществляться на любом из нескольких подуровней: 1) при связывании мРНК с 40S-субчастицей рибосомы, 2) при формировании 80S-комплекса, 3) при активации аминокислот и 4) путем изменения скорости считывания кода мРНК. Однако в действительности обычно используется лишь первый из указанных способов, так как остальные, вероятно, не обладают достаточной специфичностью.

Полипептидная цепь, построенная в процессе трансляции, становится функционально активной лишь после того, как приобретет определенную пространственную конфигурацию. Иными словами, для функционирования белка недостаточно, чтобы его аминокислотная последовательность (первичная структура) была правильной; для этого нужна еще надлежащая вторичная, третичная, а у большинства ферментов и четвертичная структура<sup>1</sup>. Многие белки после трансляции подвергаются ковалентной модификации — происходит, например, образование дисульфидных мостиков или фосфорилирование определенных боковых цепей (часто — остатков серина).

По-видимому, скорость каждого из этих процессов строго регулируется. Хотя вторичная структура белка в основном, а может быть, и полностью определяется последовательностью аминокислот и их стерическими взаимодействиями, особенности третичной и четвертичной структуры в известной мере зависят от внешних влияний. Например, для объединения субъединиц в функционально активные олигомеры (для образования четвертичной структуры) может требоваться фосфорилирование этих субъединиц (при участии ферментов), которое в свою очередь

<sup>1</sup> Термином *первичная структура* обозначают ковалентно связанный остов полипептидной цепи — ее аминокислотную последовательность. *Вторичной структурой* называют спирализованные конформации полипептидных цепей. *Третичной структуре* соответствует пространственная организация молекулы глобулярного белка, создающаяся в процессе свертывания (укладки) полипептидной цепи. Для обозначения вторичной и третичной структуры используют общий термин *конформация*. О *четвертичной структуре* говорят, когда хотят охарактеризовать взаиморасположение отдельных (двух или более) полипептидных цепей, входящих в состав белка. Такие белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей, называют олигомерами, а сами эти цепи — субъединицами или протомерами.

может находиться под гормональным контролем. На равновесие «неактивные субъединицы  $\rightleftharpoons$  активный олигомер» часто влияют субстраты и кофакторы этой реакции. Таким образом, эпигенетический контроль функционирования фермента на уровне формирования его третичной или четвертичной структуры может иметь важное значение для регуляции метаболизма.

В заключение отметим, что многие ферменты, прежде чем они начнут работать, должны встроиться в определенные клеточные структуры или объединиться с другими большими молекулами. В этих процессах (это будет уже формирование пятого структурного уровня) ферменты образуют комплексы с другими белками или липидами либо встраиваются в мембраны и только после этого начинают выполнять свои функции в клетке. Любой фактор, влияющий на формирование пятого структурного уровня, может изменять концентрацию в клетке *функционально активного* фермента.

Но вот после транскрипции, трансляции и процессов сборки фермент, наконец, способен функционировать. Как он работает и чем регулируется его активность? Перейдем к рассмотрению этих вопросов.

### Функция фермента неотделима от его структуры

В любой, даже самой простой ферментативной реакции связывание фермента с субстратом характеризуется высоким, тщательно регулируемым родством. В ходе реакции конформация фермента изменяется таким образом, чтобы открыть доступ молекуле субстрата к каталитическим группам фермента и облегчить их взаимодействие (достижение комплексом переходного состояния). Освобождение продуктов реакции во многих случаях тоже связано с конформационным изменением молекулы фермента. Рассмотрим в качестве примера лактатдегидрогеназу  $M_4$ . В формировании места специфического связывания NADH участвует до  $1/3$  полипептидных цепей каждой из субъединиц этого фермента. После присоединения NADH над ним замыкается полипептидная петля и образуется «карман», который служит затем для связывания молекулы пирувата и инициации каталитического цикла (Holbrook et al., 1975).

### Кинетика насыщения

Простую ферментативную реакцию можно подразделить на ряд этапов.:



где S — субстрат, E — фермент, ES — фермент-субстратный комп-



лекс,  $ES^*$  — активированный комплекс,  $EP$  — комплекс фермента с продуктом реакции,  $P$  — продукт реакции. Скорость таких реакций решающим образом зависит от концентраций фермента и субстрата. Варьирование этих величин в эксперименте показывает, что начальная скорость реакции ( $v$ ) прямо пропорциональна концентрации фермента  $[E_0]$ . Этого и следовало ожидать, так как это означает, что *in vivo* повышение концентрации

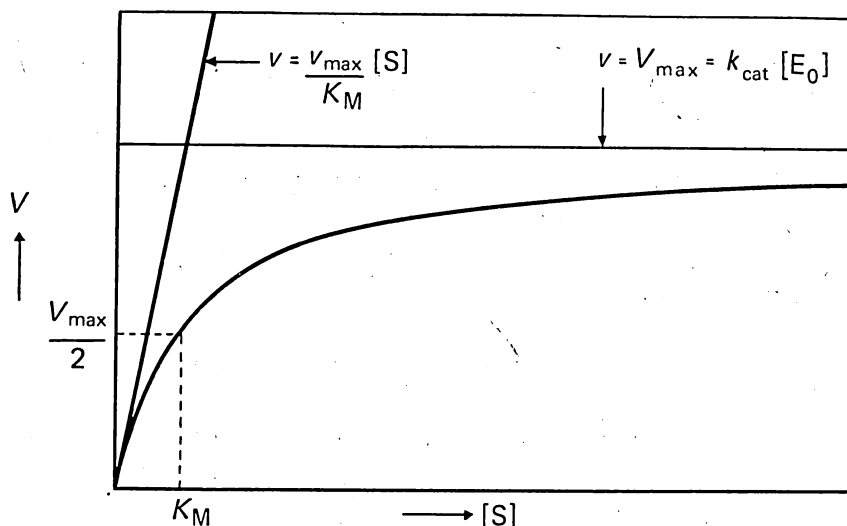


Рис. 3-1. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для реакций, описываемых уравнением Михаэлиса — Ментен.

ферментов будет увеличивать скорость метаболических реакций. Вместе с тем зависимость скорости от концентрации субстрата  $[S]$ , как правило, описывается кривой насыщения (рис. 3-1): для малых значений  $[S]$   $v$  зависит от  $[S]$  линейно, но с увеличением  $[S]$  линейность нарушается, и  $v$  растет медленнее, чем  $[S]$ , до тех пор, пока при насыщающем значении  $[S]$  не достигает предела, обозначаемого как  $V_{\max}$ .

Это соотношение между  $[S]$  и  $v$  описывается уравнением Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]},$$

где  $K_M$ , константа Михаэлиса — Ментен, означает концентрацию субстрата, при которой  $v = 1/2 V_{\max}$ .

**В условиях *in vivo* величины  $[S]$  и  $K_M$  близки между собой**

Многочисленные исследования, проводившиеся на различных животных и разных тканях, показали, что для ферментов, подчиняющихся уравнению Михаэлиса — Ментен, концентрации субстратов *in vivo* обычно близки к величине  $K_M$  или несколько ниже ее. Это обусловлено двумя причинами. Прежде всего при таком соотношении величин незначительные изменения концентрации субстрата приводят к сравнительно большим изменениям скорости реакции, что служит одним из путей регуляции скоростей реакций и соответственно уровней субстратов. Вторая причина — как бы зеркальное отображение первой: при любых малых значениях  $[S]$ , небольшие отклонения  $K_M$  приводят к относительно большим изменениям скорости реакции (рис. 3-1). Это, как мы увидим, значительно повышает возможности регуляции таких скоростей. Реагируя на изменение  $[S]$ , ферменты данного типа не только эффективно выполняют свою основную функцию пропускания углерода по тому или иному пути, но и способствуют стабилизации  $[S]$ .

#### **Разные ферменты могут обладать сродством к одним и тем же субстратам**

Метаболизм в целом можно представить себе в виде разветвленной сети ферментативных реакций. При этом на многие вещества могут воздействовать два и большее число ферментов, и в таких условиях даже высокого сродства фермента к своему субстрату оказывается недостаточно для того, чтобы «заблокировать» другие реакции. Поэтому разные ферменты конкурируют между собой за субстрат, и можно ожидать, что мутация, приводящая к увеличению или уменьшению сродства какого-либо фермента к его субстрату, окажется вредной для организма. В связи с этим становится понятно, почему величины  $K_M$  гомологичных ферментов разных животных близки между собой.

#### **Зачем существуют изозимы?**

Любая ферментативная реакция может иметь несколько «областей применения» в соответствии с метаболическими потребностями и возможностями различных тканей. Но, поскольку превращение одного и того же субстрата могут катализироваться разными ферментами, иногда бывает желательно, чтобы величины  $K_M$  для данного фермента в разных тканях не совпадали между собой. Особенности метаболизма данной ткани могут накладывать специфические ограничения на вели-

чину сродства того или иного фермента к его субстрату. Например, в одних тканях может требоваться синтез какого-то вещества, а в других — его расщепление. Такие реакции могут осуществляться с участием разных форм одного фермента (изозимов), каждый из которых в кинетическом отношении специализирован для определенной «области применения». Такая специализация иногда особенно важна в связи с задачами регуляции метаболических процессов. Может потребоваться, чтобы имеющиеся в различных тканях изозимы отвечали на совершенно разные сигналы, регулирующие их активность. В последующих главах мы рассмотрим ряд примеров, иллюстрирующих это положение.

### Эффективность стабилизации [S] в реакциях, описываемых уравнением Михаэлиса

Метаболический гомеостаз в значительной части основан на стабилизации отношения концентраций субстрата и продукта реакции путем надлежащего изменения потоков вещества в том или ином пути (см. гл. 4). Например, рост концентрации субстрата в клетке ограничивается происходящим одновременно ускорением скорости его ферментативного превращения (или утилизации продукта реакции). Однако для ферментов, насыщаемых субстратом, с увеличением концентрации субстрата соответствующий прирост скорости реакции уменьшается. Иными словами, эффективный порядок реакции постепенно снижается от значений, меньших единицы, до нуля, по мере того как [S] приближается к уровню насыщения фермента. Эффективность работы ферментов, подчиняющихся уравнению Михаэлиса — Ментен, снижается именно в те периоды, когда клетка испытывает наибольшую потребность в их работе (в моменты резких подъемов [S]). Таким образом, ферменты данного типа иногда не могут обеспечить стационарный уровень соотношения [S]/[P] путем ускорения реакции. Вполне возможно, что именно этот недостаток, присущий ферментам данного типа, в основном определил необходимость дальнейшего совершенствования системы катализа и регуляции ферментативных реакций.

### Роль мультиферментных комплексов в стабилизации [S]

Один из способов преодоления упомянутой выше трудности состоит в том, чтобы объединить все ферменты данного метаболического пути в единый большой ансамбль, своего рода суперфермент. Примерами таких комплексов могут служить синтетаза жирных кислот, ферменты  $\beta$ -окисления и пирู-

ватдегидрогеназа. Главное достоинство такой системы — то, что продукт реакции, катализируемой одним ферментом, может непосредственно передаваться в качестве субстрата следующему ферменту в цепи реакций. Объединение ферментов в ансамбль дает ряд преимуществ, например обеспечивает компартментацию молекул, снижает отток субстратов в другие, конкурирующие метаболические пути и т. п. Однако наиболее существенно, по-видимому, то, что объединенные ферменты могут функционировать при исчезающе малых концентрациях субстратов, т. е. в той области  $[S]$ , где эффективный порядок ферментативной реакции, описываемой уравнением Михаэлиса, достигает максимальных значений. Однако и в таких условиях порядок этих реакций не превышает единицы. Очевидно, что дальнейшее увеличение порядка реакции (выше 1) позволило бы с наибольшей эффективностью стабилизировать отношение  $[S]/[P]$  путем надлежащих изменений скорости реакции. Именно этим обстоятельством, вероятно, объясняются появление и дальнейшая эволюция регуляторных ферментов — таких, которые осуществляют *кооперативное связывание субстрата*, вследствие чего порядок катализируемых ими реакций оказывается намного больше единицы. Хотя, как мы увидим, эти ферменты играют и иную роль в регуляции метаболизма, наиболее фундаментальный вклад их в поддержание гомеостаза связан с их повышенной чувствительностью к концентрации субстрата.

### Положительная кооперативность: улучшенный способ выравнивания флуктуаций $[S]$

Большинство ферментов состоит из нескольких полипептидных субъединиц и соответственно имеет несколько участков, связывающих субстрат. В молекуле фермента, подчиняющегося кинетике Михаэлиса, отдельные связывающие участки не оказывают заметного влияния друг на друга. Иначе обстоит дело с большинством регуляторных ферментов, для которых характерна сигмоидная (S-образная) форма кривых насыщения субстратом. Сигмоидная кривая отражает кооперативное взаимодействие между отдельными связывающими участками: присоединение молекулы субстрата к первому участку увеличивает сродство к субстрату второго участка и т. д. Такая положительная кооперативность, определяющая сигмоидную форму кривой насыщения, непосредственно обусловлена взаимодействием отдельных субъединиц регуляторного фермента. Положительную кооперативность называют также положительным гомотропным взаимодействием, подчеркивая тем самым, что связывание одной молекулы субстрата облегчает последую-

щее связывание других его молекул. Гетеротропными называют кооперативные взаимодействия, наблюдаемые при связывании разных молекул, например субстрата и модулятора, регулирующего активность фермента (см. ниже).

Первые попытки выяснить механизм положительной кооперативности были предприняты при изучении гемоглобина. Молекула гемоглобина образована двумя парами полипептидных цепей,  $\alpha$  и  $\beta$ , уложенными симметрично в виде тетраэдра; каждая цепь содержит по одному связывающему  $O_2$  участку (группа гема). Сигмовидный вид кривой связывания  $O_2$  гемоглобином легко объяснить, предположив, что константа связывания каждой последующей молекулы  $O_2$  больше, чем предыдущей, причем сродство гемоглобина к последней из них (четвертой) по меньшей мере в 100 раз выше, чем к первой. Такое увеличение сродства по мере насыщения молекулы кислородом нельзя было бы объяснить тем, что существуют четыре не взаимодействующих между собой участка с различным сродством к кислороду, так как в этом случае сначала заполнялись бы участки с высоким сродством, и тогда сродство к кислороду таких частично заполненных молекул гемоглобина было бы ниже, чем у свободного дезоксигемоглобина. В эксперименте же выявляется обратная закономерность. Значит, увеличение сродства молекулы гемоглобина к кислороду по мере ее насыщения должно быть обусловлено *взаимодействием* связывающих участков: присоединение первых молекул  $O_2$  повышает сродство к нему незанятых участков. Однако отдельные участки в гемоглобине разделены слишком большими расстояниями, чтобы контактировать между собой непосредственно. Поэтому приходится предположить, что при оксигенировании видоизменяется третичная и четвертичная структура гемоглобина, т. е. конфигурация всей молекулы в целом. Именно это и приводит к наблюдаемому изменению сродства связывающих участков.

Данные о структуре регуляторных ферментов, для которых характерна положительная кооперативность, пока еще не так полны, как для гемоглобина, и поэтому мы можем лишь в общих чертах понять структурную основу сигмовидных кинетических кривых. Существуют три гипотетических представления по этому вопросу: 1) модель Моно, Уаймена и Шанжё, 2) модель Кошлэнда, Немети и Филмера и 3) модель Эйгена (обзор: Fersht 1977). Завершение исследований структуры регуляторных белков позволит до конца понять «механику» положительной кооперативности. Кооперативные взаимодействия между отдельными связывающими участками можно количественно оценить с помощью уравнения Хилла

$$\log [v/(V_{\max} - v)] = h \log [S] - \log K.$$

Уравнение Хилла (или «график Хилла», обычно это линейная функция) достаточно хорошо описывает связывание лигандов регуляторными белками в области средних значений насыщения (в интервале от 10 до 90%). За пределами этого диапазона экспериментальная кривая отклоняется от прямой линии. Величина  $h$ , определяемая из наклона кривой в области 50%-ного насыщения, известна как константа Хилла. Она служит мерой кооперативности: чем больше  $h$ , тем выше кооперативность. Верхний предел величины  $h$  равен  $n$  — числу участков связывания. Если  $h=1$ , это означает отсутствие кооперативных взаимодействий,  $h>1$  соответствует положительной кооперативности,  $h<1$  — отрицательной.

### Величина $(S)_{0,5}$

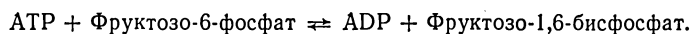
Для ферментов, удовлетворяющих модели Михаэлиса — Ментен, была введена величина  $K_M$ , равная той концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет 50% от максимальной. Аналогичным образом может быть определена величина  $(S)_{0,5}$  для ферментов, у которых зависимость скорости реакции от  $[S]$  описывается сигмоидной кривой. Для простых ферментативных реакций первого порядка величина  $(S)_{0,5}$  совпадает с величиной  $K_M$ , однако константу  $K_M$  нельзя использовать в случаях кооперативного связывания субстрата. Величину  $(S)_{0,5}$  можно определить и по-иному: она равна концентрации субстрата, при которой  $\log[v/(V_{\max}-v)]=0$ . Величину  $(S)_{0,5}$ , так же как и  $K_M$ , находят, изучая кинетику реакции; подобно  $K_M$ ,  $(S)_{0,5}$  позволяет судить о родстве фермента к данному субстрату. Физиологические концентрации субстратов для регуляторных ферментов варьируют вблизи соответствующих значений  $(S)_{0,5}$  (так же как и  $K_M$ ). И это не случайность, а явный результат адаптивной подстройки сродства фермента к субстрату, направленной на то, чтобы даже небольшие изменения концентрации субстрата вызывали весьма значительное изменение скорости реакции. Именно эта особенность регуляторных ферментов позволяет стабилизировать концентрацию субстрата и в то же время при надобности изменять скорость ферментативной реакции в широких пределах — от базального уровня до максимального.

### Отрицательная кооперативность: для чего она нужна?

Наряду с положительной известна и отрицательная кооперативность, которую проявляют некоторые ферменты при связывании субстрата (так называемые отрицательные гомотропные взаимодействия); порядок таких реакций меньше единицы,

и соответственно величина  $h$ , входящая в уравнение Хилла, тоже меньше единицы. Значение положительной кооперативности для поддержания гомеостаза вполне понятно, но в чем смысл отрицательной кооперативности? Какова ее функциональная роль? Это легко объяснить на примере фермента фосфофруктокиназы (ФФК).

Этот фермент катализирует реакцию трансфосфорилирования:



Так как эта реакция — один из этапов гликолиза, она в конечном счете участвует в синтезе АТФ при окислении или сбраживании глюкозы. Поэтому нужно, чтобы она регулировалась не как реакция, использующая АТФ, а как ключевой этап всего процесса регенерации АТФ — одной из функций блока I. Неудивительно, что при физиологических концентрациях АТФ эта

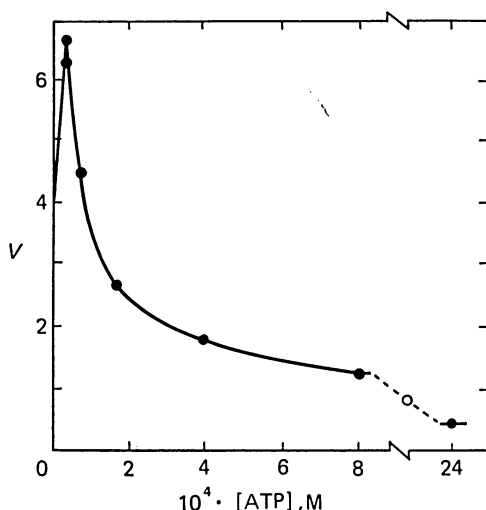


Рис. 3-2. Зависимость скорости реакции, катализируемой дрожжевой фосфофруктокиназой, от концентрации АТФ при отсутствии АМР. (По Atkinson, 1977, с изменениями.)

реакция отрицательного кинетического порядка по отношению к АТФ (рис. 3-2). И это не случайность, а результат сложной адаптации фосфофруктокиназы к ее функции *in vivo*. Перестройка олигомерной структуры ФФК позволяет образовывать связывающие участки двух типов — каталитические и регуляторные. Каталитическим участкам свойственно высокое сродство к АТФ, и поэтому в физиологических условиях они всегда

полностью насыщены субстратом. Интересно, что в условиях *in vitro* зависимость скорости реакции от концентрации АТР гиперболическая, а от концентрации другого субстрата, фруктозо-6-фосфата, — сигмоидная.

В то же время в состав олигомерной молекулы ФФК входят регуляторные субъединицы, связывающие участки которых проявляют меньшее сродство к АТР. Присоединение АТР к этим регуляторным (некаталитическим) участкам вызывает снижение сродства каталитических участков ко второму субстрату — фруктозо-6-фосфату. Поэтому при высоких концентрациях АТР (или при больших величинах отношения концентраций АТР/АДФ), когда клетка не нуждается в генерации добавочной энергии в форме АТР, активность ФФК понижена; а при нехватке энергии недостаточная концентрация АТР служит сигналом, который автоматически активирует ФФК.

Как удостовериться в том, что этот сложный механизм сложился в результате адаптации? Для этого можно было бы, например, показать, что он формируется лишь в тех случаях, когда это действительно необходимо, и отсутствует у гомологичных ферментов, функции которых не связаны с генерацией АТР. К счастью, известен по крайней мере один такой фермент — фосфофруктокиназа миксомицетов. Их клетки на поздних стадиях агрегации используют в качестве источника углерода и энергии главным образом аминокислоты и белки, глюкоза же не играет существенной роли в энергетическом метаболизме. Поэтому большая часть экзогенной глюкозы в этих клетках превращается в гликоген. Основной функцией гликолиза (и соответственно ФФК) является здесь снабжение клетки триозами и двухуглеродными фрагментами для процессов биосинтеза. Изучение кинетики ФФК миксомицетов показало, что активность фермента не регулируется описанным выше механизмом: поведение его полностью соответствует классической модели Михаэлиса. Этот пример весьма поучителен, так как наглядно показывает, что сродство ферментов к их субстратам (а также и к лигандам-модуляторам) не определяется раз и навсегда какими-то химическими обстоятельствами: оно может изменяться в процессе отбора и адаптации (см. Hochachka, 1980).

### Регуляция активности ферментов с помощью аллостерии

До сих пор мы относили к числу «регуляторных» лишь те ферменты, для которых характерна, по крайней мере в определенных условиях, сигмоидная кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Это хорошее определение, но оно годится не всегда. Говоря об отрицательной кооператив-



ности в случае фосфофруктокиназы, мы уже отмечали, что подобные ферменты почти всегда испытывают сильное влияние модуляторов. Такими модуляторами для большинства регуляторных ферментов служат метаболиты, химически не родственные субстратам. Повышение их концентрации активирует или ингибирует соответствующие ферменты-мишени. Поэтому у регуляторного фермента наряду с участком, связывающим субстрат, должен быть также участок для связывания модулятора. Взаимодействие фермента с модулятором, так же как и его насыщение субстратом, может происходить кооперативно, и кривые насыщения для модулятора нередко имеют сигмовидную форму. Поэтому по аналогии с  $(S)_{0,5}$  можно ввести величину  $(M)_{0,5}$ , равную концентрации модулятора, при которой степень активации или ингибирования регуляторного фермента составляет половину максимальной. Комплекс фермента с модулятором (так же как и с субстратом) стабилизируется слабыми (нековалентными) связями, которые, как мы увидим, могут быть важными объектами отбора в связи с адаптацией не только к метаболизму клетки, но и к условиям окружающей среды.

Как уже говорилось, модулятор в химическом отношении может не иметь ничего общего с субстратом. Например, АМР служит положительным модулятором для гликогенфосфорилазы, фосфофруктокиназы, цитратсинтазы и ряда других ферментов, и лишь в одном из этих случаев (в случае ФФК) он химически родствен субстрату (АТР). Кроме того, центр связывания модулятора в молекуле фермента пространственно обособлен от места связывания субстрата — нередко они даже располагаются в разных субъединицах. Поэтому регуляторные ферменты часто называют аллостерическими: эффектор (модулятор) по своей структуре не сходен с субстратом и присоединяется к собственному отдельному участку. (Взаимодействия между участками, связывающими идентичные молекулы субстрата, иногда называют «гомotropными» — в отличие от «гетеротропных» взаимодействий между участками, связывающими модулятор, с одной стороны, и участками, связывающими субстрат, — с другой.)

Выделяя в особую группу аллостерические взаимодействия (явление аллостерии), мы тем самым четко разграничиваем два различных механизма регуляции ферментов: 1) прямое воздействие на участок связывания субстрата (например, конкурентное ингибирование фермента аналогами субстрата, в том числе продуктами реакции) и 2) присоединение модулятора к особому участку связывания. Аллостерические модуляторы, присоединившись, изменяют сродство к субстрату и каталитическую активность олигомерного фермента, вызывая *нелокаль-*

ное изменение его конформации. Таким образом, при адаптивной перестройке аллостерических ферментов должны видоизменяться не только участки связывания субстрата и модулятора, но и механизм взаимодействия каталитических субъединиц с регуляторными. При таком взаимодействии образуются слабые химические связи, благодаря чему этот процесс оказывается особо чувствительным звеном в биохимической адаптации к физическим и химическим условиям внешней среды и к изменениям метаболизма.

### Каким образом модуляторы регулируют каталитическую активность ферментов?

В принципе модуляторы могут влиять на активность фермента, изменяя  $V_{\max}$ ,  $(S)_{0,5}$  или обе эти величины (известны примеры всех трех типов). Однако в большинстве случаев активность регуляторных ферментов контролируется путем изменения их сродства к субстрату (см., например, рис. 3-3). Это объясняется тем, что такой механизм более чувствителен, чем механизм, основанный на изменении  $V_{\max}$ . Высокий порядок реакций, катализируемых регуляторными ферментами, еще больше повышает чувствительность к концентрации субстрата. Это лучше всего видно на графиках (рис. 3-4), отражающих зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для ферментов с кинетикой Михаэлиса и для регуляторных ферментов (типичные сигмоидные кривые). Если в первом случае при определенных изменениях сродства к субстрату скорость катализируемой реакции возрастает или уменьшается на 25%, то при таких же изменениях сродства у регуляторного фермента скорость реакции может изменяться в пределах от величин вдвое с лишним выше исходной до величин меньше ее трети. Из этого очевидно, что управление активностью регуляторных ферментов может быть гораздо более точным, чем в случае нерегуляторного фермента. Однако преимущества регуляторных ферментов еще более значительны благодаря особенностям их реакции на модулирующие сигналы.

Дело в том, что связывание модуляторов регуляторными ферментами — почти всегда кооперативный процесс, и поэтому даже незначительное изменение концентрации модулятора (порядка нескольких процентов) может привести к двукратному изменению сродства фермента к субстрату. Таким образом, благодаря кооперативному связыванию модулятора, во-первых, расширяется диапазон изменений сродства к субстрату (при данном изменении концентрации модулятора) и, во-вторых, возрастает изменение скорости реакции при данном изменении сродства. Оба этих эффекта, как бы перемножаясь, многократ-

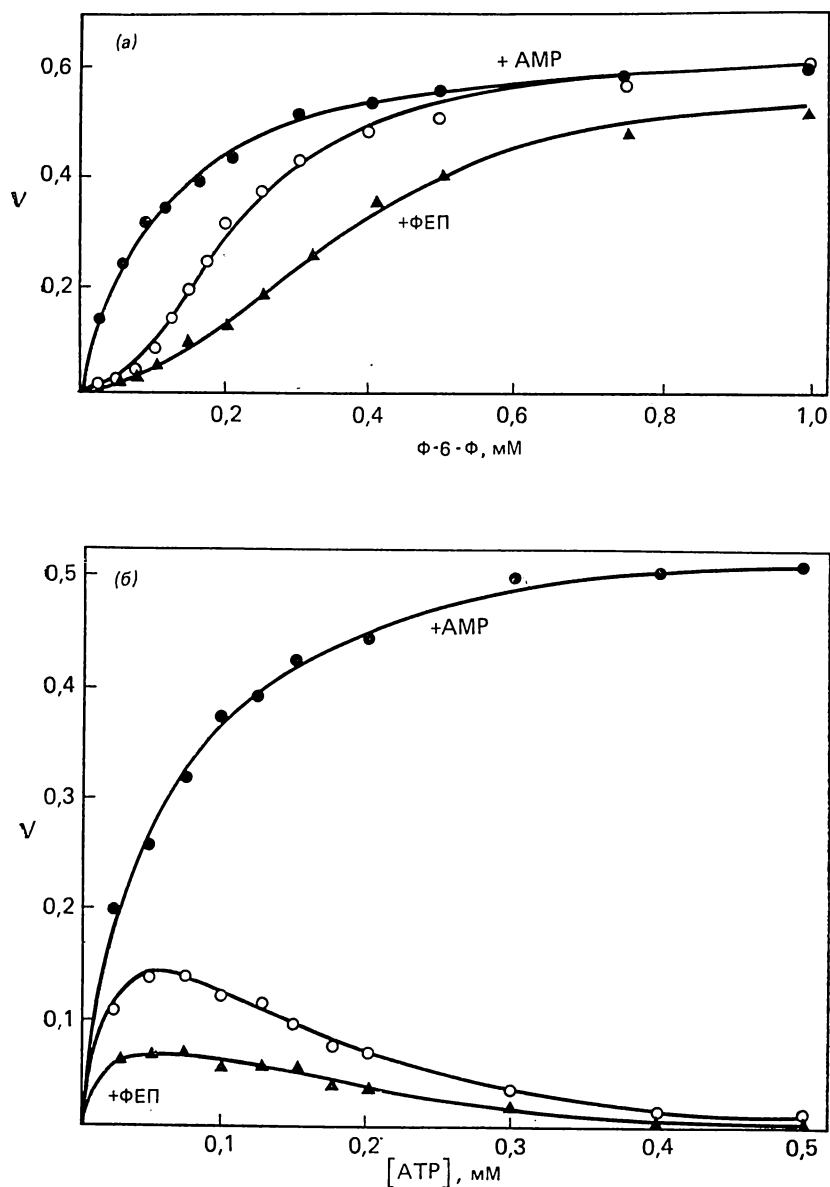


Рис. 3-3. Влияние модуляторов — фосфоенолпирувата (ФЕП) и AMP — на кинетику фосфофруктокиназы из мышцы-аддуктора *Mytilus*. (По Ebberink, с изменениями; подробности и обсуждение см. в работе De Zwaan, 1983.)

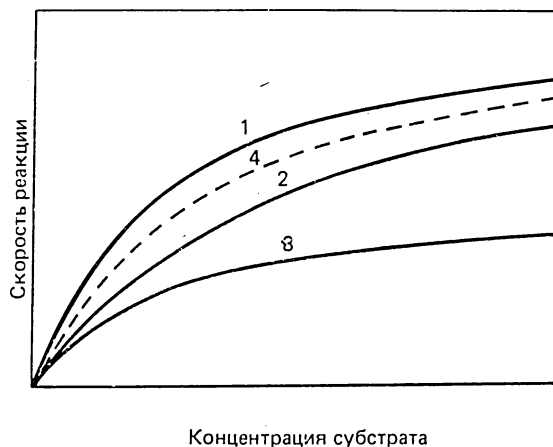
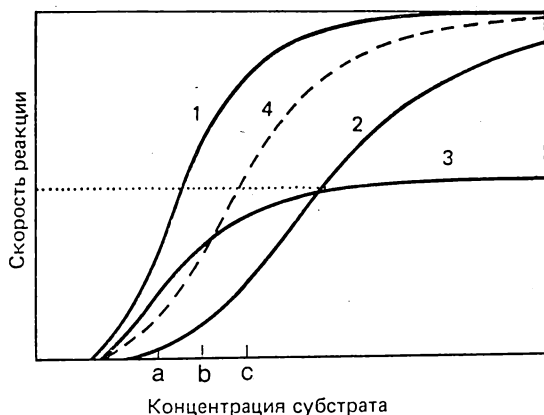


Рис. 3-4. *Вверху*: зависимость скорости реакции, катализируемой кооперативным ферментом, от концентрации субстрата. Приведены кривые с разными значениями  $(S)_{0.5}$ . Для кривых 1, 4 и 2 максимальные скорости одинаковы, но концентрации субстрата, при которых достигается половина максимальной скорости, совершенно различны ( $a$ ,  $b$  и  $c$  соответственно). Кривая 3 соответствует реакции с максимальной скоростью, в два раза меньшей, чем в остальных случаях; при этом  $(S)_{0.5}$  принимает значение  $a$ .

*Внизу*: аналогичные кривые для ферментов, подчиняющихся уравнению Михаэлиса — Ментен. Влияние изменений  $[S]$  и  $K_M$  на скорость реакции менее выражено. (По Atkinson, 1977, с изменениями.)

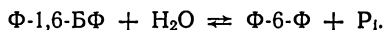
но повышают чувствительность к регулирующим факторам по сравнению с тем, что было бы без кооперативного взаимодействия.

### Зачем нужны ферменты, создающие обходные пути?

Для многих регуляторных ферментов (хотя и не для всех) характерно то, что катализируемые ими реакции протекают со значительным уменьшением свободной энергии; поэтому термодинамический барьер препятствует обращению этих реакций. К тому же *in vivo* такие реакции обычно далеки от положения равновесия, что еще больше способствует их односторонности. Однако в определенных физиологических условиях возникает потребность в обращении некоторых ферментативных реакций. Эта задача может быть решена путем изменения кинетики реакции. Например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа печени при одних условиях должна участвовать в гликолизе, а при других — в глюконеогенезе. Как прямую, так и обратную реакцию катализирует один и тот же изоэнзим — его кинетические свойства приспособлены для этого (Smith, Velick, 1972). Однако такой механизм нетипичен; в данном случае он, вероятно, возможен в связи с окислительно-восстановительным характером данной реакции, а также потому, что она сопряжена с реакцией, катализируемой киназой (фосфоглицераткиназой), в которой при глюконеогенезе АТФ используется, а при гликолизе — синтезируется. Более типичны случаи, когда протекание физиологического процесса в прямом и обратном направлении обеспечивается разными химическими реакциями. Превосходным примером может служить метаболизм фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф) и фруктозобисфосфата (Ф-1,6-БФ).

В процессе гликолиза превращение Ф-6-Ф в Ф-1,6-БФ катализируется фосфотруктокиназой. Однако в тех тканях, где возможен синтез углеводов *de novo*, должна осуществляться и обратная реакция. Между тем ни регуляторные, ни каталитические особенности фосфотруктокиназы не могут обеспечить протекание обратной реакции *in vivo*. Известно, например, что отношение скоростей прямой и обратной реакций в условиях насыщения составляет для фосфотруктокиназы около 400, и поэтому никакие сочетания модуляторов не могут существенно изменить положение. Проблема в данном случае разрешается с помощью фермента обходного пути — фруктозобисфосфатазы, катализирующей совершенно другую, термодинамически выгодную реакцию — образование Ф-6-Ф из Ф-1,6-БФ. Это реакция гидролиза (в то время как реакция, катализируемая фосфотруктокиназой, является реакцией трансфосфорилирования), и

она сопровождается уменьшением свободной энергии примерно на 4 ккал/моль:



Активность фруктозобисфосфатазы высока в тканях, способных к интенсивному глюконеогенезу (печень и почки), в тканях же, в которых синтез гликогена de novo идет медленно (например, белые мышцы), она невелика; там, где глюконеогенеза нет вообще, этот фермент вообще не выявляется. Известно множество других ферментов, катализирующих обходные реакции, и некоторые из них будут рассмотрены в последующих главах.

Сообразительный читатель, однако, заметит, что преодоление необратимости определенных реакций с помощью «обходных» путей порождает новую трудность, связанную с возможной одновременной работой двух ферментов, действующих в противоположных направлениях. Здесь нужны регуляторные механизмы: ведь если такие ферменты окажутся в одном и том же компартменте клетки, это может привести к «короткому замыканию» в цепях превращения углеводов (а нередко и энергии).

У живых организмов выработались разные способы решения этой проблемы. Один из них состоит в пространственном разобщении ферментов. Примером может служить разобщение процессов синтеза и окисления жирных кислот; их образование происходит в цитозоле, а окисление — в митохондриях. Аналогичным образом у некоторых животных (тритон, голубь, кролик, лягушка, ящерица) реакция пируваткиназы при гликолизе и обходные реакции при глюконеогенезе тоже осуществляются в разных компартментах клетки: пируваткиназа — растворимый фермент цитозоля, а пируваткарбоксилаза и фосфоенолпируват-карбоксикиназа — митохондриальные ферменты. Благодаря такому пространственному разобщению ферментов возможность одновременного протекания противоположно направленных реакций и даже целых метаболических путей сводится к минимуму. Однако нередко используются и иные механизмы.

Противоположно направленные процессы чаще всего контролируются путем координированной реципрокной регуляции ферментативной активности. Рассмотрим в качестве примера взаимопревращения  $\Phi\text{-}6\text{-Ф}$  и  $\Phi\text{БФ}$ . В этом случае по крайней мере один из модуляторов, участвующих в этих реакциях, должен быть положительным для фосфофруктокиназы и в то же время отрицательным — для фруктозобисфосфатазы (рис. 3-5). Таким модулятором оказался АМР: он служит мощным ингибитором фруктозобисфосфатазы, но оказывает сильное активирующее действие на фосфофруктокиназу. Позднее было показано, что фруктозо-2,6-бисфосфат тоже ингибирует первый из

этих ферментов и одновременно действует как самый мощный из всех известных активаторов второго (Uyeda et al., 1981).

При адаптации способность фруктозобисфосфатазы связывать AMP, как и другие свойства, может видоизменяться. На присоединение AMP к ферменту сильно влияет температура, поэтому у эктотермных животных (или в эктотермных тканях

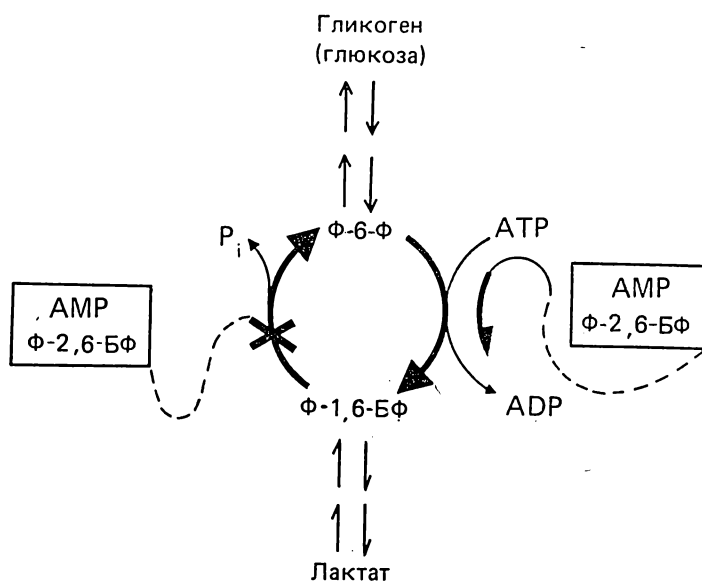


Рис. 3-5. Схема двух главных механизмов регуляции процессов взаимного превращения фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-бисфосфата в реакциях, катализируемых фосфофруктокиназой и фруктозобисфосфатазой. Активирующее воздействие обозначено черной пунктирной стрелкой, ингибирующее — жирным крестом.

млекопитающих и птиц) должны быть специальные механизмы приспособления этого процесса к различным температурным условиям. Наряду с этим у пчел фруктозобисфосфатаза летательных мышц, по-видимому, участвует в общем термогенезе: отбор благоприятствовал тому, чтобы в этом метаболическом звене сформировалась короткозамкнутая теплообразующая цепь. Вот почему у пчел активность упомянутого фермента не регулируется с помощью AMP (см. Ночачка, 1974). Возможность утраты этого механизма имеет важное значение, так как еще раз подкрепляет нашу уверенность в том, что он, так же как и другие регуляторные свойства ферментов, является результатом адаптации. Когда тот или иной способ регуляции

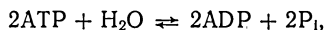
полезен для организма, он подхватывается отбором; а если теряет свое значение, то может быть утрачен, и тогда для регуляции активности фермента могут выработаться иные механизмы.

### Тонкие и грубые механизмы регуляции ферментов

Регулирование активности ферментов с помощью модуляторов является, вероятно, одним из наиболее тонких способов регуляции метаболизма. Эти высокоспецифичные механизмы служат для «точной настройки» метаболических систем. Уровень специализации здесь очень высок: иногда тот или иной модулятор действует только в одной или в нескольких тканях организма и приурочен к строго определенному звену метаболического процесса. Однако метаболизм клетки в целом требует интеграции многих биохимических путей и должен, кроме того, соответствовать ее энергетическому и окислительно-восстановительному статусу. Эту общую интеграцию обеспечивают системы грубой настройки — главным образом с помощью аденилатов, которые участвуют в любых метаболических путях клетки. Это универсальные факторы сопряжения (аналогичную функцию в ряде случаев выполняют окислительно-восстановительные пары  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  и  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ). Особенно велика роль аденилатов в управлении общим метаболизмом клетки и в его интеграции.

### Соотношения аденилатов и регуляция метаболизма

Обсуждение вопроса о роли аденилатов в регуляции метаболизма осложнено возможностью взаимных превращений этих веществ. Прежде всего АТФ и АДФ могут превращаться друг в друга в реакциях типа



в том числе при участии различных киназ, при переносе электронов в дыхательной цепи и т. п. АМР включается в эти процессы в реакции, катализируемой аденилаткиназой:



По мнению Эткинсона (Atkinson, 1977), для регуляции метаболизма важны не столько изменения концентраций отдельных аденилатов, сколько соотношения между ними. Для удобства обсуждения и с тем, чтобы подчеркнуть важность данного положения, этот автор ввел представление об аденилатной системе запасаания энергии и *энергетическом заряде*: аденилатная система полностью заряжена, когда все аденилаты, имеющиеся в клетке, превращены в АТФ, а в полностью разряженном со-



стоянии аденилаты представлены в форме АМР. Энергетический заряд можно представить как отношение

$$\frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]};$$

это величина, прямо пропорциональная полезной энергии, запасенной в аденилатной системе.

Многие регуляторные ферменты имеют специализированные участки для связывания аденилатов, однако влияние изменения энергетического заряда на активность таких ферментов зависит от того, в какой метаболический путь они включены. Если это путь, генерирующий АТР, то высокие значения энергетического заряда обычно ингибируют их (частный случай регуляции по типу отрицательной обратной связи). Как это ни удивительно, но это относится и к тем реакциям, которые протекают с потреблением АТР, например к рассмотренной выше фосфофруктокиназной реакции. Такая особенность — результат биологической адаптации, она обусловлена не обстоятельствами химического порядка, а биологическими потребностями клетки.

Регуляторные ферменты, участвующие в процессе с использованием АТР, реагируют на изменение аденилатного энергетического заряда прямо противоположным образом. Протеканию процессов, связанных с расходом АТР, благоприятствует высокий энергетический статус клетки и, следовательно, высокий энергетический заряд. В этом случае характер реакции фермента тоже определяется биологической адаптацией и не может быть объяснен на основе чисто химических соображений.

До сих пор мы никак не учитывали изменений концентрации  $P_i$ , даже если они сопутствуют изменениям концентраций АДФ и АТР. Эткинсон (Atkinson, 1977) считает такой подход вполне оправданным. В закрытой системе, где суммарное количество аденилатных и свободных фосфатных групп постоянно, концентрация свободного фосфата ( $P_i$ ) может служить мерой заряженности системы. При этом уменьшение  $P_i$  соответствует росту энергетического заряда. Однако в условиях *in vivo* такую систему уже нельзя рассматривать как закрытую, так как внутриклеточное содержание  $P_i$  определяется в этом случае равновесием пула  $P_i$  с множеством других фосфорилированных соединений. В этих условиях концентрация  $P_i$  уже не может быть адекватным показателем энергетического заряда.

Сказанное, однако, не означает, что количество  $P_i$  не может играть существенной роли в регуляции клеточного метаболизма. Уже давно было высказано предположение, что  $P_i$  должен оказывать активирующее действие на фосфофруктокиназу, аналогичное эффекту, вызываемому АМР или снижением

энергетического заряда. Хотя роль  $P_i$  в регуляции энергетического заряда цитозоля, возможно, невелика, неорганический фосфат, по-видимому, в большей мере участвует в регулировании функции электрон-транспортной системы. Согласно одной из теорий дыхательного контроля, поток транспортируемых электронов в основном определяется не столько энергетическим зарядом, сколько отношением

$$[ATP]/[ADP][P_i],$$

или так называемым фосфатным потенциалом, величина которого в первую очередь зависит от  $P_i$  (Wilson et al., 1979).

Благодаря механизмам тонкой и грубой регуляции активность регуляторных ферментов, таких, например, как фосфофруктокиназа, приспосабливается к изменениям в интенсивности работы данного метаболического пути. Иногда реакции, катализируемые этими ферментами, сами лимитируют скорость всего процесса. Однако такие ферменты, по-видимому, редко используются для «включения» метаболических путей; эту функцию обычно выполняют ферменты, занимающие стратегическую позицию в начале главных путей или реже в важных точках их разветвления. Поскольку эти ферменты играют решающую роль во включении того метаболического пути, в котором они действуют, их называют ключевыми ферментами или «генераторами потока» (по Newsholme, 1978).

### Ключевые ферменты

Таким ферментам необходимы две фундаментальные особенности. Во-первых, у них должны быть механизмы, поддерживающие их молекулы во «включенном» или «выключенном» состоянии. Во-вторых, они должны функционировать в условиях избытка субстрата, т. е. в активном состоянии они должны быть полностью им насыщены. При этих условиях скорость катализируемой реакции всегда будет *прямо пропорциональна активности фермента* (т. е. концентрации его молекул, находящихся в активной форме). Таким образом, *чем выше доля активного фермента, тем интенсивнее поток углерода через данную реакцию и через весь тот путь, для которого она является пусковой*. Работа остальных ферментов этого пути зависит от соответственных изменений химического потенциала (отношения субстрат/продукт и т. п.) для последующих реакций.

В этом отношении лучше всего изучена гликогенфосфорилаза — ключевой фермент гликолиза. Известны две формы этого фермента: активная и относительно малоактивная; переход одной формы в другую строго регулируется. В большин-

стве тканей (печень, мышцы и др.) концентрации гликогена и  $P_i$  во много раз больше соответствующих величин  $K_m$ ; поэтому химический потенциал данной системы всегда благоприятствует протеканию гликогенолиза. Для того чтобы эта система начала работать, нужен лишь один добавочный компонент — гликогенфосфоорилаза в активированной форме: активация (включение) этого фермента ведет к активации всего гликолитического пути. Потому такие ферменты и называют ключевыми. «Конструкция» этих ферментов удивительным образом приспособлена к их функции *in vivo*. Их активность регулируется не только внутриклеточными механизмами — такие ферменты реагируют и на внеклеточные сигналы, что позволяет согласовывать их функции с потребностями клетки, ткани и всего организма. Этот уровень регуляции чрезвычайно сложен, он включает каскады ферментов (где одни ферменты регулируют активность других), механизмы включения и выключения ферментов путем их фосфорилирования и дефосфорилирования, а также механизмы внеклеточной гормональной активации или ингибирования. Сама по себе сложность таких систем исключает возможность того, что их организация обусловлена химическими, а не биологическими причинами; их конструкцию можно понять лишь в связи с задачами физиологической адаптации.

### Регуляция ключевых ферментов на примере гликогенфосфоорилазы

Характерной особенностью ключевых ферментов является их положение. Например, гликогенфосфоорилаза занимает *стратегическое* положение в трех различных смыслах этого слова. Во-первых, она находится в начале того пути, к которому принадлежит, а это идеальная позиция для регулирования соответствующей функции. Во-вторых, она не только расположена в начале метаболического пути, но к тому же (по крайней мере в мышцах, а возможно, и в печени) физически приближена к своему субстрату, так как ассоциирована с гликогеновыми гранулами. В-третьих, будучи подвержена внеклеточному гормональному контролю, она «стыкует» процессы клеточного метаболизма с потребностями организма в целом.

Сегодня мы уже знаем много ключевых ферментов, управляемых внутриклеточными и внеклеточными сигналами, однако не все аспекты регуляции их функций в достаточной мере ясны. Наиболее полно изучена в этом отношении гликогенфосфоорилаза, и поэтому именно на ее примере мы рассмотрим регуляцию ферментативной активности *in vivo*.

### Регуляторная цепь для гликогенфосфорилазы начинается с внеклеточных сигналов

Гликогенолиз в определенных тканях и органах нередко начинается под действием тех или иных внешних стимулов. Классический пример — подготовка к «борьбе или бегству». В подобных случаях было бы выгодно использовать как нервные, так и гормональные сигналы для активации гликогенолиза, например в мышцах. Общая схема этих процессов теперь изучена достаточно подробно. Регулирующее действие внеклеточных сигналов на метаболизм опосредуется циклическим АМР, кальмодулином или тем и другим. Циклический АМР образуется из АТФ при участии связанного с мембраной фермента аденилатциклазы. Этот фермент специфически активируется многими гормонами, например адреналином. При подъеме концентрации адреналина в крови до  $10^{-9}$  М его молекулы начинают связываться со специфическими рецепторами наружной поверхности клеточной мембраны, и в результате активируется аденилатциклаза, находящаяся на внутренней поверхности мембраны. Активная форма аденилатциклазы катализирует превращение АТФ в циклический АМР, и концентрация последнего в клетке может достигать  $10^{-6}$  М.

Однако циклический АМР не воздействует прямо на гликогенфосфорилазу. Как полагают, он присоединяется к регуляторной субъединице протеинкиназы, и при этом высвобождается ее каталитическая субъединица в активной форме (рис. 3-6). Киназа в свою очередь катализирует фосфорилирование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фермента киназы фосфорилазы, субстратом которой является неактивная гликогенфосфорилаза *b*. В этой реакции АТФ фосфорилирует четыре сериновых остатка в молекуле фосфорилазы *b*, что приводит к ее активации — образованию так называемой фосфорилазы *a*. Обычно фосфорилаза *a* расщепляет молекулу гликогена в присутствии  $\text{P}_i$  с образованием глюкозо-1-фосфата. Эта реакция протекает в мышцах, печени и других тканях (сердечной мышце, почке и т. д.). В печени глюкоза переходит в кровь в концентрации порядка 5 мМ. Таким образом, каскадный механизм регуляции следует рассматривать как эффективный усилитель входного сигнала: при действующей концентрации гормона около  $10^{-9}$  М концентрация конечного продукта составляет  $5 \cdot 10^{-3}$  М, что соответствует примерно  $5 \cdot 10^6$ -кратному усилению!

Мобилизацию гликогена в некоторых тканях (особенно в мышцах) вызывают не только гормональные, но и нервные стимулы. Уже сравнительно давно известно, что в нервной активации участвуют ионы кальция, но только в последние годы стало ясно, что они влияют на каскад мобилизации гликогена

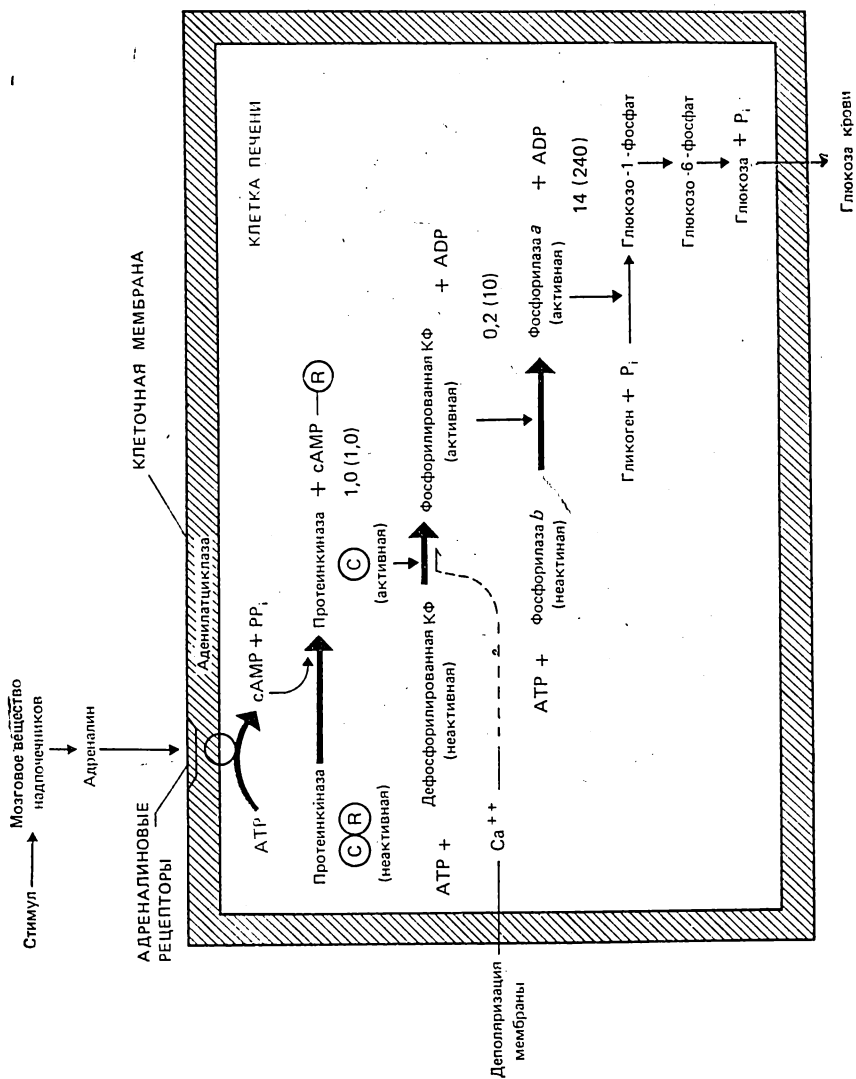


Рис. 3-6. Каскад реакций, активирующий гликогенфосфорилизу. Указаны молярные отношения для протеинкиназы, киназы фосфорилирующей *a* и фосфорилирующей *b* для печени и (в скобках) для скелетных мышц. (По данным Cohen, 1978, и Lehninger, 1975.)

непрямым путем — в результате присоединения к кальмодулину.

Кальмодулин — сравнительно небольшой белок (мол. масса 16 700) с высоким содержанием кислых аминокислот. Изучение его структуры и связывания им кальция показало, что в его молекуле имеются четыре участка для связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , обладающих высоким сродством к этому иону. Кальмодулин в свою очередь способен присоединяться к различным белкам, причем каждый из этих белков служит для выполнения определенной функции или специфичен для определенной ткани. В мышцах кальмодулин входит в качестве субъединицы в молекулу киназы фосфорилазы. При связывании  $\text{Ca}^{2+}$  он переводит эту киназу в активную форму, которая активирует фосфорилазу *b*, что приводит к мобилизации гликогена. Таким образом, нервный механизм мобилизации гликогена включает меньше этапов, чем гормональный (см. рис. 3-6), и поэтому может действовать быстрее.

### Способны ли системы фосфорилирования белков к адаптации?

Системы фосфорилирования белков, подобные гликогенфосфорилазной, настолько широко представлены в тканях животных, что их считают тем общим каркасом, к которому как бы пристроены другие регуляторные механизмы и даже сами пути. Однако сам этот каркас подвержен видоизменению и адаптации: он может по-разному использоваться в разных тканях и получать входные «сигналы» различного рода. Молярные отношения протеинкиназа : киназа фосфорилазы : фосфорилаза в белых мышцах и в печени составляют соответственно 1 : 10 : 240 и 1 : 0,2 : 14. Таким образом, степень усиления входного сигнала (например, адреналина) может зависеть от типа ткани или вида организмов, а ее адаптивные изменения могут быть основаны на регуляции количеств каждого из ферментов данного каскада и на использовании тех или иных изоформ (Cohen, 1978).

В нашу задачу не входит детальный анализ регуляторных механизмов каскадного типа. Интересующихся можно отослать к статье Коэна (Cohen, 1978). Однако мы хотели бы обратить особое внимание на один момент, не обсуждавшийся ранее: *ферменты, образующие каскады, одновременно выполняют и каталитические, и регуляторные функции. Цель катализа здесь — регуляция, без катализа она невозможна.* Все эти ферменты, образно говоря, «сидят на шее» друг у друга и приказывают, что, когда и с какой скоростью следует делать.

Регуляторные сигналы для систем фосфорилирования белков разнообразны — они могут зависеть или не зависеть от

циклических нуклеотидов, быть чувствительными или нечувствительными к кальмодулину и  $\text{Ca}^{2+}$ , могут активироваться гормонами прямо или опосредованно; однако особенности конструкции этих систем в той или иной ткани определяются функциями данной ткани. Поэтому *каталитические и регуляторные элементы таких систем могут служить особенно яркими примерами адаптации ферментов к выполнению определенных метаболических функций.*

### Ферменты как механизмы «корректирования»

Качество работы ферментов, выполняющих регуляторные функции, можно оценить по необычайной точности, с которой считываются матрицы при синтезе макромолекул. Например, при репликации ДНК *E. coli* одна ошибка приходится на участок цепи длиной примерно  $10^8$ — $10^9$  нуклеотидов, а суммарная частота ошибок транскрипции и трансляции при синтезе белка составляет не более 1 на  $10^4$  аминокислотных остатков. Как показали термодинамические расчеты (Fersht, 1980), простые ферменты не могут обеспечить столь высокую точность — она может быть достигнута лишь с помощью особых «корректирующих» механизмов.

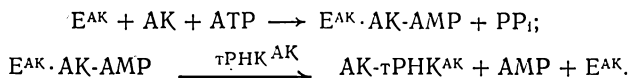
### Общая стратегия «корректирования»

Интересно, что высокую точность при биосинтезе белков и репликации ДНК обеспечивают сходные в своей основе механизмы. В том и другом случае наряду с биосинтетическими центрами, участвующими в полимеризации, у ферментов *имеются еще гидролитические активные центры для расщепления «ошибочных» структур, которые могут случайно образоваться. Таким образом, процесс биосинтеза на каждом этапе подвергается двойной проверке, и возникающие ошибки устраняются, прежде чем они будут зафиксированы в структуре полимера.*

Отметим попутно, что «корректирование» следует отличать от репарации. После завершения репликации в двухцепочечной молекуле ДНК благодаря комплементарному спариванию оснований возможно исправление поврежденного участка одной из цепей. Такой участок вырезается, и на его месте встраивается нормальный фрагмент при участии ДНК-полимеразы и лигазы. При «корректировании» же правильность считывания проверяется еще *до того*, как закончится биосинтез. Ниже мы рассмотрим процесс корректирования более подробно на примере синтеза белка.

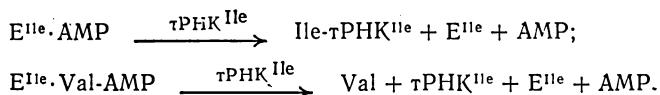
### Отбор аминокислот в процессе белкового синтеза

Подбор аминокислот при синтезе белка осуществляется в двухступенчатом процессе, включающем активацию аминокислоты и ее присоединение к тРНК. Обе ступени катализирует один и тот же фермент — аминоацил-тРНК-синтетаза, причем каждой из аминокислот (АК) соответствуют специфический фермент ( $E^{AK}$ ) и тРНК ( $tRНК^{AK}$ ):



Вообще говоря, фермент должен совершить выбор дважды: *сначала отобрать нужную аминокислоту, а затем — соответствующую ей тРНК*. Однако узнавание транспортных РНК не сопряжено с какими-либо трудностями: это большие молекулы, каждая из которых отличается от других рядом специфических структурных особенностей. Аминокислоты же в структурном отношении нередко настолько сходны, что возникает проблема их различения. Допустим, требуется отличить определенную аминокислоту от ее гомолога с меньшим числом углеродных атомов, например аланин от глицина. Активный центр аланил-тРНК-синтетазы соответствует молекуле аланина и поэтому достаточно велик, чтобы связать также меньшую по величине молекулу глицина. Аналогичные проблемы возникают и при отличении некоторых других аминокислот от их изостерических аналогов меньшего размера, в частности изолейцина от валина. Возникает парадоксальная ситуация: экспериментально показано, что *аминоацил-тРНК-синтетазы при выборе одной из сходных аминокислот действительно совершают ошибки (на уровне первого из приведенных выше уравнений), и в то же время суммарная реакция протекает с очень высокой точностью*.

Каким же образом полная реакция по своей точности может превзойти составляющие ее процессы? Парадокс разрешается благодаря механизму корректирования. Пусть в результате взаимодействия изолейцил-тРНК-синтетазы с изолейциладенилатом («правильная» реакция) и с валиладенилатом («ошибочная» реакция) образовались два комплекса. Взаимодействие  $tRНК^{Ile}$  с «правильным» комплексом приводит к образованию  $Ile\text{-}tRНК^{Ile}$ , в то время как аналогичное взаимодействие с ошибочным комплексом ведет к гидролизу валиладенилата:





В этих процессах (активация аминокислот и гидролиз ошибочного комплекса) изолейцил-тРНК-синтетаза в присутствии валина и тРНК<sup>Val</sup> *действует как АТР-пирофосфатаза и гидролизует АТР*. Работа этих контролирующих механизмов, так же как и рассмотренных выше протеинкиназных систем, с энергетической точки зрения может показаться весьма неэкономной. Однако в целом достигается приемлемый компромисс: затрата некоторого количества АТР ради большей точности биосинтеза

Таблица 3-1. Частота ошибок и «корректирование». (Fersht, 1980, с изменениями)

Процесс	Наблюдаемая частота ошибок	Частота ошибок, ожидаемая при отсутствии «корректирования»	Экспериментальные данные о существовании процесса «корректирования»
Репликация ДНК → ДНК	$10^{-8} - 11^{-10}$	$10^{-4} - 10^{-5}$	Есть
Синтез белка ДНК → белок	$< 10^{-3}$	$10^{-1} - 10^{-5}$	Есть
ДНК → мРНК (транскрипция)	$< 10^{-3}$	$10^{-4} - 10^{-5}$	Нет
Е <sup>AK</sup> : АК (распознавание аминокислот)	$< 10^{-3}$	$\leq 10^{-1}$	Есть
Е <sup>AK</sup> : тРНК (распознавание тРНК)	$< 10^{-3}$	$10^{-6} - 10^{-8}$	Нет

(табл. 3-1) вполне оправдывает себя. По-видимому, так же обстоит дело и при корректировании процессов репликации ДНК (Fersht, 1980).

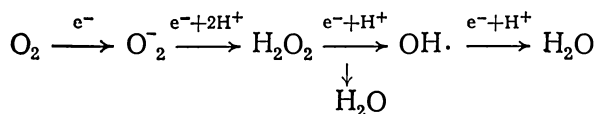
### Насколько эффективно «корректирование»?

Простые расчеты позволяют понять необходимость рассмотренных выше компромиссов. Можно считать, что молекулярная масса типичного белка какого-либо микроорганизма, например *E. coli*, составляет около 110 000, т. е. его молекула содержит примерно 1000 аминокислотных остатков. Без «корректирования» частота ошибок при репликации генома была бы недопустимо высокой, так что этот белок оказался бы в ряду клеточных поколений нестабильным. Кроме того, его структурная организация утратила бы свою определенность, так как каждая молекула белка содержала бы некоторое число (от нескольких, возможно, до сотни) ошибочно включенных аминокислот. Умножив этот эффект на общее число белков микробной клетки ( $\sim 3000$ ), мы увидим, что тогда разве только в редких случаях могли бы появляться жизнеспособные потомки, да и те были бы неполноценными. Таким образом, без механизмов корректи-

рования известные нам процессы трансляции при современном наборе аминокислот явно не смогли бы обеспечить существование высших форм жизни.

### Ферменты как защитные приспособления

Есть, наконец, еще одна область, где ферменты используются в основном для регуляции, а не для катализа собственно метаболических реакций. Это функция обезвреживания или разрушения потенциально вредных для клетки веществ, образующихся на главных путях метаболизма или в результате нежелательных побочных реакций. Наилучшим примером могут служить ферменты, катализирующие расщепление крайне токсичных для клетки радикалов, которые образуются при взаимодействии субстрата с кислородом. Четырехступенчатый процесс полного восстановления молекулы  $O_2$  (к которой на каждом из этапов присоединяется по одному электрону) идет с образованием трех необычайно реакционноспособных промежуточных продуктов, представляющих опасность для клетки. Эти продукты — супероксидный радикал, перекись водорода и гидроксильный радикал — образуются в следующей цепи реакций:

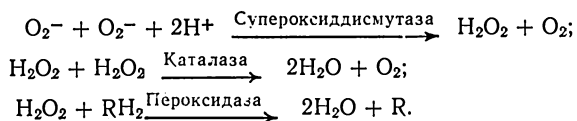


Потоки супероксидных радикалов, возникающие в ходе ферментативных или фотохимических реакций, способны инактивировать вирусы, вызывать перекисидацию липидов, повреждать мембраны и в конечном счете убивать клетку. Паракват, ускоряющий образование  $O_2^-$ , в аэробных условиях более токсичен, чем в анаэробных. Исследования показали, однако, что  $O_2^-$  нельзя рассматривать как непосредственно повреждающий фактор: он служит предшественником других, более активных окислителей, которые могут образоваться лишь при одновременном присутствии  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . Именно эти окислители воздействуют на ДНК, мембранные липиды и другие жизненно важные компоненты клетки (Fridovich, 1978).

В условиях *in vivo*  $O_2$  может восстанавливаться различными способами. Особый интерес представляет реакция, катализируемая цитохромоксидазой, в ходе которой (благодаря структурным особенностям этого фермента) не образуются ни супероксидные радикалы, ни  $H_2O_2$  (Hill, 1981). Однако большинство других реакций восстановления  $O_2$  может приводить к накоплению таких соединений. Вероятно, главным источником  $O_2^-$

и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетке служит взаимодействие молекулярного кислорода с восстановленным убихиноном (Hill, 1981). Кроме того, образованием заметных количеств  $\text{O}_2^-$  сопровождаются и многие другие реакции, в том числе такие вполне «безобидные» процессы, как превращение гемоглобина в метгемоглобин и миоглобина в метмиоглобин (другие примеры реакций, приводящих к образованию токсичных интермедиатов в процессе восстановления  $\text{O}_2$ , упоминаются в работе Fridovich, 1978).

Как можно было бы уменьшить образование активных оксидантов? Проще всего снизить долю  $\text{O}_2$ , способного вступать в реакции, протекающие с образованием  $\text{O}_2^-$ , т. е. восстанавливать больше  $\text{O}_2$  с помощью цитохромоксидазы. Этот способ действительно используется клеткой (Fridovich, 1978), однако эффективность его сравнительно невелика. Во-первых, часть  $\text{O}_2$  все равно восстанавливается в реакциях, протекающих с образованием токсичных продуктов. Во-вторых, что более важно, *цитохромоксидаза сама по себе ничего не может сделать с уже образовавшимися  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$* . В реакции, катализируемой этим ферментом, свободные радикалы не образуются, но и не используются. Неудивительно поэтому, что в процессе эволюции выработались специальные защитные механизмы. Главную роль в защите от свободных радикалов, образующихся при восстановлении  $\text{O}_2$ , играют ферменты, способные их *каталитически обезвреживать*: 1) *супероксиддисмутазы*, катализирующие превращение  $\text{O}_2^-$  в перекись водорода +  $\text{O}_2$ ; 2) *каталазы*, которые переводят  $\text{H}_2\text{O}_2$  в  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{O}_2$ ; 3) *пероксидазы*, восстанавливающие  $\text{H}_2\text{O}_2$  до воды с использованием различных восстановителей (например, глутатиона). Эти реакции можно представить следующим образом:



Важно отметить, что в этом арсенале защитных средств отсутствуют ферменты, способные обезвреживать гидроксильные радикалы. Если, однако, рассмотреть путь образования свободных радикалов (см. выше), то станет очевидно, что эффективное удаление двух первых интермедиатов ( $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) делает невозможным и образование третьего ( $\text{OH}\cdot$ ). И это очень хорошо для нас: высокоактивный гидроксильный радикал способен взаимодействовать с самыми разнообразными веществами, так что специфическое обезвреживание его ферментативным путем было бы невозможным (Fridovich, 1978).

Как и следовало ожидать, наличие упомянутых ферментов зависит от потребностей организма. Анаэробы, как правило,

лишены супероксиддисмутазы или содержат ее в очень малых количествах; у микроорганизмов, относящихся к факультативным анаэробам, этот фермент индуцируется присутствием кислорода, а у облигатных аэробов образуется всегда.

Каталитические свойства супероксиддисмутазы и ее молярные концентрации в клетке идеально соответствуют функции обезвреживания свободных радикалов, выполняемой этим ферментом *in vivo*. Во-первых, этот фермент взаимодействует с  $O_2^-$  в реакции первого порядка (по отношению к ферменту и субстрату), в то время как некаталитическое превращение  $O_2^-$  происходит в реакции второго порядка (по отношению к субстрату). Во-вторых, концентрация супероксиддисмутазы в клетках высока (около  $10^{-5}$  М в большинстве тканей) и значительно превышает концентрацию  $O_2$ . Расчеты показывают, что в таких условиях ферментативная реакция может протекать примерно в  $10^9$  раз быстрее, чем спонтанная, некаталитическая (Fridovich, 1978); при этом внутриклеточная концентрация  $O_2^-$  могла бы быть меньше  $10^{-10}$  М! *In vivo* этот эффект сочетается с действием каталаз и пероксидаз, которые совместно обеспечивают поддержание очень низкого уровня  $H_2O_2$ . Чем ниже концентрация этих двух активных интермедиатов, тем меньше вероятность образования еще более активных радикалов, таких как  $OH^\cdot$  или синглетный кислород. Таким образом, эти ферменты, защищающие аэробную клетку от «самозагрязнения» потоками  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , действуют как синергисты<sup>1</sup>.

### Влияние отбора на структуру и функции ферментов

Ферменты, как мы видели, служат *катализаторами* и *регуляторами* биохимических процессов, и их конструкция поэтому должна быть достаточно гибкой для адаптации к огромному разнообразию функций. Самое простое, что должны делать ферменты, — это катализировать различные реакции, верхом же совершенства (и сложности) можно считать те случаи, когда они выступают в качестве управляющих и регуляторных элементов. Поэтому уместно будет, заканчивая главу, еще раз бегло просмотреть весь спектр функций, выполняемых ферментами, от самой простой до наиболее сложной. Каждая из этих функций характеризуется определенными особенностями и служит выполнению определенных задач. Действию отбора, видимо, подвержены следующие элементы:

<sup>1</sup> Эффект защиты от свободных радикалов, образующихся при неполном восстановлении  $O_2$ , особенно ярко проявляется у актиний. Показано, что при защите от эндосимбиотических водорослей содержание супероксиддисмутазы у этих животных увеличивается примерно в 100 раз (см. J. Dykens, M. Schick, *Nature*, 297, [1982], 579—580).

1) каталитическая эффективность, обеспечивающая быстрое продвижение субстрата по пути, в котором действует данный фермент;

2) регулируемое сродство фермента к субстрату ( $K_m \leq [S]$  *in vivo*) как средство поддержания на низком уровне величины  $[S]$  и, что еще более важно, ее стабилизации;

3) существование изозимов, которые определяют тканеспецифические особенности метаболизма и катализируют аналогичные или идентичные химические реакции в различных путях обмена;

4) положительная кооперативность как наиболее совершенное средство стабилизации концентраций субстрата;

5) мультиферментные комплексы — еще одно средство стабилизации концентраций субстрата и регуляции его уровня, а также эффективный механизм, регулирующий потоки метаболизма через определенные пути;

6) аллостерические ферменты и аллостерические модуляторы как средство тонкой регуляции скорости и направления реакций в различных метаболических путях;

7) стехиометрическая и аллостерическая чувствительность фермента к аденилатам и соотношению их концентраций как инструмент, позволяющий координировать функции всех метаболических путей в соответствии с энергетическим состоянием клетки;

8) ключевые ферменты, способные изменять скорость реакций в стратегически важных пунктах метаболических путей;

9) системы фосфорилирования белков, чувствительные к действию гормонов, циклических нуклеотидов и/или  $Ca^{2+}$ -кальмодулиновому комплексу, координирующие клеточный и тканевый метаболизм с потребностями организма в целом;

10) ферменты с двумя центрами связывания (буфункциональные), обеспечивающие «корректирование» в процессах биосинтеза макромолекул.

Каким образом все эти функции могут быть запрограммированы в структурной организации ферментов? Вопрос этот невероятно сложен, и ответ на него сегодня существенно отличается от тех объяснений, которые были в ходу еще двадцать лет тому назад. Хотя приведенный выше перечень намеренно упрощен, он все же позволяет взглянуть на ферментный аппарат как на своего рода «сырье» для адаптивных процессов. В этой главе мы проследили, каким образом природа использовала этот «сырой материал» для создания сложных систем управления метаболизмом. В последующих главах мы более подробно рассмотрим трансформацию этого «сырья» для решения специальных биологических задач, возникающих при взаимодействии организма и среды.

# Адаптация к физической нагрузке

## Основные стратегии

Физиологические механизмы и обменные процессы при физической нагрузке вызывают огромный интерес как у ученых, так и у неспециалистов. В связи с этим метаболическому обеспечению локомоции и иных видов физической работы у самых разных животных и человека посвящена обширная литература, и сейчас это один из наиболее глубоко разработанных вопросов в области биохимической адаптации. Как выяснили физиологи, энергозатраты при локомоции, как правило, зависят от размеров тела и от способа и быстроты передвижения. Крупное, быстро передвигающееся животное расходует больше энергии, чем небольшое, передвигающееся более медленно. Для выполнения очень быстрых, но кратковременных двигательных актов обычно требуется большее усилие, чем для более медленных, спокойных движений. Энергозатраты при полете меньше, чем при беге и ходьбе, но больше, чем при плавании. У позвоночных и по крайней мере у некоторых групп беспозвоночных существуют три основных способа биохимической адаптации, позволяющие им совершать движения, скорость и продолжительность которых чрезвычайно широко варьирует. Способы эти следующие:

1. Специализация мышц — появление двух или нескольких типов, различных по ультраструктуре, сократительному аппарату и, следовательно, биомеханическим свойствам (быстроте и силе сокращения и т. п.).

2. Преимущественное развитие в одних мышечных волокнах анаэробного метаболизма, а в других — аэробного. Обычно это связано и с различием в используемых субстратах: для анаэробного пути требуются углеводы, а для аэробного — жиры или жиры с углеводами;

3. Развитие тонких механизмов метаболической адаптации. Здесь можно выделить:

- а) кратковременные изменения (при необходимости практически мгновенной перестройки работы и метаболизма мышц, как, например, при бегстве);

б) промежуточные изменения (более глубокая и более длительная адаптация, например при тренировке);

в) долговременные изменения (изменения в эволюционном масштабе, приводящие к генетическим межвидовым различиям в упомянутых выше механизмах [а и б] и, следовательно, в характере и возможностях мышечной деятельности).

Эти три принципа биохимической адаптации лучше всего изучены у позвоночных, на которых мы и сосредоточим главное внимание.

### Метаболизм и работа мышц

Способность перемещаться по направлению к чему-либо (или от чего-либо) настолько характерна для животных, что ее считают чуть ли не главной их отличительной чертой; поэтому не удивительно, что у большинства животных из всех тканей наиболее развита мышечная. У позвоночных на ее долю может приходиться около трех четвертей общей массы тела. У человека и других млекопитающих на окислительные про-

Таблица 4-1. Относительное потребление кислорода различными органами человека в покое и при тяжелой работе (за единицу принято потребление  $O_2$  всем телом в покое; оно близко к  $0,17 \text{ ммоль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{ кг}^{-1}$ . (По McGilvery, 1979, с изменениями)

Орган	Покой	Тяжелая работа
Скелетные мышцы	0,30	6,95
Органы брюшной полости	0,25	0,24
Почки	0,07	0,07
Головной мозг	0,20	0,20
Кожа	0,02	0,08
Сердце	0,11	0,40
Прочие ткани и органы	0,05	0,06
Все тело	1,00	8,00

цессы в мышцах расходуется в покое около 30% всего потребляемого кислорода (т. е. приходится 30% основного обмена); во время тяжелой физической нагрузки резкое повышение интенсивности обмена связано главным образом с увеличением метаболизма мышц, хотя, безусловно, возрастают также работа и энергозатраты сердца (табл. 4-1). При максимальной нагрузке общий обмен обычно возрастает примерно в 10 раз, а у некоторых животных, в частности у лошади, он может увеличиваться даже в 40 раз!

У млекопитающих существуют три основных вида «топлива» для мышечной работы: креатинфосфат, углеводы (гликоген и

глюкоза) и жиры. Эти три вида субстратов различаются по энергопродукции и по тому, как долго можно совершать работу, используя каждый из них (табл. 4-2). Этим объясняется тот широко известный факт, что при длительной малоинтенсивной работе протекают главным образом окислительные процессы (сгорание жиров или углеводов), при работе средней интенсивности, которая уже не может быть обеспечена окислительным метаболизмом, используется анаэробный гликолиз, а при более высокой кратковременной нагрузке — гидролиз фосфагенов.

Таблица 4-2. Максимально возможная мощность (по данным расчетов) скелетных мышц человека при использовании различных субстратов и путей катаболизма. (По McGilvery, 1975, с изменениями)

Субстрат и путь обмена	Мощность, мкмоль АТФ·г <sup>-1</sup> (сырого веса)·мин <sup>-1</sup>
Окисление жирных кислот	20,4
Окисление гликогена	30,0
Сбраживание гликогена	60,0
Гидролиз креатинфосфата и АТФ	96,0—360

Использованием этих трех источников энергии и обусловлено то, что чем длительнее работа, тем меньше максимальная мощность, которую могут развивать мышцы. При этом неравномерное распределение субстратов между мышечными волокнами разного типа ведет к тому, что на разных стадиях мышечной работы действуют разные типы волокон. Поэтому нам нужно сначала уточнить, что это за типы, прежде чем перейти к механизмам мобилизации тех или иных энергетических резервов.

#### Типы скелетных мышечных волокон у позвоночных

Практически у всех исследованных позвоночных были найдены по меньшей мере два, а в большинстве случаев три типа мышечных волокон. По своей окраске, зависящей главным образом от содержания миоглобина, мышечные волокна разделяются на белые, промежуточные и красные. У филогенетически древних групп рыб (пластиножаберных, костных и хрящевых ганоидов, некоторых костистых рыб с примитивными чертами) различия в энергетических потребностях для спокойного длительного плавания и для быстрых «рывков» привели к



полному анатомическому и функциональному обособлению быстрых и медленных двигательных систем. Например, у акулы спокойное плавание всецело обеспечивают сокращения тонких боковых полосок из красных мышечных волокон тонического типа; основная же масса мускулатуры представлена белыми волокнами с фазической активностью, используемыми только в периоды быстрого передвижения. Интересно, что по характеру иннервации и электрофизиологическим особенностям эти два типа волокон сходны соответственно с тоническими волокнами (для которых характерна диффузная иннервация) и быстрыми волокнами (белыми, с дискретной иннервацией) других позвоночных животных. Этот пример прекрасно иллюстрирует положение, согласно которому развитие белых и красных мышечных волокон было связано с необходимостью разделения функций.

Однако такое простое разделение наблюдается не у всех позвоночных. Например, у многих современных костистых рыб функции различных волокон в значительной степени перекрываются: при длительном плавании со средней скоростью работают волокна обоих типов (Johnston, 1981); кроме того, есть и волокна промежуточного типа. У большинства исследованных до сих пор млекопитающих в большей части скелетных мышц были обнаружены волокна трех различных типов; но если у костистых рыб эти волокна в основном или даже полностью обособлены друг от друга, то у млекопитающих скелетные мышцы представляют собой как бы мозаику из волокон всех трех типов. Тем не менее белые волокна и волокна промежуточного типа остаются «быстрыми», а красные — обычно «медленными». Интересно, что у млекопитающих большая часть мышц при рождении состоит из медленных волокон (плоду не надо ни нападать на жертву, ни убежать от хищника); однако по мере роста и развития в постнатальном периоде часть медленных мышечных волокон превращается в быстрые, а другие остаются без изменений (Goldspink, 1977).

Белые, промежуточные и красные волокна существенно различаются не только по электрофизиологическим свойствам, но и по ультраструктуре (табл. 4-3). У млекопитающих белые волокна обычно крупные (диаметр саркомера до 100 А), но не очень однородные по толщине. Они не так хорошо снабжены кровеносными капиллярами, митохондрий в них немного, а саркоплазматический ретикулум сильно развит. Напротив, красные волокна обычно окружены обильной капиллярной сетью, саркоплазматический ретикулум в них развит слабее, однако число митохондрий очень велико. Кроме того, красные волокна значительно тоньше (в 3—4 раза). Волокна промежуточного типа у млекопитающих — это быстрые волокна, обла-

дающие выраженной способностью как к анаэробному, так и к аэробному метаболизму.

Волокна этих трех типов различаются также по активности изотимов миозиновой АТФазы (Нол, 1983). Активность этого фермента наиболее высока в белых и промежуточных волокнах и низка в красных волокнах.

Все эти данные согласуются с представлением о том, что разделение функций, имеющееся уже у примитивных рыб, сох-

Таблица 4-3. Структурные и метаболические особенности различных типов мышечных волокон позвоночных. (По Holloszy, Booth, 1976)

Быстрые красные (промежуточные) волокна	Быстрые белые волокна	Медленные красные волокна
Высокая интенсивность дыхания Высокая скорость гликолиза Высокое содержание миоглобина Высокая активность миозиновой АТФазы Хорошо развитый саркоплазматический ретикулум Высокая буферная емкость	Низкая интенсивность дыхания Высокая скорость гликолиза Низкое содержание миоглобина Высокая активность миозиновой АТФазы Хорошо развитый саркоплазматический ретикулум Высокая буферная емкость	Высокая интенсивность дыхания Низкая скорость гликолиза Высокое содержание миоглобина Низкая активность миозиновой АТФазы Плохо развитый саркоплазматический ретикулум Низкая буферная емкость

раняется и у высших позвоночных. В пользу этого говорят и результаты прямых экспериментов: как у рыб, так и у млекопитающих *красные волокна предпочтительно используются при легкой или умеренной работе, а белые начинают функционировать либо тогда, когда при тяжелой работе значительно возрастает приток возбуждающих импульсов к мотонейронам, либо при утомлении красных волокон* (Holloszy, Booth, 1976). Волокна промежуточного типа, или быстрые красные, обладают в некоторой степени свойствами как белых, так и красных волокон. Это проявляется в выраженной способности синтезировать АТФ как аэробным, так и анаэробным путем. Таким образом, белые волокна приспособлены для коротких периодов интенсивной работы, разделенных длинными восстановительными периодами, а красные — для долговременной работы средней интенсивности. В основе такого разделения функций лежат соответствующие адаптации ферментных и метаболических систем, без которых это разделение было бы невозможным.

### Запасы энергии и последовательность их использования при различных видах работы

Одна из важнейших сторон адаптации к физической нагрузке состоит в запасании и использовании того или иного «топлива». Как уже упоминалось, резервные энергетические субстраты в скелетных мышцах человека — это высокоэнергетические фосфаты, гликоген и триглицеролы (см. табл. 4-4). Считается,

Таблица 4-4. Внутриклеточные запасы энергии в мышцах человека. (По Howald et al., 1978)

Субстрат	Содержание, мкмоль/г сухого веса	Энергетический эквивалент, мкмоль ~Р/г сухого веса
АТФ	25	10
Креатинфосфат	75	60
Гликоген	370	14 200
Триацилглицеролы	50	24 520
Аминокислоты, белки	?	Обычно вряд ли используются

что у человека при большинстве видов физической нагрузки аминокислоты и белки не мобилизуются, но у некоторых животных они могут иметь гораздо большее значение (табл. 4-5). Запасы АТФ и креатинфосфата в мышцах очень малы по сравнению с общим количеством высокоэнергетических фосфатов, которое может быть синтезировано. Местные резервы гликогена и триацилглицеролов с точки зрения энергопродукции в 2—3 раза больше, чем резервы АТФ и креатинфосфата соответственно.

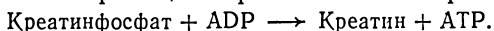
Таблица 4-5. Важнейшие запасы энергии у лосося и кальмара. (По Mømtsen et al., 1980; Nochachka et al., 1983)

Лосось	Кальмар
АТФ	АТФ
Креатинфосфат	Аргининфосфат
Гликоген	Гликоген
Жиры	—
Белки	Аминокислоты
Аминокислоты	Белки

### Высокоинтенсивная мышечная работа, обеспечиваемая фосфагенами

Сигналом для сокращения мышечного волокна служит деполаризация его мембраны под влиянием импульсов от мотонейронов. Она приводит к поступлению в цитозоль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , активации ими миозиновой АТФазы и сокращению миофибрилл. Непосредственным источником энергии для сокращения служит АТФ, которого больше всего в белых мышечных волокнах, обеспечивающих кратковременную интенсивную работу мышц. Однако даже здесь этих запасов хватает лишь на несколько секунд напряженной работы. По-видимому, один лишь АТФ может обеспечить кратковременную работу только у немногих животных, и поэтому мышечное сокращение обычно поддерживается двумя дополнительными процессами: восполнением запасов АТФ за счет фосфагенов и анаэробного гликолиза.

У позвоночных основным резервным высокоэнергетическим фосфатом служит креатинфосфат, а у многих беспозвоночных — аргининфосфат. Креатинфосфата больше всего в белых мышечных волокнах (примерно 30 мкмоль на 1 г сырого веса). Он обычно содержится в цитозоле, однако есть данные о том, что он сосредоточен около миозиновой АТФазы, где находится связанная с миозином креатинфосфокиназа (Bessman, Geiger, 1981) и где должны поддерживаться запасы АТФ, чтобы интенсивная работа могла продолжаться. Оптимальному функционированию ММ-изозима креатинфосфокиназы способствует не только его локализация в клетке, но и его ферментативные свойства. При максимальной работе в анаэробных условиях катализируемая им реакция протекает в направлении



Таким образом, особый интерес представляет соотношение сродства креатинфосфокиназы к креатинфосфату и к АДФ. При изучении кинетических свойств креатинфосфокиназы из мышц человека (Jacobs, Kuby, 1980) было обнаружено, что константы диссоциации фермента из бинарного и тройного комплексов довольно высоки (72 и 32 мМ соответственно). Это означает, что в нормальных условиях *in vivo* концентрация креатинфосфата не будет насыщающей, и фермент должен быть максимально чувствителен к изменениям этой концентрации. Сродство креатинфосфокиназы к креатинфосфату мало, а к АДФ — велико (константы диссоциации АДФ для бинарного и тройного комплексов составляют соответственно около 200 мкМ и 60 мкМ). Таким образом, креатинфосфокиназа более конкурентоспособна в отношении АДФ, чем фосфоглицераткиназа или пируваткиназа. Это означает, что при максимальной работе мышцы, когда концентрация АДФ может превышать сродство

к этому соединению комплекса креатинфосфокиназа — креатинфосфат, фермент может полностью насыщаться ADP, и в этом случае его активность будет зависеть главным образом от изменения концентрации креатинфосфата.

Общее содержание аденилата в мышцах составляет всего лишь 6 мкмоль/г. Значит, даже если бы весь ADP превратился в АТР, то в результате реакции



концентрация креатинфосфата изменилась бы значительно меньше, чем общая величина пула аденилатов. В то же время при максимальной мышечной работе запасы креатинфосфата (примерно 30 мкмоль/г) обычно почти полностью истощаются. То же самое происходит и с запасами аргининфосфата у многих беспозвоночных (Nochachka et al., 1983). Это явление, так же как и парадоксальное накопление лактата (которого накапливается намного больше, чем это соответствовало бы общему пулу аденилатов), можно объяснить лишь тем, что приведенная выше реакция сопряжена с функцией миозиновой АТРаза (и фактически ею запускается). Значение этого взаимодействия, так же как и гликолиза (см. ниже), обычно недооценивается при рассмотрении работы мышц в анаэробных условиях.

Если от общего содержания креатинфосфата в мышце зависит, как долго она сможет работать за счет этого вещества, то *скорость* энергообразования (т. е. гидролиза АТР в мкмоль/мин) определяется количеством имеющейся креатинфосфокиназы. Вот почему в белых мышечных волокнах этого фермента обычно больше, чем в красных, и уровень креатинфосфокиназы или аргининфосфокиназы выше у животных, особенно хорошо приспособленных к кратковременным большим нагрузкам.

Фосфагены могут обеспечивать энергией такие двигательные акты, как, например, быстрое нападение хищника на жертву. Однако многим животным приходится выполнять интенсивную работу дольше чем 5—10 секунд. Для такой работы нужна эндогенная система, пополняющая запас АТР, первоначально созданный за счет гидролиза фосфагенов. Как у позвоночных, так и у беспозвоночных такой системой, обеспечивающей, в частности, локомоцию, всегда служит какая-либо форма анаэробного гликолиза.

#### **В белых мышечных волокнах больше гликогена и выше активность ферментов**

Во время кратковременной интенсивной работы путь анаэробного гликолиза действует как замкнутая система. Поэтому общее количество работы, которую он может обеспечить, зависит от резервов гликогена, а скорость энергопродукции — от

активности гликолитических ферментов. Значит, самый простой способ усиления гликолиза состоит в увеличении запасов гликогена и поддержании высокой активности ферментов, участвующих в гликолизе. Этот способ и был избран природой, и именно поэтому у млекопитающих запас гликогена в белых мышечных волокнах больше, чем в красных. Также и активность ферментов гликолиза в белых мышечных волокнах позвоночных выше, чем в каких-либо других тканях или органах

Таблица 4-6. Адаптивные различия в активности цитратсинтазы и лактатдегидрогеназы<sup>1</sup> в белых (БМ) и красных (КМ) мышечных волокнах некоторых рыб. (По Hochachka et al., 1978; Guppy et al., 1979; Mommsen et al., 1980)

	Цитратсинтаза		Лактатдегидрогеназа		
	БМ	КМ	БМ	КМ	Отношение БМ/КМ
Неактивные рыбы					
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	1,0	—	760	—	
<i>Arapaima gigas</i>	1,7	3,3	260	263	1,0
<i>Hoplias</i>	2,0	3,7	576	419	1,4
<i>Hoplerthrinus</i>	1,3	1,4	1060	810	1,3
Активные рыбы					
Лосось	8,8	68,0	5500	300	18,3
Тунец	2—7	21,0	5500	515	10,7

<sup>1</sup>) Активность ферментов выражена в микромолях субстрата, превращенного в продукт за 1 мин на 1 г сырого веса мышцы при 25 °С.

(табл. 4-6). Этим же объясняется тот факт, что скорость образования лактата и предельное содержание его в белых мышечных волокнах выше, чем в других тканях. McGilvery (1975) и Newsholme (1978) привели данные в пользу того, что у хорошо тренированных спринтеров процессы гликолиза в мышцах ног могут усиливаться в две тысячи раз. Иными словами, поток вещества в цепи гликоген→лактат может возрасть на три порядка! Это зависит не только от содержания ферментов, но также от их типа, особенно от регуляторных свойств. Наибольшую роль в регуляции скорости гликолиза играет фермент, запускающий весь этот процесс, — мышечная гликогенфосфорилаза.

#### Каскадная система регуляции мышечной гликогенфосфорилазы

У млекопитающих гликогенфосфорилаза представлена по меньшей мере тремя изозимами, один из которых характерен для скелетных мышц и миокарда (Cohen, 1978). Непрямая активация фосфорилирования гликогена происходит под влияни-

ем эндокринных и нервных сигналов. Гормоны, в особенности адреналин, активируют связанную с мембраной аденилатциклазу, запускающую регуляторный каскад. Большая часть компонентов этой каскадной системы (в том числе сама фосфорилаза) связана в мышцах с частицами гликогена. Возможно, такое расположение облегчает активацию системы в целом (Cohen, 1978).

Нервный механизм, активирующий распад гликогена, связан с деполяризацией мембраны и выходом  $\text{Ca}^{2+}$  из элементов саркоплазматического ретикулума. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  связываются кальмодулином — самой малой субъединицей неактивной киназы фосфорилазы *b*. В мышцах кальмодулин, как и в других тканях, обладает двумя участками связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , но здесь он включен в интегральную олигомерную структуру киназы фосфорилазы *b*. Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулином приводит к значительному (примерно в 15 раз) увеличению сродства фермента к субстрату. В физиологических условиях это приводит к АТФ-зависимому фосфорилированию *b*-киназы и ее активации. Активная киназа вызывает полимеризацию фосфорилазы *b* с образованием фосфорилазы *a* (рис. 4-1). В печени с помощью такой каскадной системы первоначальный сигнал, передаваемый адреналином, усиливается примерно в  $10^6$  раз. Сравнение молярных отношений (Cohen, 1978) между ферментами каскада в мышцах (1:10:240) и в печени (1:0,25:14) показывает, что в мышцах возможно большее усиление, при котором регуляторная система, видимо, вполне способна увеличить поток вещества в цепи гликолиза в  $10^3$  раз (рис. 4-1).

Регуляция скорости в таком колоссальном диапазоне свойственна только гликогенолизу; ни в каких других путях метаболизма столь высокая степень активации не достигается. Исследование промежуточных продуктов при различных степенях активации гликогенолиза показало, что концентрации большинства из них (если не всех) при активации возрастают, но в значительно меньшей степени, чем общий поток вещества (Hintz et al., 1982). Именно поэтому для мощной активации мышечных ферментных систем во время кратковременной интенсивной работы нужны механизмы усиления. По той же причине столь важна каскадная регуляция гликогенфосфорилазы: трудно было бы понять, как без этой регуляции поток вещества мог бы увеличиваться в  $10^3$  раз, тогда как уровень главных промежуточных продуктов повышается менее чем в 10 раз. Система гликогенфосфорилазы служит, вероятно, самым важным механизмом запуска гликолиза в мышцах, однако эта система должна взаимодействовать по меньшей мере еще с одним регуляторным звеном в цепи гликолиза — с реакцией, катализируемой фосфофруктокиназой (ФФК).

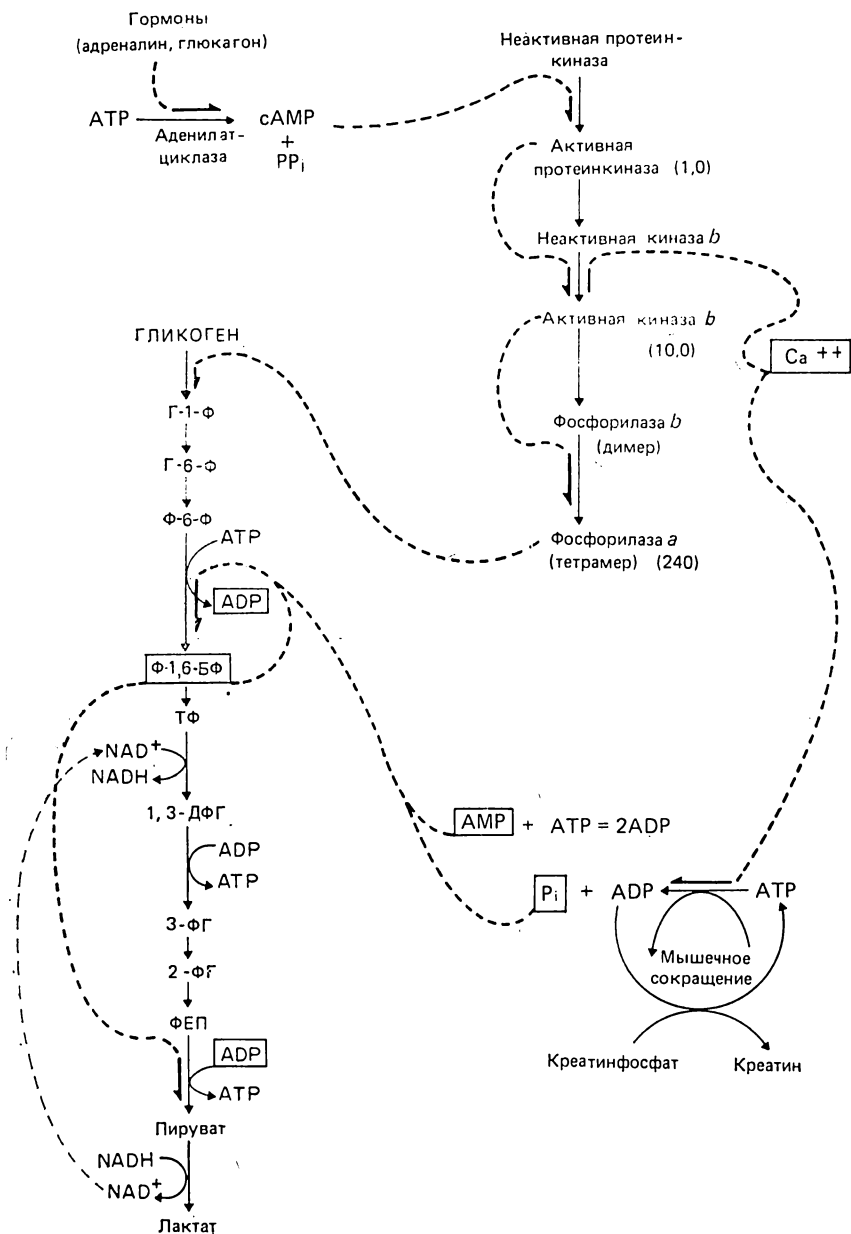


Рис. 4-1. Регуляция превращения гликогена в лактат в мышцах позвоночных. Цифры в скобках — отношения молярных концентраций ферментов каскадной системы. ТФ — триозофосфат.



### Регуляторные функции мышечной фосфофруктокиназы

Фосфофруктокиназа катализирует первый этап гликолиза, и поэтому уже давно полагают, что она должна выполнять важные регуляторные функции. Мышечная фосфофруктокиназа, как и фосфорилаза, существует в виде тканеспецифического изозима с особыми каталитическими и регуляторными свойствами, благодаря которым она приспособлена для обеспечения кратковременной интенсивной мышечной работы. У всех млекопитающих (Tsai et al., 1975) и большинства других животных, у которых изучались регуляторные функции фосфофруктокиназы (см. Storey, Hochachka, 1974a), эти функции основаны на взаимодействии фермента с обоими субстратами — фруктозо-6-фосфатом (Ф-6-Ф) и АТР. Кривая насыщения Ф-6-Ф при физиологических значениях рН типично сигмоидная, причем значение  $S_{0,5}$  близко к 0,1 мМ, т. е. соответствует физиологическим концентрациям Ф-6-Ф. Напротив, кривая насыщения АТР представляет собой гиперболу, и при физиологических концентрациях АТР (выше 1 мМ) кинетический порядок для фосфофруктокиназы меньше 1. Именно так и должен вести себя фермент метаболического пути, функции которого — синтез АТР: чем ниже уровень АТР *in vivo*, тем слабее его ингибирующее действие на фермент и тем выше каталитическая активность фермента.

Эти две важнейшие функциональные особенности уже сами по себе могут иметь большое значение для регуляции активности фосфофруктокиназы. Так, во время кратковременной интенсивной работы уровень Ф-6-Ф по мере активации гликолиза повышается, и это может ускорять его использование фосфофруктокиназой (положительная кооперативность) и подавлять ингибирующее действие АТР. В то же время снижение уровня АТР также будет уменьшать его ингибирующий эффект и увеличивать сродство фермента к Ф-6-Ф, а тем самым и скорость реакции. Все эти регуляторные процессы, действуя совместно, способствуют согласованию функции фосфофруктокиназы с активностью гликогенфосфорилазы, а также миозиновой АТРаза. Однако наряду со всем этим существуют и другие воздействия, благодаря которым регуляция на данном этапе гликолиза становится еще более гибкой. Важнейшие из этих воздействий — активация фосфофруктокиназы фруктозо-2,6-бисфосфатом, фруктозо-1,6-бисфосфатом, АМР, АDР,  $P_i$  и  $NH_4^+$ , а также ингибирование цитратом и CoA-производными жирных кислот.

Многие более ранние данные по этому вопросу рассмотрены в обзоре Tsai et al. (1975). Очень интересный подход к пониманию регуляции фосфофруктокиназы *in vivo* появился после того,

как был обнаружен самый мощный из всех известных активаторов этого фермента — фруктозо-2,6-бисфосфат (см. Fuguu, Uyeda, 1980). Это вещество образуется из Ф-6-Ф под действием специфического фермента и вызывает несколько важнейших эффектов: а) значительно увеличивает сродство фосфофруктокиназы к Ф-6-Ф и в то же время подавляет межучастковые

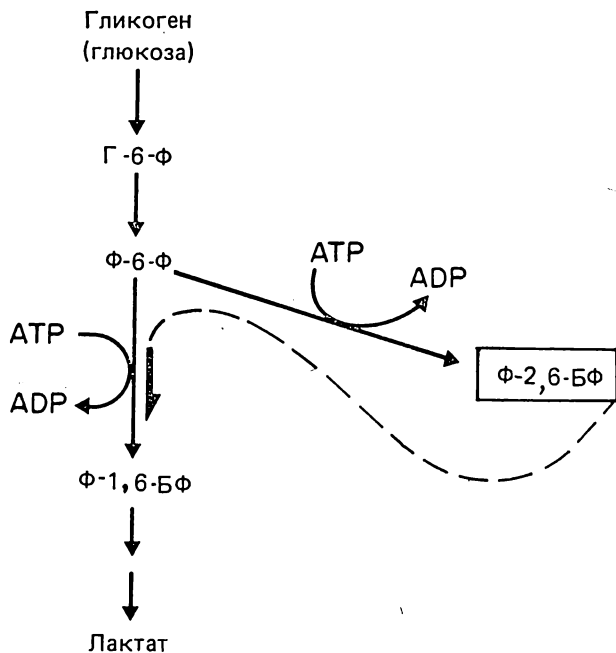


Рис. 4-2. Роль фруктозо-2,6-бисфосфата в регуляции активности мышечной фосфофруктокиназы.

кооперативные взаимодействия (кривые насыщения для Ф-6-Ф сдвигаются влево и становятся менее сигмовидными); б) увеличивает сродство фермента к его косубстрату — АТФ; в) снимает ингибирующее действие АТФ в высоких концентрациях; г) подавляет ингибирующий эффект цитрата; д) действует как синергист других мощных активаторов фосфофруктокиназы, в особенности АМР и  $P_i$  (см. Uyeda et al., 1981). В недавних экспериментах с перфузируемыми мышцами задней лапы крысы было показано, что во время активации гликолиза инсулином или адреналином концентрация Ф-2,6-бисФ возрастает в 2—4 раза: тем самым в работающих мышцах создается более благоприятный фон для протекания регуляторных процессов в изменившихся условиях (рис. 4-2).

Влияние ADP и Ф-1,6-бисФ на мышечную фосфофруктокиназу можно рассматривать как внесение аутокаталитического компонента в регуляцию ее активности: эти вещества — ближайшие продукты реакции, катализируемой фосфофруктокиназой, так что они фактически ускоряют свое собственное дальнейшее образование. Отчасти именно поэтому скорость фосфофруктокиназной реакции зависит от времени не линейно, а экспоненциально, что существенно способствует резкому усилению гликолиза при кратковременной интенсивной работе.

### **Роль ADP в согласовании активности фосфофруктокиназы и реакций гликолиза, протекающих с образованием АТФ**

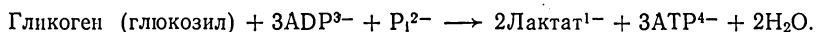
ADP играет еще одну важнейшую роль в регуляции гликолиза: будучи субстратом для фосфоглицераткиназы и пируваткиназы, он обеспечивает согласование активности этих ферментов с работой фосфофруктокиназы. Мышечная фосфоглицераткиназа — это высокоактивный фермент, кинетические свойства которого соответствуют его роли в процессах гликолиза. Так, он обладает очень высоким сродством к 1,3-дифосфоглицерату (в микромолярных концентрациях) и поэтому при большинстве физиологических условий, особенно при работе мышцы, насыщается этим субстратом. В то же время сродство фермента к ADP не столь велико, и поэтому кажущаяся константа Михаэлиса, совершенно очевидно, приходится на физиологические уровни концентрации ADP (Krietsch, Bücher, 1970). Таким образом, активность фосфоглицераткиназы *in vivo*, вероятно, регулируется доступностью ADP.

Что касается этапа, катализируемого пируваткиназой, то картина здесь сложнее. У беспозвоночных и низших позвоночных этот фермент активируется фруктозо-1,6-бисфосфатом по механизму прямой связи (см. рис. 4-1). Таким образом, Ф-1,6-бисФ играет роль сигнала, сопрягающего активность фосфофруктокиназы и пируваткиназы. Этот механизм усиливается по мере того, как в процессе гликолиза снижается pH (Ночачка, 1980; Storey, Hochachka, 1974 b). В мышцах млекопитающих такой механизм не действует, и сопряжение между двумя упомянутыми ферментами зависит в большей степени от ADP: это вещество образуется под действием одного из них и служит субстратом для другого. Кинетические свойства мышечной пируваткиназы (в особенности заметная положительная кооперативность при связывании субстратов) как нельзя лучше соответствуют роли этого изозима в процессах гликолиза в мышцах. В присутствии фосфоенолпирувата (ФЕП) константа диссоциации для связывания ADP свободным ферментом снижается от высокого, нефизиологического уровня ( $>2$  мМ

ADP) примерно до 0,2—0,3 мМ. Иными словами, присоединение ФЕП приводит к очень значительному (примерно десятикратному) увеличению сродства пируваткиназы к его косубстрату — ADP (Dann, Britton, 1978). Это означает, что для согласования активности мышечной пируваткиназы и мышечной фосфофруктокиназы необходимы два сигнала: ФЕП, образующийся через ряд промежуточных этапов из Ф1,6-бисФ (одного из продуктов реакции, катализируемой фосфофруктокиназой), и ADP, непосредственно образующегося под действием того же фермента. Первый из этих сигналов (ФЕП) необходим для того, чтобы пируваткиназа стала конкурентоспособной по отношению ко второму (ADP).

### Роль ADP в сопряжении анаэробного гликолиза с активностью АТРа<sub>3</sub>

Конечными продуктами анаэробного гликолиза (если рассматривать этот процесс при pH около 8, чтобы избежать сложностей со стехиометрией  $H^+$ ; Hochachka, Mommsen, 1983) являются лактат, АТР и вода:



Содержание аденилата в цитозоле мышечных клеток позвоночных составляет 3—8 мкмоль/г (Beis, Newsholme, 1975). Поэтому даже в том случае, если бы весь эндогенный ADP превратился в АТР, максимальная концентрация образовавшегося лактата составила бы  $\frac{2}{3}$  от содержания аденилата, т. е. не более чем примерно 6 мкмоль/г (на самом деле она была бы еще меньше, так как весь аденилат цитозоля не может быть представлен одним лишь ADP). Однако *in vivo* в мышцах млекопитающих уровень лактата может достигать 20—40 мкмоль/г, в белых мышечных волокнах голубого тунца — более 100 мкмоль/г (Guppy et al., 1979), а у водяных черепах во время ныряния — до 200 мкмоль/г (Ultsch, Jackson, 1982). Таким образом, лактата может накапливаться больше, чем образуется в приведенной выше реакции. Это кажущееся противоречие обусловлено не тем, что процессы превращения гликогена в лактат и фосфорилирования ADP разобщены, а скорее тем, что *in vivo* между деятельностью миозиновой АТРа<sub>3</sub> и гликолизом существует сопряжение и непрерывный гидролиз АТР служит источником ADP и способствует смещению реакции гликолиза вправо. Этой стороне регуляции гликолиза в обзорах уделяют мало внимания, хотя исследования на реконструированных гликолитических системах ясно показывают, что продуктивность гликолиза можно значительно повысить путем добавления АТРа<sub>3</sub> (Wu, Davis, 1981).

### Поддержание окислительно-восстановительного равновесия в ходе анаэробного гликолиза

Содержание гликогена в скелетных мышцах очень велико (порядка 100 мкмоль глюкозных остатков + гликогена на 1 г), и большая его часть (если не весь он) может быть превращена в лактат в процессе анаэробного гликолиза. В то же время общее содержание  $\text{NADH} + \text{NAD}^+$  значительно меньше — около 1 мкмоль/г. В связи с этим для того, чтобы анаэробный гликолиз мог протекать достаточно долго, необходимо все время вновь окислять  $\text{NADH}$ , образующийся на этапе глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Обычно полагают, что это достигается благодаря функциональному сопряжению 1:1 между этапом гликолиза, протекающим с окислением  $\text{NADH}$  (катализатор — ГАФДГ), и этапом с обратным восстановлением (катализатор — лактатдегидрогеназа); в результате процесс гликолиза продолжается и накапливается лактат. Однако имеется еще один механизм: у малатдегидрогеназы кинетические свойства (очень высокое сродство к  $\text{NADH}$  и оксалоацетату) таковы, что этот фермент хорошо приспособлен для функционирования на ранних стадиях активаций гликолиза. Его главный углеводный субстрат — оксалоацетат — образуется из аспартата путем трансаминирования при участии высокоактивного фермента аспартатаминотрансферазы. Содержание аспартата в мышцах беспозвоночных довольно велико ( $>10$  мкмоль/г), однако у позвоночных оно значительно ниже. В связи с этим у позвоночных малатдегидрогеназа может поддерживать окислительно-восстановительный баланс в ходе гликолиза лишь недолго, однако этого времени достаточно для того, чтобы накопилось определенное количество пирувата и повысилась конкурентоспособность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (Noshchik, 1980). Как полагают, по мере того как ЛДГ начинает выполнять свои функции по поддержанию окислительно-восстановительного равновесия, образующиеся вместе с лактатом ионы  $\text{H}^+$  стимулируют дальнейшую выработку лактата путем снижения  $K_m$  для пирувата. Этот последний механизм особенно важен, так как он увеличивает сродство ЛДГ к пирувату, по мере того как количество пирувата возрастает, достигая в отдельных случаях (например, у тунца) 1 мкмоль/г (Gurru et al., 1979). По-видимому, ЛДГ лучше выполняет все эти функции при анаэробной мышечной работе в том случае, когда она представлена определенным изотимом. Значение изотима  $M_4$  при анаэробной работе особенно четко видно при описанной недавно миопатии: у страдающих ею лиц в скелетных мышцах нет изотима  $M_4$ , и у них резко снижена способность к образованию лактата и к анаэробной мышечной работе (Capno et al., 1980).

## Буферная емкость мышц и способность их к анаэробной работе

Конечными продуктами при работе за счет фосфагенов являются креатин и  $P_i$ , и расходуется сравнительно немного протонов: при нормальном pH в реакциях, катализируемых креатинфосфокиназой и миозиновой АТразой, оборот 1 мкмоль АТР сопровождается потреблением 0,1 мкмоль  $H^+$  (Hochachka, Mommsen, 1983). У млекопитающих конечные продукты анаэробного распада гликогена — анионы лактата, вода и протоны; при этом на 1 мкмоль АТР, используемый в гликолитической и АТразной реакциях, образуется примерно 0,7 мкмоль  $H^+$ . Таким образом, во время длительной анаэробной работы pH мышц будет постепенно снижаться. Этот процесс не должен протекать бесконтрольно — здесь тоже необходима регуляция. Именно поэтому в мышцах с высокой активностью миозиновой АТразы, сочетающейся с большой интенсивностью гликолиза или по крайней мере с высокой толерантностью к аноксии, буферная емкость повышена.

Буферную емкость, не обусловленную бикарбонатами, измеряют в слайках (в честь известного специалиста по физиологии дыхания ван Слайка); эти единицы соответствуют числу микромолей основания, необходимых для того, чтобы изменить pH одного грамма сырой ткани на 1 (обычно в интервале от 6 до 7) (Castellini, Somero, 1981). Общую буферную емкость в слайках обозначают  $\beta$ . При исследовании группы рыб (Castellini, Somero, 1981) выявились большие межвидовые различия в активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и в  $\beta$ . Самые высокие значения обоих этих показателей были обнаружены у частично теплокровных рыб (тунцов), а самые низкие — у глубоководных видов (рис. 4-3). У мелководных эктотермных рыб были найдены промежуточные значения.

Межвидовые различия в активности ЛДГ и  $\beta$  у этих рыб можно легко объяснить разницей в их способности плавать и пищевом поведении (Sullivan, Somero, 1980). Один из крайних вариантов — это «теплокровные» рыбы, превосходящие всех других исследованных животных по активности ЛДГ и буферной емкости мышц. Эти рыбы необычайно быстро плавают, и при этом в их мышцах образуется очень много лактата. Напротив, глубоководные рыбы обычно передвигаются медленно и предпочитают поджидать добычу на одном месте. В соответствии с этим в белых мышечных волокнах таких рыб способность к образованию лактата и величины  $\beta$  невелики. Что касается мелководных эктотермных рыб, то оба этих показателя у них в известной степени варьируют и между ними существует некоторая корреляция.

Значения  $\beta$  в красных мышечных волокнах рыб намного

ниже, чем в белых, и это вполне соответствует функциональным и морфологическим различиям между обоими типами волокон (см. выше). Так, даже у «теплокровных» рыб  $\beta$  в красных мышечных волокнах составляет лишь около 50 слайков. Очевидно, что буферная емкость той или иной ткани тонко регулируется в соответствии со способностью этой ткани генерировать прото-

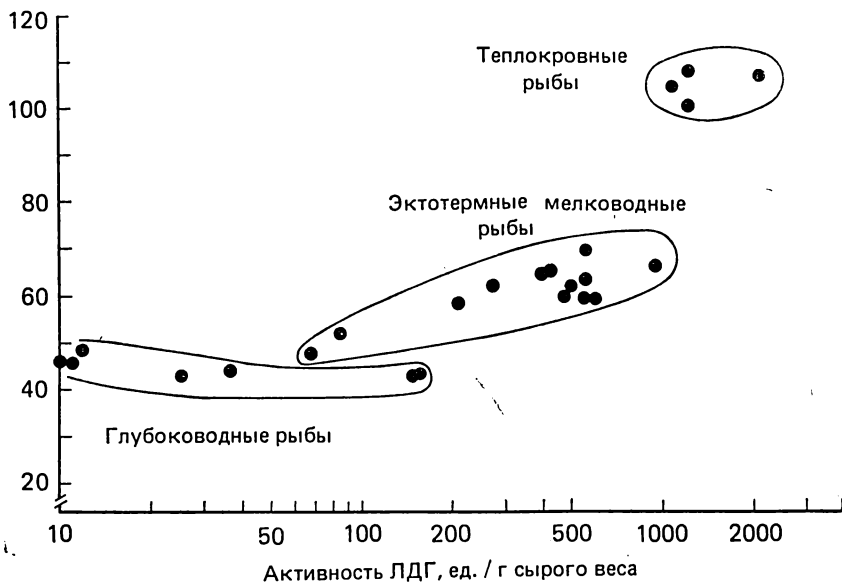


Рис. 4-3. Зависимость между активностью ЛДГ в белой скелетной мускулатуре различных морских костистых рыб и буферной емкостью ( $\beta$ ) мышечной ткани. Все рыбы разбиты на три группы: теплокровные (тунцы), мелководные эктотермные и глубоководные. Буферная емкость выражена в микромолях основания, необходимых для сдвига pH одного грамма ткани на 1 (приблизительно от 6 до 7). Активность ЛДГ выражена в единицах активности на 1 г сырого веса мышцы при температуре измерения, равной 10°C. (По Castellini, Someo, 1981, с изменениями.)

ны. Эта закономерность выявляется не только у рыб, но и у других животных (ссылки на литературу можно найти у Someo, 1981) — как при кратковременной быстрой локомоции, так и в тех случаях, когда анаэробные процессы протекают не столь интенсивно, но достаточно длительно (см. ниже).

Что касается млекопитающих, то буферная емкость локомоторных мышц чрезвычайно высока у большинства морских (ныряющих) животных и у видов, способных к очень быстрым коротким пробежкам (например, у кролика) (Castellini, Someo, 1981). Полезно будет подробно рассмотреть связь между анаэробными процессами, буферной емкостью мышц и содер-

жанием в них миоглобина у ныряющих животных. У морского млекопитающего, способного дольше всего задерживать дыхание при нырянии, — тюленя Уэдделла — уровень лактата в крови обычно повышается лишь спустя примерно 20 минут после погружения (Кооутан et al., 1980). До этого времени в мышцах протекают аэробные процессы, и важную роль здесь играет высокое содержание миоглобина в плавательной мускулатуре. Когда же примерно через 20 минут начинает возрастать концентрация лактата, длительность дальнейшего пребывания под водой, вероятно, зависит уже от высокой буферной емкости мышц. Следует отметить, что активность мышечной лактатдегидрогеназы у ныряющих млекопитающих обычно не выше, чем у наземных (коровы, свиньи, собаки; см. Castellini et al., 1981). Способность ныряющих животных долго выполнять мышечную работу в отсутствие кислорода обусловлена не тем, что у них с большей скоростью образуются конечные продукты, а тем, что ткань лучше справляется с накоплением протонов. В соответствии со всем сказанным выше тесная корреляция между  $\beta$  и содержанием миоглобина у млекопитающих, особенно у ныряющих видов, не вызывает удивления: благодаря большой концентрации миоглобина удлиняется период аэробного энергообеспечения, а высокий уровень  $\beta$  представляет собой адаптивный механизм, включающийся после того, как запас кислорода, связанного с миоглобином, исчерпывается.

Сходные взаимоотношения между буферной емкостью мышц и их способностью к кратковременной интенсивной работе характерны и для беспозвоночных. Например, у кальмара буферная емкость мускулатуры мантии выше, чем мышц плавников. У некоторых брюхоногих моллюсков наибольшая буферная емкость обнаружена в мощной мышце, стягивающей ногу. У ракообразных  $\beta$  в сгибателях хвоста выше, чем в мышцах конечностей. Сравнительные исследования показали, что в сгибателях хвоста различных видов ракообразных  $\beta$  коррелирует с относительными размерами этих мышц, общим содержанием в них аргинина и аргининфосфата и активностью аргининкиназы и лактатдегидрогеназы, отнесенной к 1 г массы (England, Baldwin, личное сообщение). Таким образом, и у этих животных буферная емкость мышц, видимо, соответствует их способности к выполнению анаэробной работы.

#### Стратегии адаптации к кратковременной интенсивной работе (резюме)

При обсуждении типов адаптивных реакций (см. гл. 1) мы говорили о том, что все эти механизмы биохимической адаптации можно разбить на три основные группы:



- 1) адаптация ферментных систем;
- 2) адаптация околоферментной среды;
- 3) адаптация продуктивности метаболических путей.

Очевидно, что для адаптации к кратковременной интенсивной работе (по крайней мере у позвоночных животных) используются механизмы всех трех типов. Имеют место как количественные, так и качественные изменения ферментных систем. В белых мышечных волокнах активность гликолитических ферментов выше, чем где бы то ни было в организме, и во всех звеньях гликолитического пути катализаторами служат тканеспецифические изоцимы с такими каталитическими и регуляторными свойствами, какие нужны для кратковременной интенсивной работы.

Внутриклеточная среда, в которой действуют гликолитические ферменты мышц, может быть адаптирована по меньшей мере тремя способами. Во-первых, в мышечных клетках, обычно в виде  $\beta$ -гранул, запасаются большие количества гликогена (около 100 мкмоль глюкозных остатков на 1 г), а гликогенфосфорилаза и большая часть ферментов ее регуляторного каскада буквально «облепляют» эти гранулы. Во-вторых, повышение гликолитической способности белых мышечных волокон сопровождается соответственным увеличением буферной емкости клеток за счет имидазолов и, в-третьих, небольшие сдвиги рН, а также величины  $[H^+]/[OH^-]$ , неизбежно возникающие при кратковременной интенсивной нагрузке, облегчают или регулируют работу ключевых ферментов гликолиза.

Третий механизм — адаптацию продуктивности метаболического пути — нельзя рассматривать просто как сумму адаптаций ферментов и околоферментной среды. Это связано с тем, что многие механизмы, регулирующие гликолиз в мышце, не относятся к самой гликолитической системе. Важнейший из этих механизмов — регуляторный каскад, запускаемый в результате активации аденилатциклазы гормонами. Существуют и другие механизмы —  $Ca^{2+}$ -кальмодулиновая активация, «шунты» (например, фруктозобисфосфатазный путь) и такие вспомогательные факторы, как, например, участие малатдегидрогеназы в поддержании окислительно-восстановительного баланса на ранних стадиях активации гликолиза. Благодаря совместному действию всех этих механизмов анаэробный гликолиз у человека во время кратковременной интенсивной работы может усиливаться в 2000 раз. Это уникальная особенность, совершенно не характерная для метаболической регуляции и метаболических процессов вообще; она выработалась в мышцах позвоночных как механизм, дополняющий при кратковременной высокой нагрузке регенерацию АТФ за счет креатинфосфата. Поскольку потенциальная интенсивность метаболизма и его

регуляция варьируют у разных видов животных и в разных тканях в зависимости от способности к кратковременной интенсивной работе, мы вправе заключить, что эти особенности явились результатом отбора и адаптации. Однако все перечисленные выше процессы могут поддерживать интенсивную работу в лучшем случае лишь очень недолгое время — например, у человека 2—3 минуты, а у тунца 5—10 минут. При более длительных нагрузках неизбежно должны вовлекаться процессы окислительного метаболизма, и возникает вопрос: каким образом аэробный обмен приспосабливается к условиям длительной работы?

### **Повышенная способность к окислительным процессам у красных мышечных волокон и волокон промежуточного типа**

Если максимальная интенсивность анаэробной работы определяется каталитической способностью ферментов гликолиза, то при аэробном энергоснабжении пределы мощности *зависят от каталитического потенциала окислительных систем* — главным образом в красных и промежуточных мышечных волокнах. Именно поэтому практически у всех позвоночных уровень окислительных ферментов в красных волокнах обычно выше, чем в белых (см. табл. 4-6). Эти различия сопровождаются и соответствующей разницей в количестве и ультраструктуре митохондрий (см. выше). С биохимической адаптацией такого типа мы уже встречались: она заключается просто в том, что обычные каталитические системы усилены в чисто количественном отношении.

### **От чего зависит общее количество энергии, получаемой при работе в аэробных условиях?**

Принципиальное различие между анаэробным и аэробным энергообеспечением станет ясным, если мы рассмотрим общее количество энергии, которая может вырабатываться при этих процессах. Анаэробные процессы протекают фактически в условиях замкнутой системы: общее количество энергии, которая может быть высвобождена, зависит от внутренних запасов субстрата (главным образом гликогена). Наоборот, при аэробной работе мышцы остаются открытой системой — они все время снабжаются кровью и благодаря этому получают углерод и энергию из центральных депо. Общее количество энергии при такой работе зависит как от эндогенных запасов субстрата, так и от поставок извне. Основные эндогенные субстраты, которые могут использоваться в метаболизме красных мышеч-

ных волокон, — это гликоген и жиры. В красных и промежуточных волокнах имеются запасы обоих видов «топлива», но особенно много здесь жиров. Кроме того, общее количество доступной энергии зависит от наличия субстратов в других депо — жира в жировой ткани и гликогена в печени.

### Взаимоотношения между обменом глюкозы и жиров

В настоящее время хорошо известны реципрокные взаимоотношения между метаболизмом глюкозы и жиров и широко распространено мнение, что при активации катаболизма жиров снижается окисление глюкозы. Это можно частично объяснить влиянием цитрата на фосфофруктокиназу: при усиленном окислении жирных кислот содержание цитрата возрастает до такого уровня, при котором он ингибирует этот фермент (Tsaï et al., 1975). Хотя известен ряд модуляторов, способных снять ингибирующее действие цитрата на фосфофруктокиназу (AMP,  $\text{NH}_4^+$ , фруктозо-2,6-бисфосфат и др.), представления о реципрокных отношениях между обменом жиров и углеводов прочно укоренились в литературе, и обычно считают, что одновременный распад обоих субстратов — это скорее исключение, чем правило. Поэтому для читателя, возможно, будет неожиданностью тот факт, что длительная и интенсивная работа мышц в аэробных условиях лучше всего обеспечивается при одновременном распаде глюкозы и жиров.

### Углеводы и жиры как источники энергии для длительной работы

У человека запасы углеводов способны поддерживать работу, близкую к максимальной нагрузке, в течение всего лишь 20—30 минут. В отличие от этого запасы жира достаточны для того, чтобы довольно интенсивная работа могла продолжаться в течение нескольких суток. Чтобы понять пользу одновременного катаболизма жиров и глюкозы, важно учитывать то, что скорость выработки энергии (а потому и интенсивность работы) при распаде одних лишь жиров примерно вдвое меньше, чем при распаде углеводов или же углеводов вместе с жирами (см. табл. 4-2). Почему это так, не совсем понятно, ибо известно, что жиры в расчете на единицу массы представляют собой более эффективное «топливо», чем углеводы. Здесь могли бы играть роль следующие факторы:

1. Гликоген более эффективен, чем жиры, в отношении *выхода энергии на 1 моль потребленного  $\text{O}_2$* : при его распаде на 1 моль  $\text{O}_2$  образуется 6,2 моль АТФ, а при окислении жиров — 5,6 моль АТФ.

2. Когда работающие мышцы используют свободные жирные кислоты, поступающие с кровью, а не эндогенные триацилглицеролы, скорость использования этих кислот зависит от их концентрации. Поскольку эта концентрация мала, она может стать *лимитирующим фактором*. У человека содержание свободных жирных кислот в крови составляет около 0,5 мкэкв/л, и хотя оно повышается во время физической нагрузки, оно никогда не становится достаточным для насыщения системы их катаболизма. Возможно, это связано с тем, что жирные кислоты переносятся кровью в соединении с альбумином.

3. При  $\beta$ -окислении образуется ацетил-СоА, поступающий в цикл Кребса. Скорость реакций этого цикла возрастает главным образом при повышении стационарных концентраций его промежуточных продуктов (см. ниже). При максимальной физической работе, когда запасы гликогена (и глюкозы) в мышцах и во всем организме снижаются, уровень промежуточных продуктов цикла Кребса может оказаться недостаточно высоким (обычно эти продукты образуются из аминокислот и промежуточных продуктов гликолиза). Таким образом, полный переход работающих мышц на жиры как единственный источник углерода и энергии может приводить к подавлению важного механизма стимуляции цикла Кребса. А это в свою очередь может снижать скорость синтеза АТФ и, следовательно, выработки энергии.

### «Компромисс» между двумя основными субстратами

Таким образом, гликоген — это, по-видимому, наилучшее «топливо» для аэробного обеспечения высокоинтенсивной работы, однако запасы его ограничены, и поэтому долго работать на одном гликогене мышцы не могут. Не удивительно, что природа пошла на компромисс: при интенсивной работе (по крайней мере у человека), продолжающейся 2—3 часа или дольше, используются *и гликоген, и жиры*. При этом дыхательный коэффициент (Д. К.) составляет около 0,9, а это значит, что около 65% потребляемого  $O_2$  идет на окисление гликогена, а остальная часть — главным образом на окисление жирных кислот. При длительной аэробной работе это соотношение, по-видимому, постепенно снижается, т. е. чем дальше, тем большим становится вклад жиров в общую выработку энергии.

Поскольку запасы гликогена меньше, чем запасы жиров (см. табл. 4-4), длительность интенсивной аэробной работы обычно лимитируется именно поставкой гликогена. Действительно, у человека максимальная работа с аэробным энергообеспечением всецело зависит от гликогена мышц: существует тесная корреляция между длительностью работы до полного из-

неможения и содержанием гликогена в мышцах в начале работы (Holloszy, Booth, 1976).

Если одновременное расщепление обоих субстратов невозможно (например, при полном исчерпании запасов гликогена в мышцах), приходится использовать в основном энергию жиров. Именно это и происходит при длительной работе, и такая стратегия, безусловно, полезна; но, как уже говорилось, при этом выработка энергии составляет лишь 60% или менее от максимальной энергопродукции при аэробном распаде гликогена. Кроме того, когда запасы гликогена в мышцах кончаются, мышцы переходят на использование экзогенных свободных жирных кислот и эндогенных триацилглицеролов, в то время как в крови поддерживается достаточно высокий уровень глюкозы для питания мозга и других тканей (например, мозгового слоя почек), нормальный метаболизм которых должен обеспечиваться всецело или преимущественно глюкозой. В этот период антагонистические взаимоотношения между распадом жиров и глюкозы становятся особенно важными.

Таким образом, при переходе от покоя к длительной интенсивной работе сначала имеет место тщательно регулируемая утилизация обоих субстратов (жира и гликогена), а затем — полный переход мышц на расщепление жиров и одновременно сбережение глюкозы для удовлетворения минимальной потребности в ней организма. Такие функциональные перестройки связаны не просто с увеличением или уменьшением количества ферментов, а с изменением их качественного состава. Как и в случае перехода к гликолизу, при адаптации всей системы метаболизма к аэробной работе происходят не только грубые изменения в числе «аэробных» мышечных волокон и каталитическом потенциале окислительных ферментов, но и более тонкие адаптации для оптимального использования этого потенциала, т. е. для регуляции мышечного метаболизма и его интеграции с обменными процессами в других тканях.

#### Иницирующие этапы в использовании жиров мышцами

Очевидно, что двумя главными источниками жиров для процессов  $\beta$ -окисления в мышцах могут служить эндогенные триацилглицеролы и экзогенные свободные жирные кислоты. Хотя утилизация эндогенных триацилглицеролов в красных мышцах птиц, насекомых и рыб была обнаружена уже давно, только в 1971 г. она была четко продемонстрирована и в скелетных мышцах человека. В первые полчаса длительной физической нагрузки внутримышечные триглицериды у человека примерно наполовину обеспечивают общую выработку энергии. Однако по мере дальнейшей работы все больший вклад начи-

нают вносить свободные жирные кислоты. При беге на 100 км (в среднем за 8 часов 49 минут!) внутриклеточное содержание липидов снижается примерно на 7%, что соответствует примерно четверти общих энергозатрат. При столь длительной нагрузке остальные три четверти обеспечиваются за счет свободных жирных кислот, поступающих из жировой ткани (Howald et al., 1978). Хотя мышечная триацилглицероллипаза детально не изучена, хорошо исследован гомологичный фермент сердечной мышцы. Мышечная триацилглицероллипаза, так же как и соответствующий фермент жировых клеток, обладает двумя особенностями, необходимыми для инициации метаболической цепи: она 1) может находиться во «включенном» или «выключенном» состоянии и 2) обеспечена субстратами до уровня насыщения. Поэтому поток вещества в цепи распада жиров, начинающейся от триацилглицеролов, прямо пропорционален количеству триацилглицероллипазы в активной форме.

Что касается иницирующего этапа в окислении экзогенных свободных жирных кислот, то здесь картина не столь ясна. Общеизвестно, что скорость окисления свободных жирных кислот в мышце зависит от наличия субстратов и потребности в них. Метаболизм жирных кислот мог бы регулироваться на уровне образования ацил-СоА или поступления в цикл Кребса, однако для  $\beta$ -окисления таких регуляторных механизмов не было найдено. По-видимому,  $\beta$ -окисление регулируется главным образом окислительно-восстановительным состоянием митохондрий (Vary et al., 1981). Кроме того, ни один из известных регуляторных механизмов не отвечает основным требованиям, предъявляемым к иницирующему этапу. В связи с этим Newsholm (1978) полагает, что путь расщепления свободных жирных кислот в работающих мышцах фактически начинается с триацилглицеролов жировой ткани. В таком случае ферментом, ответственным за инициацию окисления свободных жирных кислот в *мышцах*, служит триацилглицероллипаза *жировых клеток*.

### Контроль мобилизации жиров в жировой ткани

Поскольку в жировой ткани липолиз протекает одновременно с этерификацией (триацилглицеролы распадаются до жирных кислот, которые снова активируются и этерифицируются с образованием триацилглицеролов), скорость мобилизации триацилглицеролов определяется разностью между скоростями этих двух процессов. Процесс липолиза регулируется главным образом гормоночувствительной триацилглицероллипазой, оказывающей также некоторое вторичное влияние на метаболизм,

а этерификация — по-видимому, в основном метаболическими факторами.

Регуляция активности гормоночувствительной липазы принципиально сходна с регуляцией активности гликогенфосфорилазы (см. выше). Так же как и гликогенфосфорилаза, триацилглицероллипаза занимает ключевое положение в метаболической цепи: она катализирует первый этап катаболизма жиров, от которого зависит скорость процесса в целом, и может переходить из неактивной формы *b* в активную фосфорилированную форму *a* (Steinberg, Khoo, 1977). Во время физической нагрузки уровень липолитических гормонов (адреналина, глюкагона и норадреналина) в крови повышается, а инсулина — падает, и это приводит к активации аденилатциклазы, связанной с клеточной мембраной. Активированная аденилатциклаза запускает регуляторный каскад, сходный с тем, который активирует гликогенфосфорилазу. Вся эта система была лучше всего изучена на жировой ткани крысы, однако при исследовании жировой и даже сердечной ткани человека и птиц у гормоночувствительных липаз были тоже обнаружены сходные регуляторные свойства. Как видно из рис. 4-4, триацилглицероллипаза — это лишь одна из по меньшей мере трех ацилгидролаз, участвующих в полном липолизе резервных жиров. Интересно, что недавно были получены данные о возможном сходном механизме активации диацилглицеролгидролазы и моноацилглицеролгидролазы с участием протеинкиназ. Однако абсолютная величина каталитической активности этих гидролаз намного выше, чем у триацилглицероллипазы; поэтому даже после активации протеинкиназы этапом, лимитирующим скорость мобилизации жира, вероятно, остается гидролиз первой эфирной связи (Steinberg, Khoo, 1977).

Таким образом, совместное воздействие липолитических гормонов, антилиполитических гормонов (инсулина) и ряда метаболитов (жирных кислот, ацил-CoA, CoA-SH, и др.) подготавливает а) регулируемую мобилизацию основных запасов жира в организме (триацилглицеролов жировой ткани), б) их доставку мышцам в виде жирных кислот, связанных с альбумином, и в) активацию  $\beta$ -окисления в мышцах.  $\beta$ -Окисление приводит к образованию ацетил-CoA, поступающего в цикл Кребса. Рассмотрим теперь, как регулируется сам этот цикл.

### Общие принципы регуляции цикла Кребса

Как мы уже отмечали, адаптация анаэробного метаболизма к кратковременной интенсивной работе связана с изменением как количества ферментов в мышечной ткани, так и их изозимного состава. Тканеспецифические изозимы ферментов — это

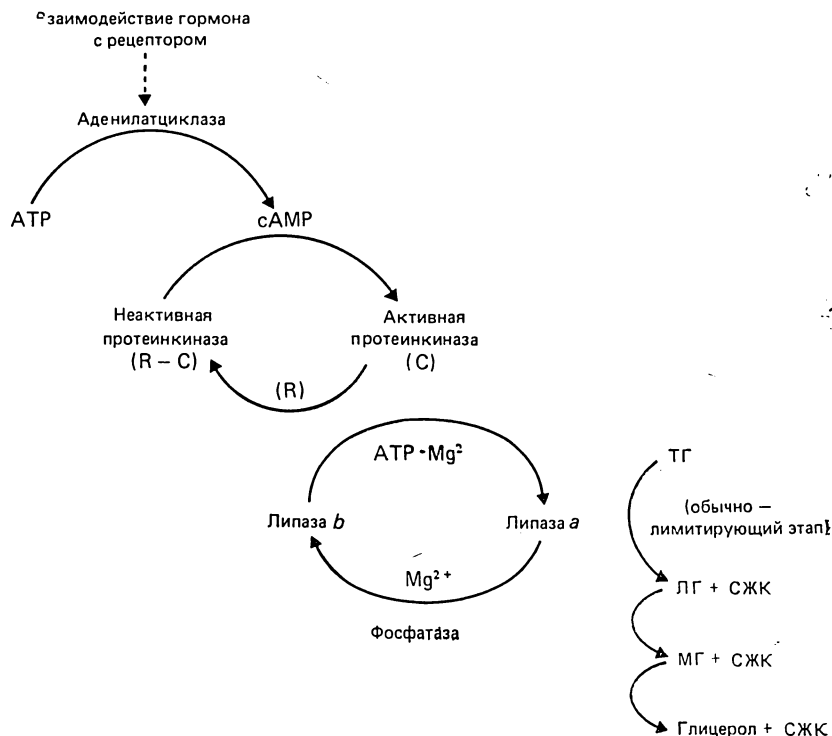


Рис. 4-4. Ферментный каскад, ответственный за регуляцию гидролиза три-, ди- и моноацилглицеролов (ТГ, ДГ и МГ), катализируемого липазой. (См. Steinberg, Khoo, 1977.)

одно из важных средств адаптации, благодаря которому анаэробный гликолиз в мышцах исключительно хорошо соответствует требованиям кратковременной интенсивной работы. В принципе обе стратегии — и количественное, и качественное изменение ферментов — могли бы быть использованы для адаптации цикла Кребса к условиям мышечной работы. Интересно, однако, что качественная стратегия в данном случае если и используется, то редко. Хотя, как мы уже знаем, содержание ферментов цикла Кребса в красных мышцах велико — иногда на порядок выше, чем в белых (Guppy et al., 1979), обычно эти ферменты не представлены тканеспецифическими изозимами. Таким образом, каталитические и регуляторные свойства ферментов цикла Кребса в красных мышцах те же, что и в любой другой ткани. Это означает, что в основе регуляции цикла Кребса в мышечных клетках при переходе от покоя к активности лежат изменения в составе и содержании метаболитов.



### Регуляция цикла Кребса

Если рассматривать этот цикл изолированно, важнейшей его особенностью окажется то, что ацетильные остатки распадаются в нем без какого-либо изменения количеств промежуточных продуктов. Таким образом, *этот процесс носит циклический и каталитический характер* — промежуточные вещества в нем не накапливаются и не расходуются. Отдельно взятый цикл Кребса можно рассматривать как «суперфермент», катализирующий расщепление ацетил-СоА. Хотя это, безусловно, упрощенная картина, она в некотором отношении полезна: становится ясно, что простейший способ ускорить окисление ацетил-СоА состоит в «ускорении оборота» цикла Кребса без каких-либо изменений в содержании промежуточных веществ. Такой способ регуляции должен отвечать двум фундаментальным требованиям. Первое из них состоит в том, что по крайней мере один из ферментов должен существовать в двух формах — высокоактивной и малоактивной («включенной» и «выключенной»). В цикле Кребса известны три таких фермента: цитратсинтаза (ЦС),  $\text{NAD}^+$ -изоцитратдегидрогеназа (на первом участке цикла) и 2-оксоглутаратдегидрогеназа (на втором участке цикла). На цитратсинтазу сильное регуляторное влияние оказывают аденилаты и  $\text{CoA-SH}$ . Активность изоцитратдегидрогеназы тоже регулируется аденилатами, причем  $\text{ADP}$  — абсолютно необходимый аллостерический активатор катализа. 2-Оксоглутаратдегидрогеназу ингибирует продукт ее собственной реакции —  $\text{NAD}$ . Таким образом, любые изменения в окислительно-восстановительном состоянии митохондрий, в количестве  $\text{CoA-SH}$  или в соотношениях между концентрациями  $\text{ATP}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{AMP}$  и  $\text{P}_i$ , которые возможны при переходе от покоя к мышечной работе, могут приводить к совместной активации всех этих ферментов (если нет никаких лимитирующих факторов). Иными словами, если в покое количество субстрата для любого из этих ферментов достигает уровня насыщения, то поток вещества в цикле Кребса может увеличиваться просто в результате ускорения оборота (т. е. увеличения количества активных молекул ферментов в ключевых звеньях). То, что *ферментативные реакции не должны лимитироваться количеством субстрата*, — это второе важнейшее условие для данного простейшего регуляторного механизма. К сожалению, в покоящихся мышцах такое условие не соблюдается. Согласно наиболее достоверным из имеющихся данных, работу по крайней мере одного из трех «ключевых» ферментов (цитратсинтазы) явно ограничивает чрезвычайно низкая концентрация оксалоацетата. Кроме того, весьма вероятно, что функциониро-

вание изоцитратдегидрогеназы и оксоглутаратдегидрогеназы тоже лимитируется количествами изоцитрата и 2-оксоглутарата соответственно. Именно поэтому для того, чтобы ускорить оборот цикла Кребса, необходимо одновременно повысить содержание его промежуточных продуктов.

### Повышение концентраций промежуточных продуктов цикла Кребса

Существует много различных путей, по которым промежуточные вещества могут либо выводиться из цикла Кребса, либо поступать в него (см. гл. 2). Например, в летательных мышцах перепончатокрылых, способных очень интенсивно вырабатывать энергию, углерод пирувата с помощью пируваткарбоксилазы перебрасывается с главного пути аэробного гликолиза в митохондриальный пул оксалоацетата, откуда может переходить в другие промежуточные вещества цикла Кребса, пополняя их количества. В летательных мышцах мясной мухи и мухи цеце, а также в мускулатуре мантии кальмара пролин может подвергаться полному окислению, но может также служить источником углерода для цикла Кребса (Mottsen, Hochachka, 1981). В принципе эти вещества могли бы в известной мере выполнять ту же функцию и в мышцах млекопитающих, однако в этом отношении они играют здесь значительно меньшую роль, чем аспартат и фосфоенолпируват. Из аспартата при участии двух аминотрансфераз образуется оксалоацетат, поступающий в цикл Кребса (рис. 4-5). При этом накапливается аланин, и в некоторых случаях, например в сердечной мышце, где данный путь служит главным источником пополнения для цикла Кребса, образование аланина становится количественно равным прибавке всех промежуточных продуктов цикла Кребса, вместе взятых. В скелетных мышцах наряду с этим механизмом существует еще один: в них содержится значительное количество ФЕП-карбоксикиназы, способной перебрасывать углерод с главного гликолитического пути в цикл Кребса, когда реакции этого цикла нужно усилить при интенсивном расщеплении жиров. Таким образом, в каждой конкретной ткани и при каждом уровне нагрузки метаболиты могут оказывать специфическое влияние, направленное на подгонку скорости оборота цикла Кребса к текущим потребностям. В принципе очень сходные механизмы координируют функции цикла Кребса и системы переноса электронов; эти механизмы еще только начинают выясняться и требуют дальнейшего тщательного изучения.

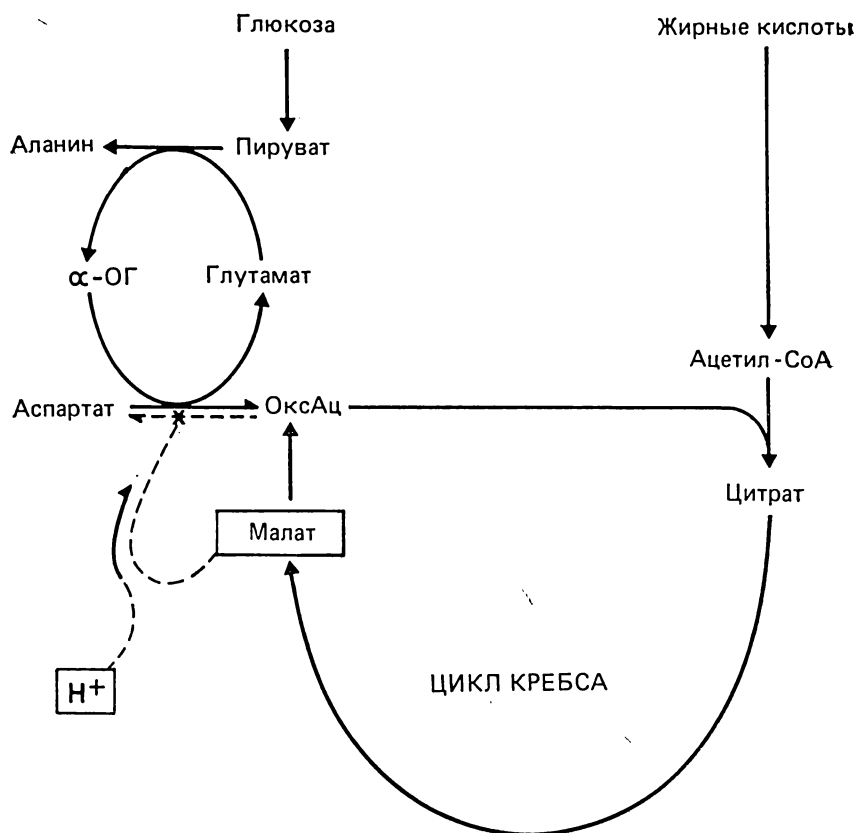


Рис. 4-5. Преимущественное направление реакции, катализируемой аспартат-аминотрансферазой, при усилении функции цикла Кребса. Сродство митохондриального фермента к аспартату примерно в 5 раз выше, чем цитоплазматического, и поэтому фермент митохондрий эффективно конкурирует за внутримитохондриальный аспартат. С другой стороны, его  $K_m$  для оксалоацетата примерно в 10 раз выше концентрации этого вещества в митохондриях, и это тоже способствует протеканию реакции в направлении оксалоацетата. Кроме того, во время активации цикла Кребса повышается концентрация малата — мощного ингибитора обратной реакции. Действие малата потенцируется низким pH. (По Hochachka, Storey, 1975, с изменениями.) α-ОГ — α-оксоглутарат.

### Регуляция митохондриального дыхания и фосфорилирования

Конечными продуктами цикла Кребса являются  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , гуанозинтрифосфат, NADH и  $\text{FADH}_2$ . Последние два соединения через дыхательную цепь передают протоны и электроны

на  $O_2$ , и этот процесс сопряжен с фосфорилированием. In vivo должны действовать механизмы, обеспечивающие точное согласование между скоростями окислительного фосфорилирования в митохондриях и использования АТФ миоциновой АТФазой. Это явление, названное дыхательным контролем, наблюдается во всех аэробных клетках, в том числе и в работающих мышечных волокнах (Chance et al., 1981).

Существуют три главные теории дыхательного контроля. Согласно самой ранней из них, интенсивность тканевого дыхания в зависимости от количества ADP может изменяться в пределах от состояния 3 до состояния 4. Вторая теория заключается в том, что параметром, определяющим в каждый момент времени потребление кислорода, служит немитохондриальный потенциал фосфорилирования  $[ATP]/([ADP] \cdot [P_i])$ . Наконец, согласно третьей теории, дыхательный контроль зависит в основном от соотношения  $[ATP]/[ADP]$  и мало зависит от  $[P_i]$  (источники см. у Jacobus et al., 1982).

Вопрос о дыхательном контроле остается спорным. Недавно было показано, что концентрация свободного ADP в тканях, возможно, значительно ниже тех величин, которые были получены при измерении концентраций ADP в кислых клеточных экстрактах. Это серьезный аргумент против второй и третьей (см. выше) теорий дыхательного контроля. Поскольку эти новые значения  $[ADP]$  соответствуют тому уровню, при котором дыхательные процессы в митохондриях обычно протекают очень медленно, непонятно, каким образом эти процессы могут активно протекать в условиях, которые, казалось бы, тормозят их (при высоком потенциале фосфорилирования или высокой величине  $[ATP]/[ADP]$ ). Это противоречие, по-видимому, было разрешено в недавних исследованиях (Jacobus et al., 1982). Авторам удалось в эксперименте разделить два важнейших параметра — доступность ADP для  $F_1$ -АТФ-синтетазы и отношение  $[ATP]/[ADP]$  во немитохондриальной среде. Оказалось, что скорость дыхательных процессов в состоянии 3 коррелирует с абсолютным значением  $[ADP]$ . Таким образом, *самое правдоподобное объяснение дыхательного контроля состоит в том, что он зависит от доступности ADP для АТФ-синтетазы* (а также, возможно, от кинетики переноса ADP внутрь митохондрий адениннуклеотид-трансферазой). Особенно интересно то, что кажущаяся  $K_M$  для ADP в митохондриях сердечной мышцы, если оценивать ее по экзогенному ADP, близка к 15 мкМ. В отличие от этого кажущаяся  $K_M$  для ADP в митохондриях печени составляет примерно 50—70 мкМ (Jacobus et al., 1982; McGilvary, 1975). Если же оценивать  $K_M$  по эндогенному ADP с использованием цитозольной и митохондриальной креатинфосфокиназы, то эта разница становится еще боль-

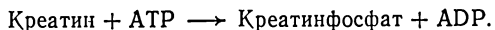
ше. Возможно, она обусловлена либо структурными различиями между митохондриями печени и миокарда, либо существованием изозимов АТР-синтетазы (см. Hochachka et al., 1983).

### Роль креатинфосфата в переносе энергии

Теперь считается общепризнанным, что креатинфосфат и креатинфосфокиназа (КФК) играют важную роль в процессах аэробного энергообеспечения сердца и скелетных мышц (Bessman, Geiger, 1981). Как уже упоминалось, ММ-форма креатинфосфокиназы находится в цитозоле (это так называемая «растворимая» форма), а также в толстых миофиламентах и на мембранах саркоплазматического ретикулума, тогда как изозим КФК<sub>м</sub> связан с наружной поверхностью внутренней мембраны митохондрий. Более 10 лет считалось, что митохондриальный изозим участвует совместно с процессами окислительного фосфорилирования в образовании креатинфосфата и тем самым обеспечивает субстратом креатинфосфокиназу цитоплазмы. Этот креатинфосфат используется ею для образования АТР, необходимого для цикла возбуждение — сокращение — расслабление (рис. 4-6). Многие данные в пользу этого представления рассмотрены в обзоре Bessman, Geiger (1981). Здесь достаточно лишь указать, что одно из наиболее убедительных свидетельств роли креатинфосфата в переносе энергии было получено в экспериментах с изотопами: они показали, что процессы окислительного фосфорилирования могут поставлять АТР для цитоплазматической креатинфосфокиназы, причем этот АТР не смешивается с немитохондриальным АТР. Такой результат вполне соответствует челночной модели (рис. 4-6), но его трудно объяснить с каких-либо других позиций.

### Роль митохондриальной креатинфосфокиназы

Поскольку роль КФК<sub>м</sub>, возможно, состоит в переносе АDP с помощью аденилаттрансферазы к F<sub>1</sub>АТР-синтетазе, направление реакции *in vivo* следующее:



Исследование кинетики КФК<sub>м</sub> *in situ* (в очищенной фракции митохондрий из миокарда) показало, что кажущаяся К<sub>м</sub> для креатина составляет 5 мМ, а для АТР — 0,7 мМ. Эти величины на порядок выше, чем для креатинфосфата и АDP (Saks et al., 1975). Это позволяет предполагать, что КФК<sub>м</sub> обычно насыщена АТР, тогда как концентрация креатина может быть и насыщающей, и ненасыщающей. Из выявленных кинетических особенностей вытекает и еще одно, не менее важное, условие:



необходимо, чтобы было обеспечено быстрое удаление продуктов реакции — ADP и креатинфосфата. Ибо соотношение величин сродства таково, что здесь неизбежно ингибирование продуктами реакции, которое не позволило бы  $K\Phi K_m$  эффективно катализировать реакцию в должном направлении. По-видимому, эту опасность устраняет стратегическая позиция  $K\Phi K_m$ , при которой ADP быстро перебрасывается с  $K\Phi K_m$  на адениндинуклеотид-транслоказу. Чтобы выявить такую функцию  $K\Phi K_m$  в эксперименте (Moreadith, Jacobus, 1982), индуцировали дыхание в состоянии 3 с помощью либо экзогенного ADP (легко ингибируемого с помощью конкурентного ингибитора атрактилозида), либо ATP в присутствии 20 мМ креатина (заставляя митохондриальную креатинфосфокиназу вырабатывать эндогенный ADP). Оказалось, что во втором случае для подавления дыхания требуется в 4—5 раз больше ингибитора, чем в первом, хотя концентрация, запускающая дыхание, была ниже, чем в контроле. Простое объяснение, согласно которому такой эффект эндогенного ADP в митохондриях миокарда связан с межмембранной выработкой ADP, было исключено: в параллельных опытах с митохондриями печени, в которых для выработки эндогенного ADP использовалась нуклеозиддифосфокиназа (а не  $K\Phi K_m$ , так как в митохондриях печени этого изозима нет), дыхание в состоянии 3 не обнаруживало каких-либо особенностей. Все эти данные указывают на то, что в митохондриях миокарда выработка ADP ферментом  $K\Phi K_m$  происходит настолько близко к адениндинуклеотид-транслоказе, что угнетение дыхания атрактилозидом оказывается неэффективным. Иными словами, между обеими системами существует функциональное сопряжение, облегчающее доступ ADP, вырабатываемого  $K\Phi K_m$ , к транслоказе (рис. 4-6). Эти эксперименты не только позволяют сделать определенные выводы о работе ферментных систем, но и более точно оценить сродство к ADP. Было установлено, что а) кажущаяся  $K_m$  для дыхания в состоянии 3 в митохондриях миокарда составляет всего лишь 2 мкМ ADP, что близко к величинам 0,5—1,0 мкМ, полученным при прямом измерении связывания  $F_1$  с ADP; б) кажущееся сродство  $F_1$  ATP-синтетазы миокарда к ADP не в 3—4, а примерно в 30 раз выше, чем у аналогичного фермента из печени.

#### Значение высокого сродства митохондриальных ферментов к ADP для метаболизма

В свое время мы писали о том, что если указанные выше данные имеют универсальное значение, то из этого следуют два важных вывода (Hochachka et al., 1983). Во-первых, в клетках миокарда, работающих в аэробных условиях, благода-

ря высокому кажущемуся сродству ферментов к ADP дыхательные процессы в митохондриях могут очень чувствительно реагировать даже на небольшие изменения концентрации свободного ADP. Во-вторых, крайне низкие значения  $K_m(\text{ADP})$  и ключевая роль ADP в дыхательном контроле указывают на то, что *in vivo* процессы в митохондриях сердца и скелетных мышц, вероятно, протекают *при концентрациях ADP ниже уровня насыщения*; в противном случае дыхательные процессы в митохондриях не могли бы реагировать на изменения этих концентраций. Таким образом, небольшие сдвиги доступности субстрата (ADP) могут приводить к значительным изменениям метаболического потока (такое поведение характерно и для других метаболических ферментов). Например,  $F_1$  обладает каталитическими свойствами, характерными для регуляторных ферментов, и поэтому небольшие изменения сродства  $F_1$ -АТФ-синтетазы к ADP могут приводить к значительным сдвигам скорости катализа. Таким образом, *регуляция митохондриального дыхания основана либо на изменениях доступности ADP, либо на изменениях сродства  $F_1$ -АТФ-синтетазы к ADP, либо на том и другом.*

#### ADP-зависимая регуляция митохондриального дыхания при физической работе и тренировке

Для того чтобы лучше понять роль описанных выше механизмов в обменных процессах во время работы, необходимо вспомнить следующие важнейшие факты:

1. При длительной мышечной работе с аэробным энергообеспечением наблюдается лишь незначительное снижение концентрации АТФ (примерно на 0,2 мкмоль/г), а содержание доступного для фосфорилирования ADP повышается в еще меньшей степени, так как значительная часть этого вещества связана с белками. В соответствии с представлением о челночной функции креатинфосфата (рис. 4-6) сдвиг содержания ADP в цитозоле приводит к изменению концентрации креатина, на которое митохондрии сердца и скелетных мышц, по-видимому, реагируют через посредство  $K\Phi K_m$  (Mahler, 1980).

2. Во время тренировки, направленной на адаптацию к длительным нагрузкам, окислительная способность скелетных мышц примерно удваивается (даже в такой мышце, как *m. gastrocnemius*, где больше используется гликолиз). В принципе это может быть достигнуто двумя способами — адаптивным изменением содержания ферментов или изменением их изозимного состава. Обычно используются оба механизма, однако изменения в изозимах бывают лишь минимальными. В большинстве случаев приспособительные изменения митохонд-



рий в мышцах бывают обусловлены сдвигами активности ферментов (на 1 г ткани), однако изоцизмы либо вообще неизвестны (как, например, у большинства ферментов дыхательной цепи), либо не изучались при тренировке (например, у цитохромоксидазы). «Количественный» способ адаптации характерен для цитратсинтазы и других ферментов цикла Кребса, для дыхательной цепи (при этом соотношение между ее компонентами остается постоянным) и для  $F_1ATP$ -синтетазы (источники данных см. у Hochachka et al., 1983).

3. Интересно, что ряд сходных приспособительных изменений в ферментах происходит и при адаптации к большим высотам, и в метаболических системах мышц некоторые из этих изменений, видимо, связаны с такими же адаптивными перестройками, как и при тренировке на выносливость. При адаптации к высоте не только изменяются количества и состав ферментов, но может снижаться кажущаяся  $K_m(ADP)$  митохондрий; механизмы этого эффекта пока неизвестны.

4. У видов, генетически приспособленных к продолжительной двигательной нагрузке, активность окислительных ферментов всегда значительно выше, чем в гомологичных мышцах животных, ведущих более оседлый образ жизни (примеры можно найти в табл. 4-6 и в работе Mařsh, 1981).

Если объединить все эти данные с новыми фактами, касающимися регуляции митохондриального метаболизма, то выявится ряд неожиданных, не отмеченных ранее особенностей обмена веществ при физической нагрузке (Hochachka et al., 1983). Во-первых, при работе одинаковой интенсивности в митохондриях мышц индивидуумов, тренированных на выносливость (или адаптированных к большой высоте), поток вещества на 1 г веса примерно в два раза меньше, чем в мышцах нетренированных индивидуумов (так как каталитическая способность ферментов у них вдвое больше). Это верно и при сравнении разных видов: в митохондриях мышц животных, приспособленных к длительной аэробной работе (например, перелетных птиц), метаболический поток на 1 г мышечной ткани при одинаковой работе меньше, чем у животных, приспособленных к кратковременным нагрузкам. Во-вторых, кривые насыщения  $ADP$  для митохондрий у индивидуумов, адаптированных к высоте (и, возможно, тренированных?), смещены влево ( $K_m$  для  $ADP$  ниже). В-третьих (рис. 4-7), при работе одинаковой интенсивности в митохондриях мышц у тренированных (или адаптированных к высоте) индивидуумов, а также у видов, приспособленных к долговременной аэробной работе, обменные процессы протекают *при значительно более низкой концентрации  $ADP$ , и, следовательно, они более чувствительны к изменениям этой концентрации* (это обусловлено двумя указанными

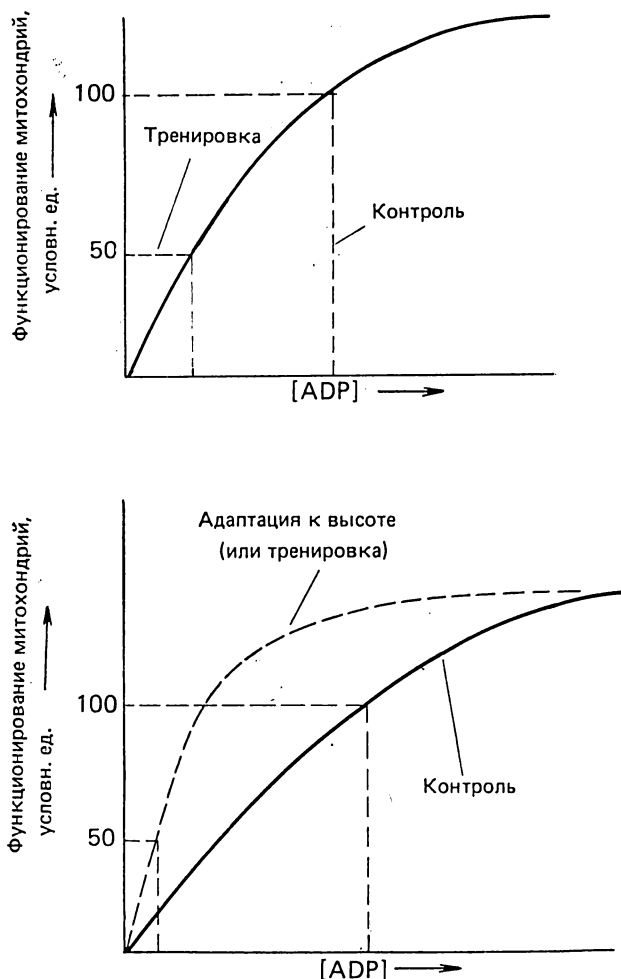


Рис. 4-7. Гипотетические кривые насыщения мышечных митохондрий аденозиндифосфатом у тренированных и нетренированных лиц. Видно, что работа одной и той же интенсивности у тренированных протекает при более низких концентрациях ADP. Снижение кажущейся  $K_m$  для ADP приводит к смещению кривых влево, и в результате уровень ADP при работе становится еще ниже.

выше особенностями). В-четвертых, при адаптации к таким экстремальным условиям, как длительная работа или большая высота, каталитический потенциал митохондрий (количества окислительных ферментов на 1 г мышечной ткани) повышается не только для того, чтобы увеличился поток вещества в метаболических реакциях и скорость выработки энергии, но и для

того, чтобы ферменты эффективно работали при малых концентрациях ADP. Это способствует поддержанию и улучшению регуляции дыхательных процессов в митохондриях, так как при низкой концентрации ADP митохондрии реагируют даже на ее малейшие, микромолярные изменения.

Наконец, увеличение сродства к ADP при уменьшении его концентраций, при которых работает  $F_1$ , должно повышать устойчивость функций митохондрий к недостатку  $O_2$ . Снижение парциального давления  $O_2$  возможно при тяжелой мышечной работе и хронической гипоксии (например, на большой высоте). Уилсон и др. (Wilson et al., 1979) указывают, что адаптация митохондриального метаболизма к снижению концентрации  $O_2$  связана с увеличением [ADP], отношения [ADP]/[ATP] и степени восстановленности цитохрома *c*. Все это направлено на то, чтобы скорость образования ATP не изменилась. Это одно из возможных объяснений того факта, что дыхательные процессы в митохондриях очень мало чувствительны к изменению концентрации  $O_2$  (которая может становиться меньше 1 мкМ). Это означает, что при работе одинаковой интенсивности в митохондриях тренированных индивидуумов синтез ATP может оставаться независимым от уровня  $O_2$  при большем его снижении, чем у нетренированных, и это можно считать конечным полезным результатом всех рассмотренных выше ферментных адаптаций.

### Стратегии адаптации к длительной работе (резюме)

Должно быть ясно, что при адаптации скелетных мышц (особенно красных волокон и волокон промежуточного типа) к длительной нагрузке используются все три основные стратегии адаптации — адаптация ферментного аппарата, околоферментной среды и интенсивности метаболизма. Основные изменения ферментных систем, по-видимому, состоят просто в увеличении активности ферментов на единицу массы мышечной ткани. Такой способ адаптации свойствен не всем катаболическим ферментам, а главным образом ферментам расщепления жиров, цикла Кребса и системы переноса электронов. Таким образом, в красных и промежуточных волокнах возможности аэробной выработки энергии повышены; однако если при гликолизе это достигается тем, что почти каждый этап катализируется специфическим для данной мышцы изозимом (или группой изозимов), то ферменты мобилизации жиров, активации жирных кислот и особенно  $\beta$ -окисления и цикла Кребса (эти две последние группы изучены лучше всего) не представлены различными изозимами. Таким образом, при переходе от покоя к максимальной работе необходимы приспособительные изме-

нения на других уровнях, а именно во внутриклеточной среде и в способе регуляции метаболического потока.

Существуют по меньшей мере три приспособительных изменения среды, в которой действуют ферменты мышц при аэробной работе. Во-первых, в красных мышечных волокнах имеются большие внутриклеточные запасы триацилглицеролов. Во-вторых, хотя креатинфосфата в этих волокнах меньше, чем в белых, он играет очень важную роль в качестве челнока, связывающего место образования АТР (митохондрии) и место его использования (миозиновая АТРаза). В-третьих, особенности КФК<sub>т</sub> направлены на облегчение переноса ADP из цитозоля к местам окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Наконец, третий и последний уровень адаптации метаболических процессов в мышцах к аэробной работе заключается в способе регуляции выработки энергии. На ранних стадиях максимальной аэробной работы (по крайней мере у человека) *одновременно* мобилизуются гликоген и жиры, что позволяет длительно поддерживать большую мощность. По мере истощения эндогенных запасов гликогена возрастает значение жиров как источника углерода и энергии, и при очень длительной аэробной работе жир остается единственным таким источником. Этот полный переход на жир сопровождается, однако, некоторым снижением мощности: при расщеплении жира скорость генерации энергии может достигать лишь примерно 60% той, которая возможна при использовании гликогена или одновременно гликогена и жира. Наконец, при длительной аэробной работе эндогенные запасы триацилглицеролов постепенно истощаются, и в качестве субстратов окислительного метаболизма все большую роль начинают играть свободные жирные кислоты, поступающие из крови.

Регулятором перехода метаболических процессов от режима покоя к режиму работы, по крайней мере в отношении распада жиров, служит триацилглицероллипаза. Этот фермент отвечает двум основным требованиям, предъявляемым к инициирующему звену: во-первых, он полностью насыщен субстратом (красные мышечные волокна богаты триацилглицеролами) и, во-вторых, он существует во «включенном» и «выключенном» состояниях. Благодаря этому поток вещества в данном пути пропорционален количеству фермента в активной форме.

Что же касается использования свободных жирных кислот крови мышцами, работающими в аэробных условиях, то здесь инициирующее звено, по-видимому, находится не в самих мышцах. Дело в том, что на всем пути от поглощения жирных кислот до  $\beta$ -окисления и поступления ацетил-СоА в цикл Кребса ни одно звено не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к инициирующему этапу. По-видимому, инициирующим фермен-

том для всего пути расщепления жирных кислот *в мышцах* при аэробной работе служит триацилглицероллипаза *жировой ткани*. Известно, что активность этого фермента хорошо соответствует потребностям работающих мышц. Это достигается благодаря совместному действию липолитических гормонов (адреналин, глюкагон), антилиполитических гормонов (инсулин) и метаболитов (последние регулируют также обратный с физиологической точки зрения процесс — этерификацию жирных кислот). Ключевую роль в «подгонке» мобилизации триацилглицеролов в жировых клетках к общим метаболическим потребностям организма играет, как и при регуляции активности гликогенфосфорилазы, аденилатциклаза. Этот фермент активирует протеинкиназы, которые в свою очередь фосфорилируют три-, ди- и моноацилглицероллипазы, переводя их тем самым в более активные формы. В конечном счете это ведет к тому, что при повышении потребностей мышц в субстратах в кровь выбрасываются свободные жирные кислоты. В работающих мышцах скорость расщепления жирных кислот примерно соответствует некой средней величине между поступлением этих субстратов и потребностью в них. Более тонкий механизм регуляции действует, по-видимому, на уровне образования ацил-СоА, переноса их в митохондрии или самого  $\beta$ -окисления. Наконец, интенсивность процессов цикла Кребса и окислительного фосфорилирования тоже должна регулироваться таким образом, чтобы «задавать темп»  $\beta$ -окислению. При этом регуляция цикла Кребса основана на включении механизмов, увеличивающих пул промежуточных продуктов этого цикла; такое увеличение вместе с модулирующими влияниями ключевых регуляторных ферментов приводит к ускорению оборота цикла. Что касается окислительного фосфорилирования, то оно, видимо, регулируется изменением количества доступного ADP, изменением соотношения АТФ-синтетазы к ADP или же тем и другим одновременно.

Все эти приспособительные механизмы, вместе взятые, обеспечивают длительную работу в аэробных условиях. Скорость выработки энергии при этом может быть достаточно велика, хотя и меньше, чем при использовании фосфагенов или при гликолизе. У насекомых (особенно у тех, которые перед взлетом разогревают летательные мышцы) потребление кислорода при полете может возрастать в несколько сотен раз. У человека и большинства позвоночных эта величина меньше — обычно потребление  $O_2$  может увеличиваться примерно в 10 раз (Weibel, Taylor, 1981), хотя у некоторых млекопитающих — даже в 40 раз (Thomas, Fregin, 1981). Такое усиление энергообразования при переходе от покоя к активности, как и в случае анаэробного гликолиза, совершенно не характерно для

большинства метаболических процессов. По-видимому, способность к подобному усилению выработалась у некоторых животных как специальная адаптация к определенным способам локомоции с аэробным энергообеспечением. Такая эффективная стратегия долговременной адаптации у большинства животных достаточна в большей части случаев, требующих мышечной работы. В связи с этим в литературе, посвященной адаптации млекопитающих к нагрузке, обычно не рассматривается еще одна ситуация, нередко возникающая в живой природе, — необходимость выполнять такую длительную работу, которую не могут обеспечить запасы гликогена (глюкозы) и жира. Иногда эти запасы невозможно пополнить даже путем отдыха или потребления пищи: примером могут служить дальние миграции канадского северного оленя, анадромные нерестовые миграции рыб (например, лососей), безостановочные перелеты птиц через океан и т. д. В таких случаях необходимы уже другие источники энергии — запасы белка в организме (см. Mommsen et al., 1980). У человека и других млекопитающих эти запасы при нагрузках обычно не расходуются, поэтому энергообеспечение за счет белка исследовалось в особых ситуациях (голодание, длительные экспедиции).

### Конкуренция между различными путями выработки энергии

Поскольку при различных видах мышечной работы используются разные пути восстановления запасов АТФ, возникает вопрос: от чего зависит, какие из этих путей будут действовать при работе той или иной интенсивности? При выборе «топлива» и путей его катаболизма могут играть роль многие из упомянутых выше регуляторных механизмов, но возможно, что главный из них — это функциональная конкуренция за АДФ. Недавно мы предложили модель, описанную ниже (Noshchka et al., 1983).

При максимальной работе мышц (до  $6 \text{ мкмоль АТФ} \cdot \text{г}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ ) активация миозиновой АТФазы приближается к физиологическому максимуму (см. табл. 4-2). При этом, возможно, специфически активируются изозимы, содержащиеся в белых мышечных волокнах: число оборота у них выше, чем у их гомологов в волокнах других типов. Однако несмотря на то, что активация миозиновых АТФаз почти достигает максимума, их каталитический потенциал, по-видимому, все же не становится выше, чем у креатинфосфокиназы, активность которой зависит от концентраций аденилатов. На ранних стадиях работы, обеспечения фосфагенами, не наблюдается более или менее заметного уменьшения или увеличения концентрации АТФ — возможно, потому, что абсолютное изменение содержания АТФ

мало по сравнению с общим количеством этого вещества (5 мкмоль/г). В отличие от этого сдвиги концентрации свободного ADP выявляются легче (Gadian et al., 1981): видимо, они не столь малы по сравнению с исходной величиной. Это очень важно, так как креатинфосфокиназа (изозим ММ) — очень активный фермент, обладающий в присутствии креатинфосфата высоким сродством к ADP. В связи с этим *креатинфосфокиназа выигрывает в конкуренции с фосфоглицераткиназой и пируваткиназой за ADP, что обеспечивает преимущественное использование креатинфосфата*. Поскольку концентрация ADP может постепенно становиться насыщающей для креатинфосфокиназы (ММ), использование креатинфосфата может продолжаться вплоть до полного истощения его запасов, однако скорость этого процесса снижается (скорость креатинфосфокиназной реакции будет теперь пропорциональна снижающейся концентрации креатинфосфата). Вероятно, именно поэтому максимальная выработка энергии путем гидролиза креатинфосфата может осуществляться лишь в течение нескольких секунд.

Во время длительной мышечной работы (при мощности около 0,25—0,5 мкмоль АТР·г<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) активация миозиновых АТРа<sub>з</sub> достигает лишь примерно 1/6—1/10 физиологического максимума (см. табл. 4-2). Изменения концентраций АТР и ADP при такой работе невелики; для АТР они обычно составляют 0,2—0,5 мкмоль/г, а для ADP еще меньше. ММ-изозим креатинфосфокиназы (КФК), как и при максимальной мышечной работе, благодаря своим каталитическим и кинетическим свойствам выигрывает в конкуренции за небольшие количества ADP с ферментами гликолиза. Поэтому изменения концентрации ADP приводят к увеличению содержания креатина, что в свою очередь способствует активации КФК<sub>м</sub> (т. е. обеспечивает челночную функцию системы креатинфосфат—креатин). Последний механизм, который при максимальной работе может быть блокирован недостатком O<sub>2</sub>, при длительной работе включается и передает сигнал о небольших изменениях количества ADP из цитозоля к F<sub>1</sub>АТР-синтетазам митохондрий. В связи с тем что эти синтетазы обладают очень высоким сродством к ADP, *окислительное фосфорилирование становится единственным путем, способным реагировать на те небольшие (микромольные) изменения концентрации ADP, которых можно ожидать при длительной работе с низкими энергозатратами*.

В обоих этих случаях метаболический аппарат, видимо, действует таким образом, что креатинфосфокиназа цитозоля получает преимущественный доступ к ADP, выделяющемуся при гидролизе АТР миозиновой АТРа<sub>з</sub>ой. При максимальной работе активация КФК (ММ) сама по себе препятствует существенной деятельности гликолитических систем, тогда как в

аэробных условиях челночная функция системы креатин—креатинфосфат сводит к минимуму вовлечение ADP в реакции гликолиза и тем самым предотвращает нецелесообразное использование этих реакций. Что же касается работы средней интенсивности (около  $1 \text{ мкмоль АТР} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ), когда анаэробный гликолиз выгоден и запасы креатинфосфата истощены, активация миозиновых АТРаз составляет примерно  $1/3$  физиологического максимума (см. табл. 4-2). При снижении запаса фосфагенов всегда наблюдается уменьшение [АТР] и увеличение [АДР]; при работе средней интенсивности эти изменения больше, чем при более интенсивной или менее интенсивной работе (Gadian et al., 1981). В этих условиях снижение [АТР] может оказаться достаточным для того, чтобы дезингибировалась ФФК, что сопровождается ускорением потока вещества по гликолитическому пути и увеличением количества фосфоенолпирувата. Одновременно ограничивается скорость креатинфосфокиназной реакции, так как снижается концентрация креатинфосфата. Все это приводит к тому, что *мышечная пируваткиназа еще больше выигрывает в конкуренции за ADP, а поэтому гликолиз и мобилизация гликогена окончательно становится предпочтительным путем энергообеспечения при работе средней интенсивности.*

Модели создаются в науке для того, чтобы предсказывать новые явления и объяснять уже известные и порой противоречивые данные. Этим требованиям удовлетворяет описанная выше модель использования различных субстратов и путей метаболизма при работе различной интенсивности (Nochachka et al., 1983); она позволяет объяснить и предсказать следующие явления:

1. В присутствии активной АТРазы скорость гликолиза должна быть выше в связи с кругооборотом ADP между АТРазой и гликолитическими ферментами, и это действительно наблюдается в эксперименте.

2. Когда концентрации ADP близки к  $0,1 \text{ мкмоль/г}$ , при любых изменениях концентрации креатинфосфата (вплоть до полного истощения его запасов) ММ-изозим креатинфосфокиназы может иметь преимущество в конкуренции за ADP перед системой анаэробного гликолиза. Такой вывод основан на кинетических свойствах ММ-изозима креатинфосфокиназы и мышечного изозима пируваткиназы. Действительно, это часто наблюдается в эксперименте; именно поэтому при наиболее интенсивной работе запасы фосфагенов могут почти полностью истощаться *до того*, как сколько-нибудь заметно усилится гликолиз. Важная биохимическая основа этого явления состоит в том, что пируваткиназа не может эффективно конкурировать за ADP, пока нет достаточного количества фосфоенолпирувата;



но даже и в этом случае сродство пируваткиназы к ADP меньше, чем у креатинфосфокиназы. Именно поэтому в модели наряду с широко известными механизмами регуляции гликолиза (связанными с креатинфосфокиназой и гликогенфосфорилазой) *особо подчеркивается регуляция второй половины гликолитического пути с помощью ADP*. Согласно модели, в реконструированных гликолитических системах добавление извне креатинфосфокиназы и креатинфосфата должно приводить к сильному угнетению гликолиза из-за меньшей способности пируваткиназы конкурировать за ADP.

3. При концентрации ADP около 0,1 мкмоль/г экзогенные креатинфосфокиназа и креатинфосфат должны сильно подавлять митохондриальное дыхание, и это действительно наблюдалось.

4. Еще одно предсказание: при концентрации ADP около 0,1 мкмоль/г гликолиз тоже должен сильно подавлять дыхательные процессы в митохондриях (если мало креатинфосфата или нет креатинфосфокиназы). Это также наблюдалось в эксперименте. При этом оказалось, что такое подавление, во-первых, зависит от конкуренции за ADP и, во-вторых (как и предсказывает модель), исчезает при отсутствии фосфоглицераткиназы и пируваткиназы.

5. Хотя в эксперименте уже было показано, что конкуренция за ADP между гликолизом и митохондриальными процессами может привести к угнетению дыхания, зависимость этого угнетения от концентрации ADP не была выяснена. Если же описанная модель верна, то ингибиторные взаимодействия должны устраняться при низких (микромольных) концентрациях ADP, при которых конкурентоспособны лишь процессы в митохондриях. Кроме того, зависимость этих конкурентных взаимодействий от концентрации ADP в митохондриях мышц и печени должна быть разной, так как сродство к ADP в мышцах выше.

6. Согласно этой модели, истощение запасов креатинфосфата или активация гликолиза может наступать *раньше*, чем будут исчерпаны резервы  $O_2$  в работающей мышце. Это наблюдалось, но не получало удовлетворительного объяснения.

7. Наконец, модель объясняет биологический смысл того, что сродство митохондриального метаболизма к ADP намного выше, чем сродство остальных двух путей, в которых вырабатывается АТФ. Благодаря этому высокому сродству при достаточном снабжении мышц кислородом окислительный метаболизм всегда будет иметь преимущество перед анаэробным в конкуренции за ADP. Это обеспечивает большую эффективность метаболических процессов и позволяет избежать нежелательных явлений, связанных с брожением.

### Сходство и различия между анаэробным и аэробным энергообеспечением

Прежде чем идти дальше, полезно будет кратко сравнить анаэробные и аэробные процессы, обеспечивающие работу мышц. Между этими процессами есть по меньшей мере шесть принципиальных различий:

1. Анаэробные процессы активируются при кратковременных нагрузках, а аэробные — при длительных.

2. Анаэробный метаболизм ведет себя как замкнутая, независимая система, тогда как при аэробной работе мышца должна действовать как открытая система, связанная обменными и информационными каналами со всем организмом.

3. Скорость выработки энергии (т. е. оборота АТФ) в обоих случаях зависит от максимальных каталитических способностей соответствующих ферментов. При анаэробном метаболизме она может быть в 2—4 раза больше, чем при аэробном, но это преимущество сохраняется лишь очень короткое время.

4. При анаэробном энергообеспечении суммарная мощность зависит от количества эндогенного субстрата, а при аэробном — как от эндогенного субстрата, так и от доставки мышцам субстратов из печени и жировой ткани.

5. При кратковременной интенсивной работе белых мышечных волокон креатинфосфат играет главным образом роль донора  $\sim P$ , тогда как при аэробной работе мышц он действует как переносчик  $\sim P$  между митохондриями и миофибриллами.

6. В белых волокнах при кратковременной интенсивной работе обычно используется только одно «топливо» — гликоген — и только один путь катаболизма, тогда как при аэробной работе красных волокон в них расщепляется главным образом гликоген *вместе* с жирами. Более длительная аэробная работа этих волокон обеспечивается только распадом жиров. В обоих случаях необходима одновременная регуляция нескольких метаболических путей.

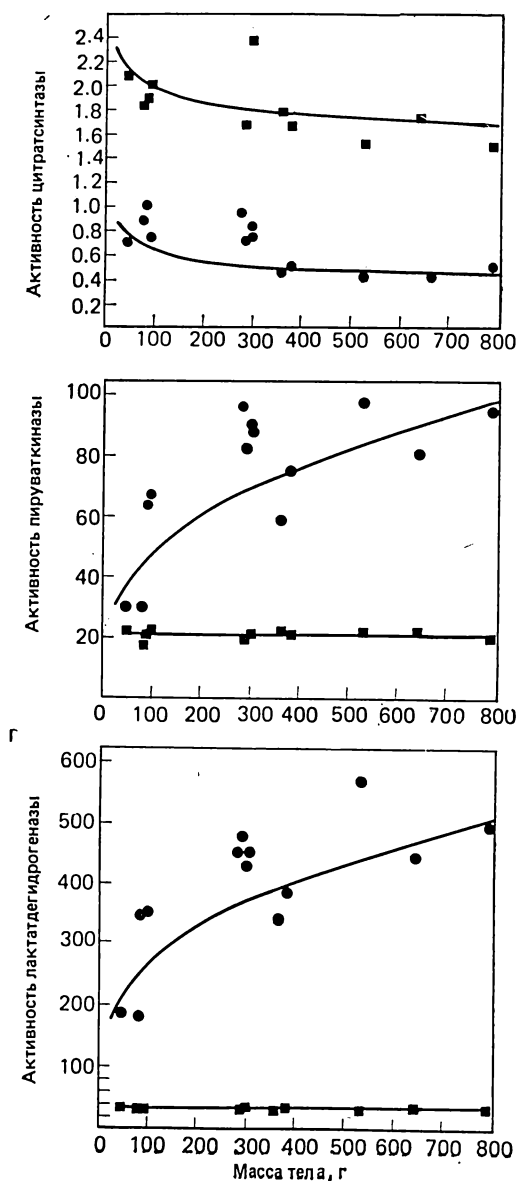
### Зависимость каталитического потенциала гликолитических и окислительных ферментов от размеров тела

Важный вывод о том, что кратковременная интенсивная работа белых мышечных волокон поддерживается эндогенными субстратами (фосфагенами и гликогеном), а длительная работа красных волокон — в значительной части доставкой кислорода и субстратов извне (см. выше), находит интересное отражение в зависимости активности ферментов скелетных мышц от размеров тела. Такая зависимость (scaling) характерна для мно-

жества различных физиологических процессов (см. Schmidt-Nielsen, 1979). Для процессов, связанных с аэробным энергообеспечением, показатель степени в уравнении зависимости от размеров (массы) тела обычно меньше единицы. Это означает, что у более крупных животных эти процессы менее интенсивны (в расчете на единицу массы тела), чем у более мелких. Наверное, самый известный пример подобной зависимости аэробных процессов — это кривая потребления кислорода на единицу массы от землеройки до слона. Очевидно, что слон потребляет больше кислорода, чем такой маленький зверек, как землеройка; однако на единицу массы потребление кислорода у землеройки намного больше, чем у крупных млекопитающих.

Хотя зависимость аэробных метаболических процессов (по данным о потреблении  $O_2$ ) от размеров тела изучали уже давно, анаэробным процессам в этом плане уделялось мало внимания. Когда исследовали активность двух ферментов гликолиза — пируваткиназы и лактатдегидрогеназы — в белых скелетных мышцах тринадцати видов костистых рыб (Somero, Childress, 1980), результаты оказались несколько неожиданными: активность этих ферментов на единицу мышечной массы была значительно *выше* у более *крупных особей*. Напротив, для цитратсинтазы — фермента цикла Кребса — эта зависимость была такой же, как для прочих аэробных систем, т. е. с увеличением размеров тела активность на 1 г массы ткани снижалась. Все эти взаимоотношения, а также данные для пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и цитратсинтазы головного мозга представлены на рис. 4-8.

Различный характер зависимости ферментативной активности от размеров тела отражает важные особенности мышечной ткани. Видно, насколько разной может быть эта зависимость для аэробных и анаэробных процессов. Возможно, что снижение активности цитратсинтазы на 1 г массы белых мышечных волокон у более крупных особей того или иного вида связано с ограничением в снабжении кислородом у крупных животных (обсуждение возможных причин такой зависимости аэробных процессов читатель найдет у Schmidt-Nielsen, 1979). Здесь может играть роль отношение поверхности тела к его объему (оно влияет на способность дыхательной и сердечно-сосудистой системы доставлять кислород и субстраты работающим мышцам); однако выдвинутые гипотезы остаются спорными. В случае же пируваткиназы и лактатдегидрогеназы мы имеем дело с системой, не зависящей, как уже говорилось, от поставки кислорода и субстратов извне во время кратковременной интенсивной работы. Значит, мы должны попытаться объяснить зависимость активности этих ферментов от размеров тела с точки зрения приспособленности мышц именно к такой функции.



Чтобы понять, почему удельная активность (на единицу массы) ферментов гликолиза выше у более крупных особей данного вида, нужно учитывать следующий важный факт: способность к очень быстрым «рывкам» при плавании оказалась практически одинаковой у мелких и крупных особей (если измерять скорость как  $l \cdot c^{-1}$ , где  $l$  — длина тела) (источники данных см. у Somero, Childress, 1980). Напротив, способность к аэробному плаванию (в тех же единицах) меньше у более крупных рыб. Это согласуется с данными о меньшей удельной активности цитратсинтазы в мышцах таких рыб. Можно ли объяснить более высокую удельную активность пируваткиназы и лактатдегидрогеназы в мышцах крупных особей тем, что для «рывка» им необходимо больше энергии, чем мелким особям того же вида? Было подсчитано (Somero, Childress, 1980), что активность этих ферментов возрастает с увеличением размеров тела ровно настолько, насколько это нужно для преодоления большего гидродинамического сопротивления. Таким образом, различия в мощности гликолиза в белых мышцах особей разной величины обусловлены тем, что более крупные рыбы должны затрачивать на плавание дополнительную энергию. Важное значение такой зависимости, возможно, связано со спецификой взаимоотношений хищника и жертвы, при которых способность к быстрым «броскам» часто играет решающую роль (см. Somero, Childress, 1980).

Интересно сравнить влияние размеров тела на активность ферментов в белых мышечных волокнах и в ткани головного мозга (рис. 4-8). В мозгу, независимо от размеров и вида животного, активность пируваткиназы и лактатдегидрогеназы практически одинакова (Somero, Childress, 1980; Sullivan, Somero, 1980). Это означает, что различия, наблюдаемые в белых мышцах, по-видимому, обусловлены не какими-либо ограничениями, действующими во всех тканях, а особенностями локомоторной функции. Что же касается цитратсинтазы мозга, то зависимость ее активности от размеров тела такая же, как и у большинства аэробных процессов.

В независимом исследовании, проведенном на десяти видах млекопитающих, масса тела которых варьировала примерно в пределах  $1:10^6$ , Эмметт (Emmett) также нашел, что активность гликолитических ферментов в скелетных мышцах находится в прямом отношении к массе тела, а активность окислительных ферментов — в обратном. Наклон соответствующего графика для каталитической активности окислительных ферментов такой же или менее крутой по сравнению с графиком для максимального поглощения  $O_2$  всем организмом. Это согласуется с тем фактом, что пределы аэробной работы у крупных млекопитающих больше, чем у мелких (Weibel, Taylor, 1981). Что ка-

сается активности гликолитических ферментов, то ее зависимость от размеров тела не столь понятна, так как у нас нет соответствующих данных о пределах анаэробной работы (Emmett, Hochachka, 1981).

### **Адаптация к физической нагрузке у беспозвоночных: «чемпионы» среди беспозвоночных — насекомые**

Вполне вероятно, что многие из рассмотренных нами механизмов адаптации к нагрузке у позвоночных (главным образом млекопитающих) существуют и у большинства беспозвоночных. В то же время у беспозвоночных есть довольно своеобразные и сейчас уже хорошо изученные особенности метаболизма; они интересны сами по себе и, кроме того, позволяют лучше понять основные принципы обмена веществ и адаптации. Поскольку насекомые имеют большое хозяйственное значение, о них имеется богатейшая информация, из которой мы можем почерпнуть примеры различных адаптаций к физической нагрузке. Такие адаптации у насекомых подробно рассмотрены в специальных обзорах (Sacktor, 1976), и поэтому здесь мы остановимся лишь на основных типах приспособительных стратегий и механизмов.

Хотя у насекомых скелетные мышцы разделяются по меньшей мере на два функциональных типа (летательные мышцы и мышцы конечностей), между которыми имеются существенные физиологические различия, у этих двух типов нет ясных электрофизиологических и структурных признаков вроде тех, которые позволяют четко разделить красные и белые мышечные волокна у позвоночных. Поэтому у насекомых различные потребности в энергообеспечении при разных типах нагрузки (от кратковременной интенсивной работы до состояния покоя) должны удовлетворяться с помощью специфических ферментных и регуляторных особенностей. И это действительно подтверждается — есть много данных о том, что в мышцах конечностей, ответственных за прыжки, энергообеспечение намного больше зависит от гидролиза фосфагенов (аргининфосфата) и анаэробного гликолиза, чем в летательных мышцах. У некоторых насекомых летательные мышцы настолько приспособлены для продолжительной аэробной работы, что их метаболизм почти полностью зависит от окислительных процессов. Лактатдегидрогеназа в летательных мышцах таких видов часто полностью исключена из метаболических процессов, а окислительно-восстановительный баланс в цитозоле во время аэробной работы поддерживается  $\alpha$ -глицеролфосфат-дегидрогеназой: активность этого фермента обычно высока, и по своим кинетическим свойствам он хорошо приспособлен для работы в  $\alpha$ -глицеролфосфатном цикле (см. гл. 2). Наряду с резко пониженным потенциалом анаэробных

процессов в летательных мышцах насекомых очень высока активность ферментов аэробного метаболизма, и это обеспечивает возможность интенсивной выработки энергии при полете.

Субстраты, используемые при полете, у разных насекомых различны. У тех видов, у которых полет (или поиск пищи) длится недолго, источником энергии часто служат углеводы — трегалоза крови или гликоген (эндогенный или получаемый из экзогенного депо — жирового тела). К этой группе насекомых относятся пчелы и осы; у них есть еще одна интересная приспособительная особенность, предназначенная для усиления цикла Кребса: фермент пируваткарбоксилаза, активность которого в мышечной ткани обычно невелика, обладает высокой активностью в летательных мышцах пчел. Для этого фермента характерна абсолютная аллостерическая зависимость от ацетил-СоА; полагают, что он обеспечивает дополнительный приток оксалоацетата в цикл Кребса (и тем самым увеличивает весь пул промежуточных продуктов цикла). Здесь природа нашла очень изящный механизм усиления обмена, так как единственным источником углеводов и энергии для пчел служит нектар (смесь сахаров). Благодаря зависимости пируваткарбоксилазы от ацетил-СоА (рис. 4-9) активность этого фермента точно соответствует потребностям цитратсинтазной реакции в оксалоацетате (т. е. тому количеству оксалоацетата, которое необходимо, чтобы под действием цитратсинтазы произошла конденсация с ним ацетил-СоА, образовавшегося из глюкозы)!

В отличие от перепончатокрылых у насекомых, приспособленных к длительному полету, в качестве топлива используется либо смесь углеводов и жиров (например, у саранчи в течение примерно часа после взлета), либо исключительно жиры (например, у саранчи при длительных перелетах, у некоторых бабочек). Однако, насколько нам известно, относительный вклад этих субстратов в выработку энергии пока не установлен.

У некоторых летающих насекомых имеется интересная особенность: для активации метаболизма в летательных мышцах им необходим пролин. К таким насекомым относятся мясные мухи, некоторые жуки, саранча и муха цеце. У всех этих насекомых в летательных мышцах запасаются большие количества пролина. Это вещество может играть двоякую роль. Простейшая из его функций состоит в увеличении пула промежуточных продуктов цикла Кребса, и в этом случае нет необходимости в окислении углеродного скелета пролина. У некоторых видов (например, у колорадского жука) пролин поступает в цикл Кребса в виде 2-оксоглутарата, затем частично окисляется в этом цикле при участии яблочного фермента, превращаясь в пируват, который переходит в аланин и в таком виде накапливается (источники данных см. у Hochachka et al., 1983).

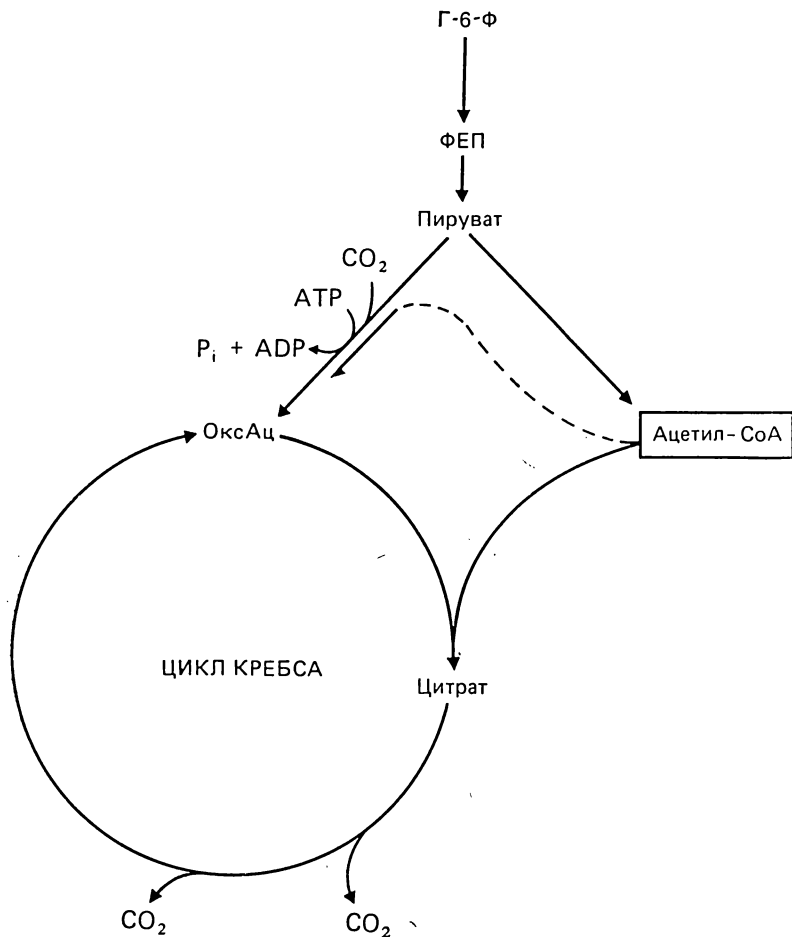


Рис. 4-9. Механизм усиления функции цикла Кребса в летательных мышцах пчелы. Разветвление путей на уровне пирувата здесь сложнее, чем в мышцах млекопитающих, из-за наличия активной пируваткарбоксилазы. Абсолютно необходимым аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы служит ацетил-СоА, и полагают, что во время полета именно от ацетил-СоА зависит, насколько под действием пируваткарбоксилазы будет увеличиваться пул оксалоацетата и других промежуточных продуктов цикла Кребса. (Noshchka, Guppy, 1977.)

В чем смысл использования для этой цели пролина, не вполне ясно. Возможно, что пролин, будучи нейтральным веществом, может без вреда накапливаться в больших количествах. Не исключено также, что участие пролина энергетически выгодно: даже если вовлечение его в метаболизм приводит только к уси-



лению цикла Кребса, выход энергии повышается. Если же некоторое количество пролина полностью окисляется, то выработка энергии увеличивается еще больше, так как при полном окислении 1 моль пролина могло бы образоваться 30 моль АТФ (см. гл. 2). Как бы то ни было, у многих насекомых пролин служит важнейшим субстратом, и в этом их интересное сходство с головоногими моллюсками, особенно с кальмарами.

### «Чемпионы» среди морских беспозвоночных — кальмары

Кальмары — такие же чемпионы по интенсивности длительной мышечной работы среди морских беспозвоночных, как насекомые среди наземных. У быстро плавающих кальмаров интенсивность метаболизма может быть столь же высокой, как у такой стремительной рыбы, как лосось. Мускулатура мантии кальмара с биохимической точки зрения подобна слоеному пирогу (Mommensen et al., 1981): в наружном и внутреннем слоях преобладает способность к окислительным процессам, а для среднего слоя характерно высокое отношение анаэробной ферментативной активности к аэробной. В этом отношении мускулатура мантии по своей организации в чем-то сходна со скелетными мышцами позвоночных. Субстраты, используемые при метаболизме у головоногих, вначале представляли для ученых загадку. Дело в том, что многие кальмары способны не только к очень быстрым кратковременным передвижениям, но и к длительным нерестовым миграциям. Например, кальмар *Illex*, обитающий у восточного побережья Северной Америки, кормится и растет у берегов, а для размножения мигрирует на расстояние в несколько тысяч километров. По аналогии с млекопитающими было бы естественно предположить, что быстрые короткие реактивные «броски» этого животного осуществляются за счет анаэробного гликолиза, а дальние миграции — за счет распада жиров. Однако ранние исследователи обнаружили в мускулатуре мантии (выбрасывающей воду при реактивном движении) в лучшем случае лишь очень незначительные запасы гликогена или жира. В дальнейшем было подтверждено, что интенсивного расщепления жиров в мантии не происходит, однако запасы гликогена все же были найдены.

Оказалось, что гликоген в мантийной мускулатуре вначале не могли обнаружить потому, что его выделение из мышц головоногих по непонятным пока причинам требует особых методических условий. При соблюдении этих условий можно обнаружить запасы гликогена, вполне сравнимые с его запасами у позвоночных (более 0,1 моль гликозильных единиц на 1 г мышечной ткани). Это вполне согласуется с высоким уровнем глико-

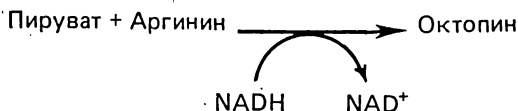
литических ферментов в мышцах кальмара (Hochachka, Fields, 1982).

Остается еще вопрос об аэробной работе. Какие источники энергии используются при реактивном плавании на большие расстояния? Для того чтобы полностью ответить на этот вопрос, понадобятся еще обширные исследования; однако данные последних лет указывают на то, что источником энергии могут быть белки и большой пул свободных аминокислот (около 300 мэкв/кг) в мышцах. Из этих аминокислот особо важную роль играет, по-видимому, пролин.

Содержание пролина в мышцах кальмара велико. Например, в мантийной мускулатуре *Illex* оно составляет около 20 мкмоль/г, и пролин способен здесь интенсивно окисляться (Mommensen, Hochachka, 1981). Таким образом, дальние миграции кальмара обеспечиваются энергией за счет аминокислот и белков, и это сближает их с анадромными нерестовыми миграциями лососевых. У лососей, однако, гораздо большую роль по сравнению с кальмарами, видимо, играет аланин и гораздо меньшую — пролин (Mommensen et al., 1980). Как и у насекомых, фосфагеном в мышцах головоногих моллюсков служит аргининфосфат, образующийся под действием аргининфосфокиназы:



Если мы предположим, что концентрация ADP in vivo у головоногих такая же, как у позвоночных, и константа равновесия для аргининфосфокиназы тоже примерно такая же, то уровень свободного аргинина должен быть низким и пул аргинин + аргининфосфат должен быть в основном представлен фосфагеном. Более высокое содержание аргинина, обнаруженное в некоторых работах, может быть связано с распадом аргининфосфата. Поскольку общая концентрация аргинина (включая фосфат) очень высока (порядка 20—50 мкмоль/г), можно рассчитать, что если бы фосфаген у кальмара использовался так же, как креатинфосфат в белых мышечных волокнах позвоночных, то после кратковременной интенсивной работы клетка была бы буквально наводнена свободным аргинином. У головоногих моллюсков этого не происходит, возможно, лишь потому, что аргинин превращается в безвредное, почти нейтральное соединение — октопин. Такое превращение катализирует октопиндегидрогеназа, благодаря которой аргинин «захватывается» на последнем этапе гликолиза:

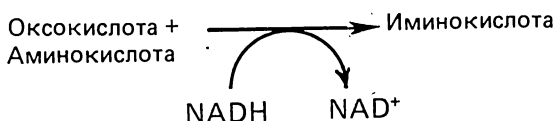


В мантийной мускулатуре кальмара активность октопиндегидрогеназы (ОДГ) очень высока, в то время как активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) чрезвычайно мала. Отношение ОДГ/ЛДГ обычно составляет около 100:1 (Storey, Storey, 1983). Только недавно началось изучение двух тесно связанных между собой вопросов — каким образом октопин снова вовлекается в метаболизм и как его обмен связан с обменом аргинина; однако уже, по-видимому, ясно, что наличие октопиндегидрогеназы биологически выгодно в таких тканях, как мантия кальмара. Благодаря этому ферменту гидролиз большого количества аргининфосфата при быстрых реактивных «бросках» может не приводить к переполнению клетки аргинином — веществом с сильнощелочной реакцией, способным при накоплении повреждать клетки (Somero, Bowler, 1983).

### Роль фосфагенов и множественности конечных дегидрогеназ у двустворчатых и брюхоногих моллюсков

Если самые активные среди моллюсков — головоногие, то самые «ленивые» — это брюхоногие и двустворчатые (пластинчатожаберные). Интересно, что во многих изученных случаях главным источником энергии оказался у них аргининфосфат (De Zwaan, 1983). Иногда анаэробный гликолиз активируется главным образом в восстановительном периоде (возможно, для пополнения запасов фосфагена); в других случаях за восстановление ответствен главным образом окислительный метаболизм. И наконец, встречается своеобразное взаимодействие обоих путей расщепления углеводов.

В связи с этим интересно то, что у многих двустворчатых и брюхоногих моллюсков имеются октопиндегидрогеназа и лактатдегидрогеназа (в разных соотношениях в зависимости от вида и ткани) и, *кроме того*, еще одна или несколько иминообразующих дегидрогеназ. Особенно обычны аланопиндегидрогеназа (первый из обнаруженных аналогов октопиндегидрогеназы; Fields et al., 1980) и стромбиндегидрогеназа. Эти ферменты катализируют восстановительную конденсацию пирувата с аланином или глицином, в результате чего образуется соответственно аланопин или стромбин:



Почему в одних и тех же органах или тканях двустворчатых и брюхоногих моллюсков часто содержатся несколько конечных

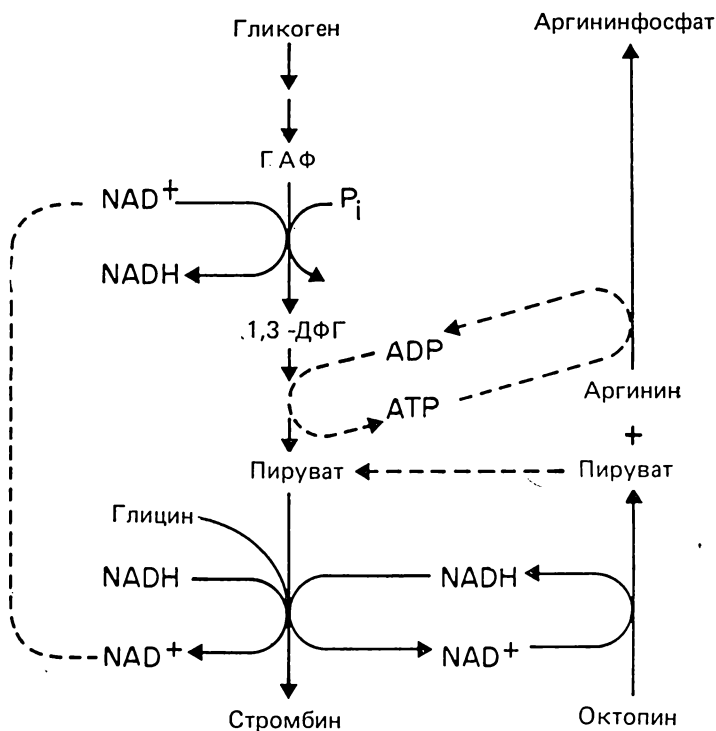


Рис. 4-10. Возможные пути пополнения запасов аргининфосфата в восстановительном периоде после тяжелой анаэробной работы: сбраживание гликогена до стромбина (как источник АТФ) и обратная реакция октопиндегидрогеназы (как источник аргинина). Если бы данная метаболическая система была сопряжена с окислительно-восстановительными реакциями (как показано на этом рисунке), то стехиометрические соотношения в результате использования двух источников NADH и пирувата составили бы 4 моль стромбина на 1 моль распавшихся глюкозных остатков и окисленного октопина.

гликолитических дегидрогеназ и как они «делят» между собой водород? Эти вопросы, важные для понимания регуляции метаболизма, остаются неясными. Возможно, что в разное время по тем или иным причинам действуют разные дегидрогеназы. Например, когда у *Strombus* во время энергичных «прыжков» истощаются запасы аргининфосфата, в роли конечной дегидрогеназы используется октопиндегидрогеназа; утомление же совпадает с накоплением октопина, ингибирующего этот фермент. В *восстановительном* периоде накапливается стромбин, и это указывает на то, что источником АТФ для восстановления запасов фосфагенов служит сбраживание гликогена до стромбина (рис. 4-10) (J. Baldwin, личное сообщение). Такой путь пред-

ставляет собой изящное решение проблемы энергообеспечения и поддержания окислительно-восстановительного баланса в восстановительном периоде в тех случаях, когда мышцы плохо перфузируются и их клетки бедны митохондриями. Что касается брожения с превращением гликогена в октопин, то оно не могло бы в этих условиях осуществляться, так как окисление октопина необходимо для воспроизводства аргинина и превращения его в аргининфосфат.

### Возможные механизмы адаптации при тренировке на выполнение анаэробной работы

Мы рассмотрели работу метаболического аппарата при нагрузке и при этом касались главным образом кратковременных и долговременных (филогенетических) адаптивных механизмов. Теперь мы обратимся к среднему уровню адаптации и посмотрим, какие структуры и функции в принципе могли бы изменяться при тренировке. В дальнейшем можно будет сравнить эти изменения с теми, которые действительно наблюдаются. Приведем минимальный перечень теоретически возможных уровней адаптации анаэробного метаболизма при тренировке:

- 1) увеличение размеров мышц, работающих при нагрузке (гипертрофия);
- 2) замена одних типов волокон другими;
- 3) повышение содержания эндогенных субстратов (креатинфосфата и гликогена);
- 4) повышение содержания ключевых ферментов, участвующих в анаэробном метаболизме и его регуляции;
- 5) изменения изотимов в тех или иных звеньях метаболических путей;
- 6) увеличение буферной емкости работающих мышц.

### Рабочая гипертрофия мышц

Простейшая приспособительная реакция на длительную физическую работу с эпизодами интенсивной нагрузки состоит *просто в увеличении размеров уже имеющихся мышечных волокон, т. е. в гипертрофии мышц*. Эта реакция настолько обычна и очевидна, что она уже вошла в фольклор. Достаточно вспомнить карикатуры на хилых молодых людей, жадно рассматривающих рекламные объявления о культуризме и формировании неотражимой мужской фигуры. Эти ходячие представления, по-видимому, имеют научную основу: желанная гипертрофия мышечных клеток и увеличение их силы представляют собой *приспособительную реакцию главным образом на многократные эпизоды анаэробной работы*; при тренировке на выносливость эта гипертрофия либо не развивается, либо выражена очень умеренно.

Хотя такая гипертрофия мышц широко известна, ее механизмы во многом неясны. Твердо установлены лишь несколько ее общих особенностей (Goldberg et al., 1978):

1. Главным стимулом служит нагрузка сама по себе, так как она может действовать независимо от анаболических гормонов (соматотропина, инсулина, глюкокортикоидов) и вызывать гипертрофию даже в тех случаях, когда действие эндокринных факторов способствует, напротив, атрофии мышц (например, при голодании).

2. Гипертрофия связана с активацией синтеза белков и РНК и в некоторой степени даже синтеза ДНК, хотя до сих пор не ясно, происходит ли при этом деление клеток. Подавление синтеза РНК или белка предсказуемым образом блокирует гипертрофию.

3. Рост мышечной массы связан прежде всего с увеличением количества тканевых белков в результате ускорения их синтеза и замедления распада; он прямо пропорционален ускорению включения  $^3\text{H}$ -аминокислот в белки. Интересно, что способность стимулируемых мышц поглощать определенные аминокислоты из крови возрастает еще до того, как в этих мышцах ускоряется синтез РНК и белка. Повышенный захват аминокислот — безусловно, один из самых ранних биохимических признаков начинающейся гипертрофии.

4. Многие данные позволяют предполагать, что какие-то биохимические последствия работы мышц или сами по себе процессы сокращения усиливают захват аминокислот. Известно, например, что при изометрическом сокращении мышца более интенсивно поглощает аминокислоты, чем при укорочении без нагрузки.

5. Увеличение мышечной массы при рабочей гипертрофии связано главным образом с утолщением волокон (Gollnick et al., 1981).

6. Увеличение мышц связано с повышением содержания в них растворимых и миофибриллярных белков, а также коллагена. В то же время содержание растворимых белков возрастает непропорционально, что, возможно, отражает изменения сократительных свойств (например, снижение скорости сокращения), а также метаболических особенностей. Подобные изменения могут быть связаны также со взаимопревращениями медленных «аэробных» и быстрых «гликолитических» волокон, и эту возможность важно было бы проверить.

**Адаптивные изменения роли быстрых «гликолитических» волокон**

В связи с тем что красные, белые и промежуточные волокна значительно различаются по своим биохимическим свойствам, увеличение доли белых волокон может служить одним из путей

повышения способности мышцы к анаэробной выработке энергии. О том, что такой путь адаптации возможен, свидетельствуют эксперименты с электрическим раздражением и перекрестной иннервацией мышц: в них было показано, что мышечные волокна разного типа могут превращаться друг в друга (см. Whalen et al., 1981). Если рассматривать более долговременные (филогенетические) процессы адаптации, можно тоже убедиться, что одна из самых обычных адаптаций к различным видам нагрузки состоит в преобладании волокон определенного типа в работающих мышцах. Это лучше всего видно на примере костистых рыб: у тех видов, которым свойственно преимущественно или исключительно «бросковое» плавание, доля белых волокон в мускулатуре повышена, а доля красных — понижена. Более того, даже красные мышцы в этих случаях обладают многими биохимическими чертами белых (меньше капилляров, меньше митохондрий в волокнах, более низкая активность окислительных ферментов и др.). Сходными чертами обладают и мышцы птиц, совершающих обычно быстрые короткие перелеты (например, тетерева и куропатки). Даже между разными людьми по некоторым данным существуют генетические различия по таким признакам. У спортсменов, достигающих особого успеха в видах спорта, связанной с анаэробной работой мышц (например, в поднятии штанги), доля белых волокон обычно больше, чем у лиц, более способных к длительной аэробной работе.

Попытки более ранних исследователей обнаружить взаимопревращения мышечных волокон во время (или в результате) тренировки были связаны с определенными трудностями, хотя некоторые данные указывали на возможность такого взаимопревращения для белых волокон и волокон промежуточного типа. Позже с помощью иммуногистохимических методов, позволяющих определять «быстрый» и «медленный» миозин, было установлено, что в волокнах промежуточного типа содержатся *оба* изозима и что соотношение их может изменяться при тренировке. Однако подобных изменений не выявляется в красных и белых волокнах (Lutz et al., 1979; Holloszy et al., 1978). Таким образом, как и отмечалось неоднократно, возможности адаптивного изменения состава волокон в мышцах млекопитающих путем специальных тренировок ограничены (вероятно, дело сводится к превращению части промежуточных волокон в белые в результате анаэробной нагрузки).

#### Влияние анаэробной работы мышц на запасы гликогена и креатинфосфата

Если бы доля белых волокон в работающих мышцах при анаэробной тренировке не увеличивалась, то насколько мог бы возрасти анаэробный потенциал мышц в результате одного

лишь увеличения резервов креатинфосфата и гликогена? Такой механизм (особенно увеличение запасов гликогена), по-видимому, действительно используется при долговременной (филогенетической) адаптации. Оказалось, что этот механизм в какой-то степени действует и при тренировке. Так, например, у крыс, тренированных к «спринтерскому» бегу (особенно при сочетании этой тренировки с высотной гипоксией), содержание креатинфосфата в мышцах выше, чем у контрольных животных. У человека содержание креатинфосфата (на 1 г ткани) обычно не повышается, однако, поскольку анаэробная тренировка приводит к гипертрофии скелетных мышц, общее количество фосфагена, которое может быть использовано при кратковременной интенсивной работе, фактически возрастает. Следовательно, *возрастает и общее количество энергии*, которое может быть получено при использовании этого фосфагена. Все это относится и к гликогену — содержание его в мышцах спортсменов, тренированных к анаэробной нагрузке, тоже возрастает.

### Влияние анаэробной тренировки на содержание ферментов

У животных, приспособленных к быстрым «броскам», велика не только доля белых мышечных волокон, но и активность ферментов, участвующих в обмене аденилатов, креатинфосфата и гликогена. Так, в белых мышечных волокнах тунца (это один из чемпионов по «броскам» среди всех исследованных биологами рыб) уровни миокиназы, креатинфосфокиназы и различных гликолитических ферментов необычайно высоки. Активность лактатдегидрогеназы, например, может превышать 5000 единиц/г (при 25 °C). Благодаря этому может достигаться очень высокая интенсивность гликолиза (Guppy et al., 1979). Неудивительно поэтому, что тот же механизм используется при анаэробной нагрузке у других животных и человека (особенно убедительные данные в этом отношении получены для креатинфосфокиназы, миокиназы и лактатдегидрогеназы). По-видимому, эти эффекты носят общий характер. После тренировки содержание ферментов стабилизируется на уровне, составляющем примерно 120—150% от исходного (Holloszy, Booth, 1976). Кроме того, необходимо помнить, что общее количество (общая каталитическая активность) ферментов анаэробного метаболизма повышается при тренировке вследствие простой гипертрофии мышц. Таким образом, общее увеличение выработки энергии в мышцах после тренировки складывается из двух факторов: а) степени гипертрофии и б) изменения относительного содержания ферментов анаэробного метаболизма.



## Влияние анаэробной тренировки на изозимный состав ферментов

Как уже говорилось, характер анаэробных процессов в мышцах позвоночных животных в значительной степени зависит от того, какие изозимы действуют на каждом этапе анаэробного гликолиза. В связи с этим возникает вопрос: может ли тренировка приводить к адаптивным изменениям в наборах изозимов? По-видимому, на этот вопрос можно ответить утвердительно, хотя и с большой осторожностью, так как сегодня на этот счет есть данные лишь нескольких работ. Одни из наиболее достоверных сведений касаются лактатдегидрогеназы. Этот фермент представлен изозимами пяти различных типов; все они — тетрамеры, образующиеся в результате различного соединения Н- и М-субъединиц:  $H_4$ ,  $H_3M_1$ ,  $H_2M_2$ ,  $H_1M_3$  и  $M_4$ . У человека во время спринтерской тренировки повышается как общая активность лактатдегидрогеназы, так и содержание  $M_4$ ; по-видимому, так же обстоит дело у лошади (Guy, Snow, 1977). Универсальны ли такие адаптивные изменения изозимов при анаэробной тренировке, неизвестно — этот вопрос требует дальнейших исследований.

## Влияние анаэробной тренировки на буферную емкость мышц

Поскольку при кратковременной интенсивной работе образуется большое количество лактата и протонов, необходимы внутриклеточные буферные системы. В мышцах позвоночных роль внутриклеточных буферов играют главным образом имидазольные группы гистидина. Они могут входить в состав свободного гистидина (у некоторых костистых рыб), гистидинсодержащих дипептидов или белков. Например, у костистых рыб содержание свободного гистидина выше всего у рыб, способных к мощным «броскам»: в белых мышечных волокнах тунца содержание свободного гистидина на 1 г ткани составляет около 100 мкмоль, и лактат в этих волокнах может накапливаться при интенсивном анаэробном гликогенолизе примерно до такого же уровня (Abe, 1981). У млекопитающих около половины всего гистидина связано с белками; остальной гистидин находится в составе дипептидов — карнозина, ансерина и офидина. Содержание этих дипептидов может достигать 50 мкмоль/г, и тогда они становятся главными растворимыми компонентами цитозоля. Как правило, буферная емкость мышц пропорциональна их гликолитической активности (Castellini, Somero, 1981), и поэтому вполне естественно, что во время анаэробной тренировки происходит соответствующая адаптация буферных систем мышц (Parkhouse et al., 1982).

### Возможные механизмы адаптации при аэробной тренировке

Было бы, наверное, полезно начать рассмотрение аэробной тренировки, так же как и анаэробной, с анализа тех структур и функций, которые в принципе могли бы при этом изменяться. Это послужит нам опорой при анализе тех приспособительных реакций, которые происходят при такой тренировке в действительности. Список возможных изменений включает:

- 1) увеличение размеров мышечных волокон (гипертрофию);
- 2) изменение доли красных, белых и промежуточных волокон;
- 3) увеличение запасов эндогенных субстратов (триацилглицеролов и гликогена);
- 4) повышение содержания ключевых ферментов, участвующих в окислительном расщеплении субстратов;
- 5) увеличение числа митохондрий (и, возможно, изменение организации их ферментных систем);
- 6) снижение активности ферментов анаэробного метаболизма в соответствии с повышением потенциала аэробных процессов.

Кроме того, поскольку при работе в аэробных условиях мышца представляет собой открытую систему, можно ожидать, что будут происходить важные адаптивные изменения на более высоком уровне организации, в частности на уровне кооперативных метаболических взаимодействий между печенью и мышцами и между жировой тканью и мышцами. При этом могут изменяться:

- 1) запасы гликогена и триацилглицеролов;
- 2) способность печени и жировой ткани высвобождать при аэробной работе глюкозу и жирные кислоты соответственно;
- 3) способность мышечной ткани захватывать из крови глюкозу и свободные жирные кислоты, которые могут либо немедленно расщепляться, либо откладываться в мышцах (в виде гликогена или триацилглицеролов);
- 4) доставка  $O_2$  к работающим мышцам и их способность поглощать  $O_2$  из крови.

Все эти адаптации — в свете того, что мы знаем о метаболическом энергообеспечении аэробной работы, — кажутся теоретически возможными. Но осуществляются ли они в действительности? Здесь дело обстоит не так просто, как в случае анаэробной тренировки, так как первые два вида адаптаций, по-видимому, не используются.

### Аэробная тренировка обычно не сопровождается гипертрофией мышц

Одно из главных различий между аэробной и анаэробной тренировкой состоит в том, что два важнейших результата адаптации при анаэробной работе (*гипертрофия* и увеличение *силы* мышечных волокон) не проявляются при аэробной работе. Например, у грызунов тренировка на тредбане в течение нескольких недель приводит к значительному повышению выносливости и показателей дыхания, однако у них не наблюдается ни гипертрофия мышц, ни увеличение их силы (Hollooszy, Booth, 1976). Значит, такой, казалось бы, важный приспособительный механизм, по-видимому, не используется у млекопитающих при адаптации к аэробной нагрузке.

### При аэробной тренировке не происходит превращения белых мышечных волокон в красные

При сравнительном исследовании костистых рыб, птиц и млекопитающих постоянно выявляется корреляция между содержанием красных волокон в работающих мышцах и способностью к аэробной нагрузке (March, 1981). Тем более удивительно, что такой, казалось бы, выгодный механизм обычно не используется при аэробной тренировке у млекопитающих. Более того, при такой тренировке становятся еще заметнее некоторые различия между красными и белыми волокнами (см. ниже); это указывает на то, что организму в этих условиях выгодно сохранять волокна различного типа. Возможно, это связано с тем, как используются субстраты в красных и белых волокнах и какие приспособительные изменения ферментов происходят в волокнах того и другого типа.

### Влияние аэробной тренировки на запасы эндогенных субстратов

Поскольку выработка энергии в мышцах выше, когда используется либо гликоген, либо гликоген в сочетании с жирами, при аэробной тренировке в мышцах увеличиваются эндогенные запасы *обоих* этих субстратов (Hollooszy, Booth, 1976). Это означает, что общее количество энергии, которое может быть получено из эндогенных жиров и углеводов, увеличивается строго пропорционально их количеству. У животных, хорошо приспособленных к длительной аэробной работе, отмечается высокое содержание эндогенных субстратов в красных мышечных волокнах.

### Влияние аэробной тренировки на ферменты окислительного метаболизма

Как уже говорилось, аэробный метаболический потенциал мышцы зависит от суммарной активности нескольких метаболических путей (в отличие от анаэробного энергообеспечения, при котором используется лишь один путь — гликолиз). В связи с этим можно ожидать (и это подтверждалось — Holloszy, Booth, 1976), что повышение интенсивности дыхательных процессов в мышцах связано с увеличением активности ферментов, участвующих в следующих процессах:

- 1) в активации, переносе и окислении жирных кислот с длинной цепью;
- 2) в окислении кетоновых тел;
- 3) в цикле Кребса;
- 4) в митохондриальной системе переноса электронов;
- 5) в процессах, усиливающих цикл Кребса;
- 6) в путях челночного переноса водорода;
- 7) и даже в инициации обмена глюкозы, содержащейся в крови, при участии гексокиназы.

Обычно активность этих ферментов повышается в волокнах всех трех типов, однако это повышение наиболее выражено в красных волокнах и меньше всего — в белых. Если общее количество энергии, которое может выработать мышца, зависит от природы и количества субстратов (эндогенных или экзогенных), то скорость выработки энергии определяется активностью катаболических ферментов. Таким образом, изменения запаса субстратов и активности ключевых ферментов аэробного метаболизма при аэробной тренировке свидетельствуют о том, что повышается как общее количество получаемой энергии, так и скорость ее выработки. Очевидно, такие же адаптивные изменения генетически закреплены у видов, приспособленных к длительной мышечной работе.

### Влияние аэробной тренировки на количество и состав митохондрий

Перечисленные выше изменения активности ферментов при тренировке, по-видимому, обусловлены увеличением их количества (а не такими механизмами, как, например, изменение каталитической способности). Что касается ферментов аэробного метаболизма, находящихся в митохондриях, то изучение ультраструктуры мышц человека и грызунов показало, что во время тренировки увеличиваются как *размеры*, так и *число* митохондрий, т. е. возрастает общее содержание митохондриального белка. Однако наряду с этим количественным путем адаптации

происходят также изменения ферментного состава и организации митохондрий. Показателем этого могут служить соотношения между изменениями активности различных ферментов (Holloszy, Booth, 1976). В расчете на единицу массы мышцы активность одних ферментов повышается значительно, других — в гораздо меньшей мере, а активность третьих не изменяется вовсе. Аналогичное, но уже генетически закрепленное увеличение числа митохондрий выявляется и при сравнительном исследовании животных, значительно различающихся по выносливости (Hochachka, 1978; Marsh, 1981).

### Влияние аэробной тренировки на активность гликолитических ферментов

Поскольку один и тот же метаболический путь может использоваться и при аэробном, и при анаэробном гликолизе, было бы интересно знать, какое влияние оказывает аэробная тренировка на уровень гликолитических ферментов. Для одного из таких ферментов — гексокиназы — вопрос этот разрешен: при аэробной тренировке его активность в мышечных волокнах любого типа возрастает. В промежуточных волокнах она увеличивается почти вдвое, в красных волокнах примерно в полтора раза, а в белых — примерно на треть. Данные о других гликолитических ферментах менее четки. В красных волокнах слегка повышается уровень гликогенфосфорилазы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы, тогда как в промежуточных волокнах активность тех же ферментов снижается примерно на 20%. Есть сообщения об адаптивных изменениях соотношения между изозимами  $M_4$  и  $H_4$  лактатдегидрогеназы. В белых волокнах аэробная тренировка приводит к небольшому (на 15%) снижению активности лактатдегидрогеназы.

По нашему мнению, такие умеренные изменения гликолитического потенциала согласуются с представлением о том, что достаточно высокий уровень гликолитических ферментов должен поддерживаться на случай экстренной надобности в анаэробной работе. Поскольку поток вещества в реакциях анаэробного гликолиза может быть значительно выше, чем при аэробном гликолизе, активность ферментов должна быть «подогнана» именно к анаэробному пути. Поэтому в аэробных условиях каталитический потенциал ферментов анаэробного гликолиза будет избыточным. Единственное исключение составляет гексокиназа. Это и понятно: в анаэробных условиях главным источником углеводов служит гликоген, однако при аэробной нагрузке по мере того, как работа продолжается, возрастает роль глюкозы. Если работа достаточно интенсивна для того, чтобы через час запасы гликогена в работающих мышцах полностью исто-

щились, то вначале глюкоза, поступающая из печени, дает около 10% общей выработки энергии, а к концу эта величина достигает уже 20% (Hultman, 1978). А поскольку гексокиназа — это фермент одного из регулирующих этапов аэробного гликолиза, повышение ее активности облегчает утилизацию глюкозы печени; поэтому вполне естественно, что уровень гексокиназы в мышцах при аэробной тренировке возрастает; напротив, было бы удивительно, если бы этого не происходило.

### **Влияние аэробной тренировки на превращения гликогена и глюкозы в печени**

Тот факт, что при длительной работе повышается зависимость мышц от глюкозы, поступающей из печени, подчеркивает важность межорганных метаболических взаимодействий во время физической нагрузки. После увеличения тяжести или длительности работы усиленный выход глюкозы из печени связан главным образом с активацией гликогенолиза. В дальнейшем, по мере того как запасы гликогена в печени истощаются, выделение глюкозы начинает происходить за счет усиленного глюконеогенеза (под действием инсулина и глюкагона). При физической нагрузке глюконеогенез может ускориться в 2—10 раз, однако, насколько нам известно, влияние тренировки на такое ускорение не доказано (Hultman, 1978). В этих условиях для образования глюкозы *de novo* в печени используется несколько предшественников (в том числе аланин, глицерол, пируват и лактат), среди которых значительно преобладает лактат. Этот важнейший факт заставляет поднять вопрос о происхождении такого количества лактата, и ответа на этот вопрос пока нет. Как бы то ни было, именно тогда, когда глюконеогенез приобретает решающее значение, жиры становятся главным источником углерода и энергии для аэробной работы. В связи с этим важно выяснить, влияет ли аэробная тренировка на мобилизацию жиров.

### **Влияние аэробной тренировки на метаболизм триацилглицеролов**

Известно, что тренировка, по крайней мере у грызунов и человека, влияет на многие стороны метаболизма триацилглицеролов. При тренировке повышается способность мышцы к окислению жирных кислот, образованию триацилглицеролов путем этерификации с  $\alpha$ -глицеролфосфатом и отложению триацилглицеролов (Holloszy, Booth, 1976). Интересно, что увеличивается даже способность мышц захватывать триацилглицеролы из крови. Эта способность обусловлена связанным с мембраной ферментом ли-

попротеинлипазой, ответственным за гидролиз триацилглицеролов в хиломикронах крови. Недавно было показано, что длительная аэробная тренировка приводит у крыс к увеличению активности липопроотеинлипазы в три раза в промежуточных мышечных волокнах крысы, и в два раза — в красных и белых волокнах. Важнейшее значение усиленного захвата и расщепления триацилглицеролов и жирных кислот в мышцах после аэробной тренировки состоит в том, что при этом может снижаться скорость окисления глюкозы. Это считают важной причиной того, что у тренированных животных при длительной субмаксимальной нагрузке запасы гликогена в печени истощаются медленнее, чем у нетренированных. Прямых данных о скорости высвобождения жирных кислот из жировой ткани в кровь нет, однако некоторое повышение уровня свободных жирных кислот в крови при длительной нагрузке (когда повышена также скорость их окисления) ясно указывает на то, что поступление этих кислот из жировых клеток в мышцы увеличивается. Влияние аэробной тренировки на этот процесс пока не исследовано.

#### **Влияние аэробной тренировки на снабжение мышц кислородом и его использование**

До сих пор мы рассматривали главным образом снабжение работающих мышц углеродными субстратами. Теперь необходимо вспомнить, что все рассмотренные нами метаболические адаптации должны быть тесно координированы с доставкой  $O_2$  работающим мышцам и извлечением (экстракцией)  $O_2$  мышечной тканью из крови. Хорошо известно, что аэробная тренировка приводит к приспособительному увеличению максимального минутного объема сердца и, следовательно, общего количества и скорости доставки  $O_2$  мышцам. Хотя теоретически доставка  $O_2$  мышцам может быть увеличена также путем перераспределения кровотока в пользу мышц, этот механизм, по-видимому, не используется. В связи с этим возникает вопрос: увеличивается ли минутный объем сердца при аэробной нагрузке параллельно общему повышению захвата  $O_2$ ? Ответ на этот вопрос оказался отрицательным.

В среднем (несмотря на значительные индивидуальные колебания) повышение максимального поглощения  $O_2$  в результате тренировки можно лишь примерно наполовину отнести на счет повышения максимального сердечного выброса. Вторую половину обеспечивает усиленная экстракция  $O_2$  работающими мышцами, что находит свое отражение в большей артериовенозной разнице по кислороду и более низком напряжении  $O_2$  в венозной крови (см. Holloszy, Booth, 1976). Какие механизмы ответственны за усиленную экстракцию  $O_2$ , пока неясно.

### Дополнение

Недавно при исследовании скорости оборота метаболитов во время нагрузки были получены неожиданные результаты. Один из них состоит в том, что при длительной мышечной работе значительная часть  $\text{CO}_2$  образуется из углеводов через лактат. По-видимому, скорость образования лактата в быстрых гликолитических волокнах примерно такая же, как и скорость его использования в «аэробных» волокнах, и в этом случае суммарный эффект может быть обусловлен одновременной работой волокон того и другого типа. Это может быть выгодно как с механической, так и с метаболической точки зрения (см. С. М. Donovan, G. A. Brooks, *Endurance training affects lactate clearance, not lactate production*, Amer. J. Physiol., 244 [1983]: E83—E92).



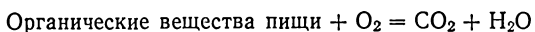
## Особенности метаболизма в условиях аноксии

### Первые живые организмы, вероятно, были анаэробами

Энергия химических связей любой восстановленной органической молекулы (углеводной, липидной или белковой) извлекается в максимальной степени при распаде этой молекулы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Для столь полного сгорания веществ необходим молекулярный кислород. Вот почему метаболизм большинства современных организмов ориентирован на окисление питательных веществ кислородом. Однако не всегда это было так. Насколько мы можем судить сегодня, для ранних стадий развития нашей планеты было характерно наличие восстановительной атмосферы (Crick, 1981) и, следовательно, отсутствие в ней молекулярного кислорода; поэтому первыми обитателями Земли стали анаэробные прокариоты. С появлением фотосинтеза началось постепенное накопление  $\text{O}_2$  в атмосфере, и это было важнейшим поворотным пунктом в развитии жизни на планете (Wald, 1964). Действительно, высвобождаемый при фотосинтезе кислород — один из конечных продуктов метаболизма растений — со временем начал катастрофически загрязнять процветающий ранее анаэробный мир (Lovelock, 1979). Условия гипероксии весьма неблагоприятны даже для современных организмов; вероятно, при избытке  $\text{O}_2$  концентрация образующихся высокоактивных свободных радикалов становится непосильной нагрузкой для защитных механизмов клетки (см. гл. 3). Недавно было показано, что молекулярный кислород далеко не всегда равномерно распределяется путем диффузии по всему объему клетки. Области его высокой концентрации могут быть ограничены транспортными «каналами», ведущими к митохондриям. Возможно, такое отношение к  $\text{O}_2$  клетка унаследовала от предков, метаболические системы которых были чувствительны к кислороду (Longmuir et al., 1979). Это позволило бы также объяснить существование таких ферментов, как изозим лактатдегидрогеназы ЛДГ<sub>к</sub>: его чувствительность к кислороду столь велика, что он проявляет каталитическую активность только в условиях гипоксии или аноксии. Если построить «кривую ингибирования» ЛДГ<sub>к</sub> кислородом, то концентрация  $\text{O}_2$ , соответствующая величине «полу-

ингибирования» фермента, будет близка к значению  $P_{50}$  для гемоглобина (Anderson et al., 1983). Экспериментально показано, что ЛДГ<sub>к</sub> инактивируется самим молекулярным кислородом, а не образующимися свободными радикалами. Хотя такой чувствительный к  $O_2$  фермент может быть просто историческим реликтом, свидетельствующим об анаэробном происхождении жизни на нашей планете, не исключено и то, что ферменты, подобные ЛДГ<sub>к</sub>, выполняют особые метаболические функции в условиях гипоксии или аноксии. В этом случае так называемую кислородную инактивацию фермента следовало бы рассматривать скорее как механизм выключения этих функций при нормальном снабжении кислородом. Но какая бы из этих интерпретаций ни оказалась верной, преимущества, связанные с использованием молекулярного кислорода, сопряжены, видимо, с некоторым риском для функциональной целостности внутриклеточного метаболического аппарата.

Насколько нам сегодня известно, этот риск не так уж велик; он был бы значительно больше, если бы зависимость организма от кислорода стала абсолютной, т. е. при полной утрате способности к анаэробному обмену. Дело в том, что снабжение клеток кислородом может меняться. В любом организме по разным причинам (внешним или внутренним) могут создаваться условия недостатка  $O_2$ . Кратковременные перерывы в снабжении ткани кислородом могут помешать полному переходу на аэробный метаболизм. Периодическая нехватка  $O_2$  в окружающей среде (в толще ила, в небольшом водоеме или в невентилируемой норе) была бы крайне опасной для существа, абсолютно зависимо-го от  $O_2$ . В некоторых случаях вся жизнь организма может проходить в бескислородной среде, и тогда уравнение

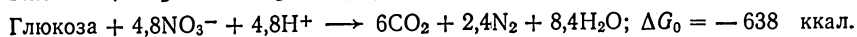
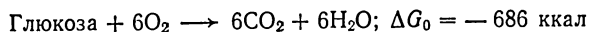


окажется вообще неприменимым для описания его метаболизма. Использование  $O_2$ , несомненно, дает большие преимущества, однако лишь при том условии, что кислород будет доступен постоянно и в достаточном количестве; поэтому большинство организмов сохранило в той или иной степени способность к анаэробнозу. Анаэробный метаболизм, как правило, осуществляется в одном из двух вариантов. В главе 4 мы обсуждали вариант, позволяющий развивать высокую мощность, — использование анаэробного гликолиза и реакции гидролиза того или иного фосфагена с целью обеспечить быстрый оборот АТФ. Эта стратегия может оказаться полезной лишь при кратковременной аноксии в течение нескольких секунд или минут. Вот почему чаще встречается другой вариант анаэробного метаболизма, который характеризуется низкой мощностью (нередко при этом выход АТФ на 1 моль сбраживаемого субстрата удается не-

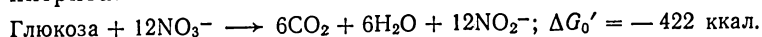
сколько повысить). Этот вариант используется тогда, когда необходимо выжить при нехватке  $O_2$  в течение длительного промежутка времени. В этой главе мы рассмотрим разнообразные механизмы, используемые прокариотами и эукариотами в таких ситуациях, когда  $O_2$  вообще не может служить терминальным акцептором электронов. Мы увидим, что проблема, порожденная недостатком  $O_2$ , решается самыми различными способами, начиная от передачи функции  $O_2$  его «заменителю», например нитрату ( $NO_3^-$ ), который используется в процессе так называемой «диссимиляционной нитратредукции», и кончая формированием новых вариантов брожения (с необычными конечными продуктами), позволяющих извлечь из пищевых веществ больше энергии, чем при обычных видах брожения. Мы рассмотрим прежде всего «заменители кислорода», используемые некоторыми бактериями, так как эффективность этого метаболического «изобретения» довольно высока и сравнима с эффективностью сжигания веществ с помощью кислорода.

#### Истинное брожение в сопоставлении с дыханием (анаэробным и аэробным)

Все метаболические механизмы или стратегии, избираемые различными организмами для решения проблемы выживания в условиях гипоксии, основаны на использовании «заместительных» функций, тем или иным способом компенсирующих нехватку кислорода. Лучше всего, по крайней мере в энергетическом отношении, с этой проблемой справились денитрифицирующие бактерии. Главная особенность их метаболизма состоит в том, что в отсутствие кислорода они способны переключаться на нитратное дыхание. И кислородное, и нитратное окисление субстрата, например глюкозы, сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, т. е. оба процесса с термодинамической точки зрения одинаково выгодны:



Денитрифицирующие бактерии извлекают пользу из сходства этих двух процессов, прибегая к нитратному дыханию в условиях, когда кислород отсутствует. При этом нитрат восстанавливается до  $N_2$  — конечного продукта, вполне аналогичного  $CO_2$  и даже менее опасного для клетки. Группа денитрифицирующих бактерий довольно обширна и включает разнообразные бациллы и псевдомонады. Некоторые бактерии способны к нитрат/нитритному дыханию, при котором нитрат восстанавливается до нитрита:



Образующийся нитрит выводится из организма сразу или после восстановления его до аммиака (однако синтез АТФ в этом случае не происходит). Ферментные системы, обеспечивающие нитрат/нитритное дыхание и денитрификацию, образуются только при низком парциальном давлении кислорода или его полном отсутствии. Кислород действует, наоборот, как сильный ингибитор ферментов диссимиляционной нитратредукции. Таким образом, денитрификация и нитрат/нитритное дыхание возможны лишь тогда, когда кислорода нет или его недостаточно.

При денитрификации, так же как и при кислородном дыхании, органический субстрат может полностью окисляться до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Например, при анаэробном росте *Bacillus licheni-*

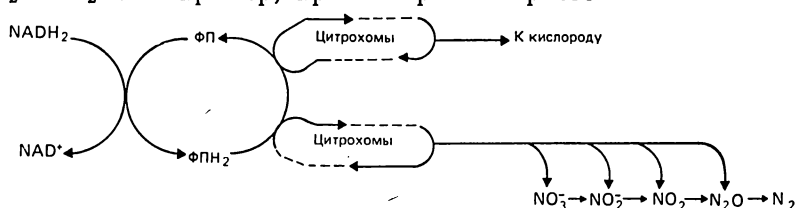


Рис. 5-1. Альтернативные пути дыхания у денитрифицирующих бактерий с использованием нитрата или  $\text{O}_2$  в качестве конечного акцептора электронов. Вместо «цитрохемы» следует читать «цитохромы».

*formis* на среде с глюкозой и нитратом субстрат расщепляется в реакциях гликолиза и цикла Кребса.  $\text{NADH}_2$  и  $\text{FADH}_2$  по-прежнему используются в качестве доноров электронов для дыхательной цепи. Однако нитрат не просто заменяет кислород; в нитратном дыхании участвуют особые цитохромы и мембраносвязанные ферментные системы, которые последовательно восстанавливают нитрат до нитрита и далее до  $\text{N}_2$ . Этот процесс состоит по меньшей мере из четырех этапов (рис. 5-1).

Показано, что по крайней мере два этапа восстановления нитрата (а возможно, и большее их число) у денитрифицирующих бактерий сопряжены с образованием АТФ. Эти данные свидетельствуют (как и следовало ожидать на основании термодинамических расчетов), что выход АТФ на 1 моль глюкозы при денитрификации и при нормальном окислительном метаболизме одинаков (ссылки на литературу см. у Gottschalk, 1979).

Из сказанного очевидно, что нитратное дыхание, как и кислородное, характеризуется тремя основными особенностями:

1) в обоих случаях окисление глюкозы сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, так что оба процесса термодинамически очень выгодны;

2) происходящий в обоих случаях полный распад глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  не сопровождается накоплением больших количеств продуктов частичного катаболизма;

3) оба процесса в равной мере эффективны, т. е. выход АТР на 1 моль углеродсодержащего субстрата при нитратном и кислородном дыхании одинаков благодаря надежному сопряжению процессов переноса электронов и фосфорилирования.

Мы видим, таким образом, что анаэробное дыхание с использованием нитрата как терминального акцептора электронов более сходно с аэробным дыханием, чем с брожением; это особый вариант анаэробного дыхания. Луи Пастер, великий исследователь процессов дыхания и брожения, определил брожение просто как жизнь в отсутствие кислорода. Но сейчас, спустя столетие после пионерских работ Пастера, это определение следует уточнить. Брожением мы называем теперь *метаболические процессы, происходящие в темноте без участия дыхательных цепей*, в которых терминальным акцептором электронов служил бы кислород или нитрат.

### Сущность брожения

При истинном брожении образование конечного продукта из субстрата, например из глюкозы, сопровождается умеренным (по сравнению с дыханием) уменьшением свободной энергии, так как процессы фосфорилирования в этом случае не сопряжены с переносом электронов по электрон-транспортной цепи. В основе брожения лежат разнообразные окислительно-восстановительные реакции, в которых участвуют органические соединения,  $\text{CO}_2$ , молекулярный водород или соединения серы. Выход энергии в этих реакциях (число молей АТР на 1 моль сбраживаемого субстрата) довольно низок, и поэтому при выращивании анаэробных клеток прирост их биомассы (в расчете на моль субстрата) гораздо меньше, чем при выращивании видов, жизнедеятельность которых зависит от дыхания.

Микроорганизмы, способные к брожению, подразделяются на факультативных и облигатных анаэробов. Факультативные анаэробы (например, энтеробактерии) используют  $\text{O}_2$ , если он имеется в среде, и переключаются на брожение в анаэробных условиях. В отличие от них облигатные анаэробы не способны синтезировать компоненты электрон-транспортных систем и потому не могут расти как аэробы. Более того, многие из них вообще не выносят кислорода и на воздухе погибают. Такие организмы называют строгими анаэробами.

Для брожения характерно накопление частично окисленных конечных продуктов. С энергетической точки зрения этот вид метаболизма малоэффективен, так как большая часть химической энергии, содержащейся в молекуле субстрата, сохраняется неиспользованной в образующихся конечных продуктах. Эти продукты нередко вредны для клеток и при повышении их кон-

центрации могут ингибировать дальнейший рост микробов или их метаболизм. Конечные продукты анаэробного обмена весьма характерны, поэтому различные виды истинного бактериального брожения часто получают названия по их главному продукту. У анаэробных бактерий часто встречается, например, спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое, маслянокислое, смешанное кислотное, уксуснокислое, метановое и сульфидное брожение.

Два из перечисленных видов брожения на первый взгляд близки к кислородному и нитратному дыханию — это восстановление  $\text{CO}_2$  до метана и сульфата до сульфида. Однако при ближайшем рассмотрении этих процессов выявляется их существенное отличие от денитрификации. Прежде всего  $\text{CO}_2$  и сульфат восстанавливают только строгие анаэробы, в то время как к восстановлению нитрата способны (в отсутствие  $\text{O}_2$ ) лишь аэробные микроорганизмы. Не менее важно и то, что денитрифицирующие бактерии обладают настоящей дыхательной цепью, у организмов же, восстанавливающих сульфат и  $\text{CO}_2$ , ее нет. Существенно различны эти процессы и в энергетическом отношении. Если при восстановлении  $\text{O}_2$  и нитрата изменение свободной энергии примерно одинаково, то при восстановлении  $\text{CO}_2$  и сульфата оно намного меньше. Фактически оно настолько мало, что не приходится ожидать синтеза одной молекулы АТФ при окислении одной молекулы  $\text{H}_2$  или  $\text{NADH}$ . В связи с этим образование АТФ, сопряженное с переносом электронов, происходит не на всех этапах процесса, а лишь при восстановлении одного или двух интермедиатов; поэтому выход АТФ при образовании метана и сульфида невелик, что вообще характерно для брожения.

### Общая организация процесса брожения у бактерий

Принципы организации бактериального брожения немногочисленны и едины для всех видов. Во-первых, брожение никогда не завершается полным окислением субстрата, хотя круг сбраживаемых микробами веществ необычайно широк: почти всякое органическое соединение в определенных условиях сбраживается каким-то микроорганизмом. Во-вторых, любая окислительная реакция (или совокупность реакций) всегда «уравновешивается» последующими процессами восстановления, с тем чтобы обеспечить непрерывность брожения. Органические вещества в реакциях восстановления обычно служат акцепторами электронов и протонов. Образующиеся при этом органические конечные продукты сначала в той или иной мере накапливаются в клетке, а затем выводятся из нее. В-третьих, поскольку при образовании любого конечного продукта брожения изменение свободной энергии невелико, выход АТФ тоже, как правило, не-

высок и нередко составляет всего лишь один-два моля на моль субстрата. В-четвертых, в ходе брожения не все реакции доставляют энергию — часть их нужна лишь для образования ключевых метаболитов, необходимых для процессов биосинтеза и роста. Такие метаболиты могут быть непосредственно связаны с анаэробными путями генерации энергии или же не связаны с ними; в последнем случае для удовлетворения различных нужд могут сбраживаться разные субстраты. Наконец, одноклеточной системе выгодно в любой данный момент синтезировать не весь свойственный ей набор ферментов, а лишь те из них, которые нужны для удовлетворения текущих потребностей. Это означает, что биосинтез ферментов в клетке должен очень строго контролироваться. Механизм контроля известен — микробиологам уже более двух десятилетий: он включает процессы индукции и репрессии ферментов. Индукция обычно используется для регуляции уровня катаболических ферментов, а репрессия — для контроля анаболических путей (Gottschalk, 1979).

Следует подчеркнуть, что наряду с поддержанием должных уровней катаболических и анаболических ферментов необходимо контролировать также содержание ферментов, относящихся к центральным путям обмена. Дело в том, что потребность в сопрягающих интермедиатах может изменяться в зависимости от доступности  $O_2$  и субстрата, от скорости роста и интенсивности метаболизма. Например, оказавшись в бескислородной среде, факультативные анаэробы уже не нуждаются во всех ферментах цикла Кребса; поэтому не удивительно, что при выращивании клеток *E. coli* в анаэробной среде синтез 2-оксоглутаратдегидрогеназы, связывающей первый и второй отрезки цикла Кребса, у них прекращается. Синтез же других ферментов этого цикла продолжается, и для этого есть основательные причины (рис. 5-2). Первый отрезок цикла Кребса должен по-прежнему обеспечивать клетку глутаматом, нужным для различных биосинтезов. Поэтому даже в анаэробных условиях продолжается синтез цитратсинтазы, аконитазы и изоцитратдегидрогеназы, хотя их количества соответственно уменьшаются. Реакции же второго отрезка цикла Кребса (сукцинат  $\rightarrow$  оксалоацетат) в анаэробных условиях протекают в обратном направлении (оксалоацетат  $\rightarrow$  сукцинат): на уровне восстановления фумарата до сукцината генерируется АТФ, а сукцинат накапливается в клетке как конечный продукт, хотя некоторая его доля может использоваться в биосинтетических процессах. Таким образом, соответствующие ферменты должны синтезироваться и в условиях аноксии.

Рассмотренные принципы, вообще говоря, должны быть применимы в условиях аноксии к любой отдельно взятой клетке и, в частности, к клеткам высших организмов. Однако в действи-

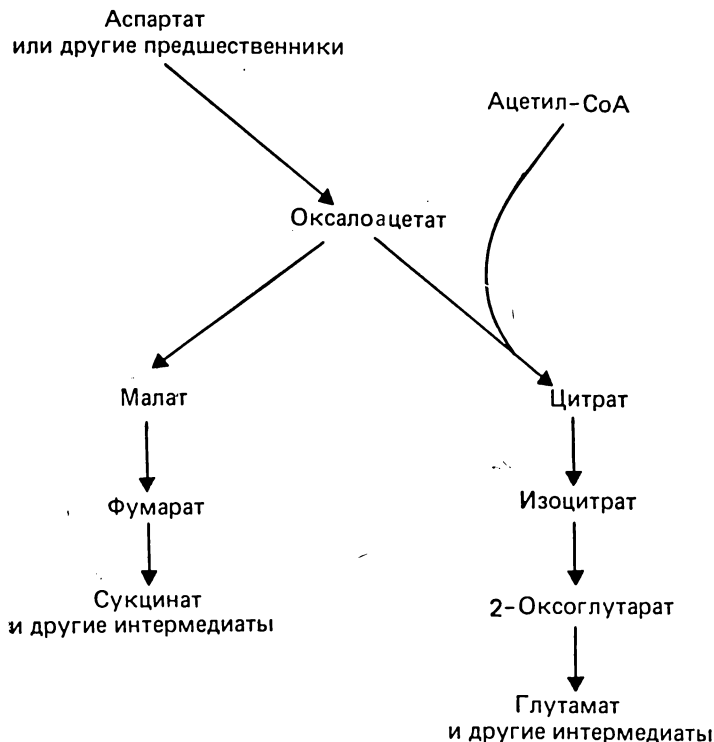


Рис. 5-2. Метаболизм бактерий и дрожжей — факультативных анаэробов: реакции цикла Кребса в отсутствие  $O_2$ .

тельности только микроорганизмы при аноксии способны полностью обеспечивать себя всем необходимым и могут поэтому рассматриваться как закрытые системы, тогда как клетка многоклеточного организма даже при аноксии остается открытой системой. В отсутствие кислорода ткани и органы сохраняют связь между собой, и их взаимодействия нужно учитывать при анализе метаболизма. Это одно из важнейших различий между многоклеточными и одноклеточными организмами, определяющее ряд существенных адаптаций многоклеточных животных к аноксии.

### Животные-анаэробы как пример систем автономного жизнеобеспечения

Все животные в состоянии выдержать кратковременную аноксию, но лишь некоторые виды столь выносливы к отсутствию кислорода, что их можно отнести к факультативным ана-



эробам. облигатные анаэробы хотя и существуют, но встречаются довольно редко, в основном среди гельминтов. Наибольшей способностью к анаэробнозу (если ее оценивать по времени выживания в условиях аноксии) обладают беспозвоночные — паразитические черви, кольчатые черви, живущие в норах, двусторчатые моллюски приливной зоны. Необычайно устойчивые к аноксии виды встречаются и среди позвоночных. Обычная золотая рыбка может прожить в бескислородной среде по меньшей мере несколько суток, а некоторые пресноводные черепахи (например, каймановые) при пониженной температуре выдерживают аноксию на протяжении месяцев. Такой организм, отрезанный от обычных для него источников кислорода, на более или менее длительное время становится, по существу, многокомпонентной системой с автономным жизнеобеспечением.

Хотя отдельные компоненты в такой системе могут быть объединены различным образом, в любом случае организация метаболизма у животных-анаэробов должна удовлетворять ряду условий, с тем чтобы обеспечивать три важнейших аспекта их жизнедеятельности:

1. Необходимы подходящие резервные субстраты, и расходование их должно регулироваться таким образом, чтобы их внутриклеточные запасы не истощались, а с другой стороны — чтобы их все время хватало для энергетических нужд различных тканей и органов в период аноксии.

2. Должны быть созданы надлежащие условия для депонирования, повторного использования или минимального образования вредных отходов метаболизма, высокие концентрации которых могли бы сокращать время толерантности животного к условиям аноксии.

3. При возвращении организма в аэробные условия он должен быть способен к восстановлению исходного метаболического гомеостаза.

Эти условия относятся к системе жизнеобеспечения в целом, а не только к отдельным ее частям. Как мы увидим, для удовлетворения нужд всей системы нередко решающее значение имеют взаимодействия между ее компонентами. Вот почему клеточные механизмы приспособления к условиям аноксии у многоклеточных животных не столь разнообразны, как у микроорганизмов, но могут быть столь же эффективными; вопросу о том, почему это так, и посвящена в значительной части эта глава.

### Условие I:

приведение доступности субстрата  
в соответствие с энергетическими потребностями  
организма

#### Гликоген в центральном депо

Уже более полувека известно, что в анаэробных условиях основным метаболическим «топливом» у всех животных служат углеводы, в особенности гликоген. В небольших количествах гликоген содержится почти во всех тканях, однако у позвоночных большая его часть откладывается в печени. Можно сказать поэтому, что печень служит своего рода центральным депо этого резервного субстрата. Именно из этих запасов удовлетворяются основные потребности организма в глюкозе. У позвоночных, хорошо приспособленных к аноксии, например у золотой рыбки (табл. 5-1), при отсутствии  $O_2$  главным источником углерода и

Таблица 5-1. Содержание гликогена в печени позвоночных животных с различной толерантностью к аноксии. (По данным обзоров: Hochachka, 1982; Van den Thrillart, 1982)

	Гликоген, мкмоль глюкозы на 1 г ткани
<i>Виды, устойчивые к аноксии</i>	
Золотая рыбка	1300
Черепаха	860
<i>Виды с низкой устойчивостью</i>	
Форель	235
Ушастый окунь	185
Крыса	210
Мышь	220

энергии, несомненно, является гликоген печени, при мобилизации которого глюкоза поступает в кровь. Соответствующих данных для многих групп беспозвоночных нет, но у ряда изученных животных, например у *Mytilus*, обнаружены те же особенности; роль центрального депо у них выполняют гепатопанкреас и мантия, где в условиях, благоприятных для запасаания энергии, содержание гликогена может достигать половины сухой массы (De Zwaan, 1983). Эта величина резко меняется на протяжении года в зависимости от условий питания: вероятно, за счет моби-

лизации гликогена сглаживаются колебания уровня глюкозы в других тканях организма.

Если в периоды аноксического стресса центральное депо гликогена поставляет метаболическое «топливо» для всего организма, то толерантность того или иного вида к аноксии должна в общем коррелировать с содержанием гликогена в этом депо. На последнюю величину могут влиять и иные факторы (особенно условия питания), поэтому довольно трудно получить сопоставимые данные для разных видов животных. Однако из таблицы 5-1 можно видеть, что золотая рыбка и черепаха — позвоночные, наиболее толерантные к гипоксии, — явно отличаются от всех остальных по запасам гликогена. Концентрация его в печени этих животных составляет около 1 М (в пересчете на глюкозильные группы) и даже выше; несомненно, именно этот гликоген и используется во время аноксии. Животные в этих условиях, так же как и анаэробные бактерии, сталкиваются с затруднением, обусловленным малой энергетической эффективностью брожения. Животные к тому же должны решить еще одну проблему: как распределять из центрального депо убывающие запасы гликогена между тканями и органами, когда все они нуждаются в больших количествах энергии.

Обычно животные клетки, получающие энергию от сжигания углеводов, при недостатке  $O_2$  начинают потреблять намного больше глюкозы (так называемый эффект Пастера). Это связано с низкой эффективностью анаэробного гликолиза. При окислительном метаболизме выход АТФ составляет около 38 моль на 1 моль окисленных глюкозильных групп гликогена (гл. 2), а при сбраживании гликогена до лактата — всего лишь 3 моль. Очевидно, что *если бы в периоды аноксии потребность тканей в АТФ оставалась на прежнем уровне*, то расход гликогена и глюкозы во всех тканях должен был бы увеличиться в 12—13 раз и более. Это приводило бы к быстрому истощению центрального депо гликогена и снижению уровня глюкозы в крови. Как это ни удивительно, у факультативных анаэробов аноксический стресс не ведет к таким последствиям. Запасы гликогена в печени золотой рыбки отнюдь не истощаются полностью даже после очень длительной (четырёхдневной) аноксии (Shoubridge, Hoshachka, 1981). У двустворчатых моллюсков (устриц и др.) за несколько дней аноксии резервный гликоген тоже расходуется лишь частично (De Zwaan, 1983). Таким образом, очевидно, что даже при мобилизации гликогена из центральных депо в период аноксического стресса не происходит ожидаемого быстрого и значительного снижения уровня глюкозы в крови. Возникает вопрос, каким образом он стабилизируется? Можно указать по меньшей мере три механизма, используемые с этой целью:

- 1) большие количества гликогена запасаются в других тканях (помимо центральных депо);
- 2) используются более эффективные формы брожения;
- 3) снижается интенсивность метаболизма.

Каждая из этих стратегий заслуживает отдельного рассмотрения, так как относительное значение их у разных животных различно.

### Депонирование гликогена в периферических тканях и органах

Вероятно, самый простой способ уменьшить зависимость от центральных гликогеновых депо — это поддерживать высокое содержание гликогена также и в других тканях. Оттуда он в случае аноксии тоже мог бы мобилизоваться — одновременно с использованием глюкозы крови или независимо от него. И действительно, уровень гликогена в большинстве исследованных тканей у наиболее приспособленных к анаэробным условиям животных оказался довольно высоким (см. Hochachka, 1982). Например, в жабрах и мышцах *Mytilus* содержание глюкозильных групп гликогена на 1 г ткани достигает 200 мкмоль. Запасы гликогена в сердечной мышце у черепахи больше, чем у всех исследованных позвоночных (около 250 мкмоль/г). Уровень гликогена в белой и красной мускулатуре золотой рыбки тоже очень высок — соответственно  $1/10$  и  $1/3$  от огромной величины, характеризующей содержание гликогена в печени. Таким образом, данная стратегия, несомненно, находит широкое применение у большинства (если не у всех) животных, хорошо приспособленных к анаэробным условиям.

При адаптации к аноксии заметно изменяется не только количество гликогена в тканях, но и способ его хранения. Резервная форма гликогена при относительно низком его содержании в тканях позвоночных представлена  $\beta$ -частицами. В тканях с относительно высоким содержанием гликогена (например, в печени золотой рыбки) наряду с  $\beta$ -частицами присутствуют частицы большего размера, около 1000 Å в диаметре —  $\alpha$ -частицы и гликогеновые тельца.

Очевидно, высокое содержание гликогена в различных тканях и сама форма его хранения помогают организму устранить опасность быстрого падения уровня глюкозы в крови при аноксии. Однако один только этот механизм не смог бы обеспечить достаточно продолжительную устойчивость к аноксии. Известно, например, что устрица может прожить без кислорода много недель; ни увеличенные запасы гликогена, ни соответствующее изменение скорости его утилизации не смогли бы обеспечить работу сердечной мышцы этого животного столь долгое время. Но, поскольку потребность в больших запасах гликогена (глю-

козы) обусловлена низкой энергетической эффективностью анаэробного метаболизма, одним из решений проблемы могли бы стать более эффективные (в отношении синтеза АТР) пути анаэробных процессов.

### Виды брожения с повышенной энергетической эффективностью

Лучшие примеры альтернативных путей брожения мы находим у беспозвоночных, наиболее приспособленных к анаэробным условиям, — гельминтов и морских двустворчатых моллюсков. Многие из этих путей в последние годы неоднократно обсуждались (De Zwaan, 1983), поэтому мы ограничимся краткой сводкой. Согласно современным представлениям, анаэробный метаболизм включает ряд неразветвленных, мало связанных между собой путей. Наибольшее значение имеют следующие пути (помимо классического пути сбраживания глюкозы до лактата, при котором образуется два моля АТР на моль глюкозы):

- 1) глюкоза  $\rightarrow$  октопин, лизопин, аланопин или стромбин; энергетический выход 2 моль АТР/моль глюкозы;
- 2) глюкоза  $\rightarrow$  сукцинат; 4 моль АТР/моль глюкозы;
- 3) глюкоза  $\rightarrow$  пропионат; 6 моль АТР/моль глюкозы;
- 4) аспартат  $\rightarrow$  сукцинат; 1 моль АТР/моль аспартата;
- 5) аспартат  $\rightarrow$  пропионат; 2 моля АТР/моль аспартата;
- 6) глутамат  $\rightarrow$  сукцинат; 1 моль АТР/моль глутамата;
- 7) глутамат  $\rightarrow$  пропионат; 2 моль АТР/моль глутамата;
- 8) аминокислоты с разветвленной цепью  $\rightarrow$  летучие жирные кислоты; 1 моль АТР/моль субстрата;
- 9) глюкоза  $\rightarrow$  ацетат; 4 моль АТР/моль глюкозы;
- 10)  $\text{CH}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ ; 6 моль АТР/моль глюкозы.

Пути с первого по четвертый обнаружены у разнообразных двустворчатых моллюсков; второй, третий, восьмой и девятый часто встречаются у гельминтов; пятый, шестой и седьмой, хотя теоретически и возможны у двустворчатых моллюсков, по-видимому, не используются в сколько-нибудь значительной мере (De Zwaan, 1983; Nochachka et al., 1983). Десятый путь — окисление органических субстратов сульфатом — как известно, реализуется в высоковосстановленных слоях донного ила, но пока еще не выяснена мера участия в этом процессе бактерий и низших беспозвоночных; эти две группы организмов тесно сосуществуют в так называемом «серо-сульфидном биоме», причем и бактерии, и беспозвоночные [по крайней мере те из них, которые находятся в симбиотических отношениях с серобактериями (Felbeck et al., 1983)] обладают ферментами, необходимыми для метаболизма сульфатов и сульфидов; поэтому можно предполо-

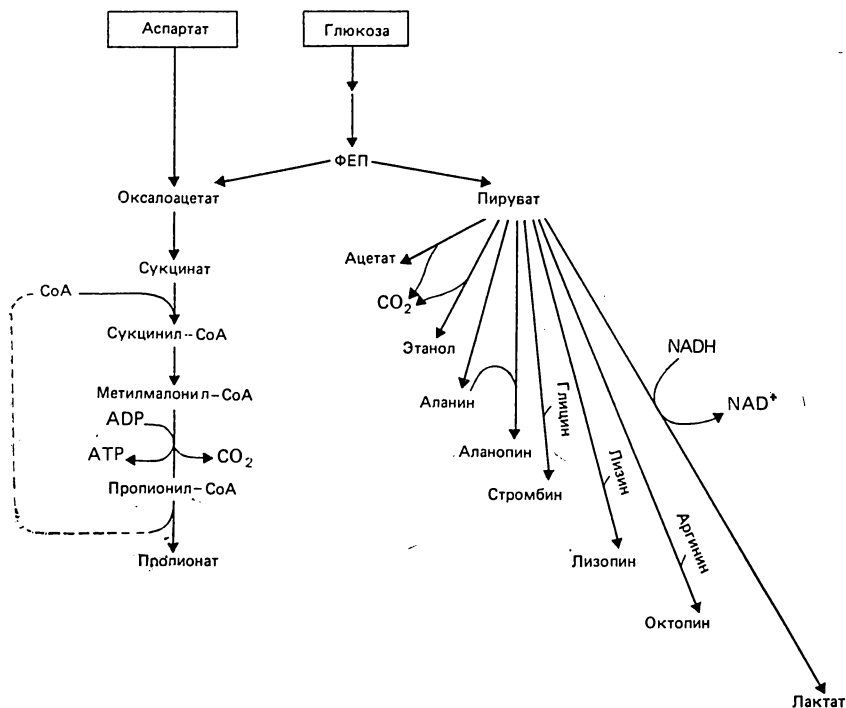


Рис. 5-3. Разветвление метаболического пути на уровне фосфоенолпирувата (ФЕП) у двустворчатых моллюсков и других беспозвоночных — факультативных анаэробов.

жить, что в восстановлении сульфата, наблюдаемом в донных осадках, участвуют обе группы организмов (Powell et al., 1980).

Пути образования большинства рассмотренных выше конечных продуктов достаточно изучены, и по этому вопросу в целом достигнуто общее согласие. (Исключение составляют организмы, использующие сульфат в качестве акцептора электронов при окислении органических субстратов.) Изучение этих систем продолжается — кое-какие проблемы еще ждут своего решения.

Например, путь сбраживания глюкозы у многих беспозвоночных (гельминтов, полихет, сипункулид, двустворчатых, брюхоногих и головоногих моллюсков и, возможно, многих других групп животных) разветвляется на уровне фосфоенолпирувата (ФЕП) (рис. 5-3). При этом в одних условиях ФЕП-карбоксикиназа катализирует карбоксилирование ФЕП с образованием оксалоацетата, который превращается затем в сукцинат и в конечном итоге в пропионат. В других же условиях или у других

животных (особенно часто у моллюсков) ФЕП превращается в пируват, а далее (в зависимости от вида животного или типа ткани) — в один из возможных конечных продуктов. Некоторые данные по этому вопросу рассмотрены в ряде обзоров. Изучается и вопрос о том, какие конечные продукты преимущественно образуются в тех или иных условиях. Едва ли нам следует вдаваться в детали этих исследований, но важно подчеркнуть, что такие конечные продукты, как октопин, аланопин, стромбин и лизопин функционально аналогичны обычному лактату (а ферменты, катализирующие их образование, аналогичны лактатде-

Таблица 5-2. Фосфорилирование, сопряженное с образованием сукцината. (По данным Schöttler, 1977, полученным на *Tubifex* в условиях аноксии. Ссылки на литературу по гельминтам см. в работе Saz, 1981. Количества метаболитов выражены в микромолях)

Количество добавленного мала	Разобщающий агент	Количество образованного сукцината	Количество синтезированного АТФ	Отношение АТФ/сукцинат
5	0	3,3	1,2	0,35
5	0	3,5	1,4	0,41
5	0	3,7	1,8	0,50
5	1,5	3,9	0,3	0,09
5	1,5	3,7	0,2	0,07

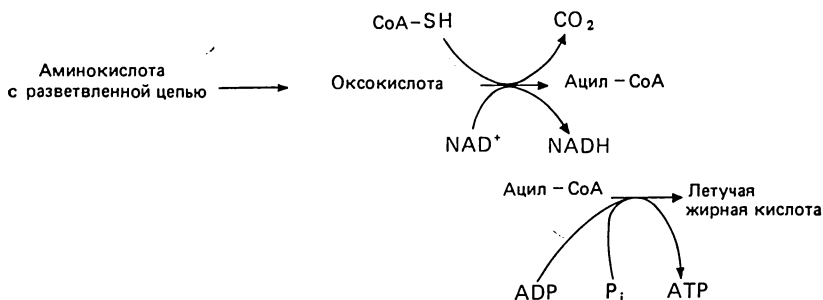
гидрогеназе). Указанные конечные продукты, как и лактат, служат для выведения водородных и углеродных атомов из метаболических процессов (т. е. выполняют функцию «стока»), поддерживая тем самым окислительно-восстановительный баланс анаэробного метаболизма (Storey, Storey, 1983).

Пока не вполне понятно также, каким образом у гельминтов и двустворчатых моллюсков на пути от сукцината к пропионату происходит перенос CoA и какая именно реакция приводит к освобождению пропионата. Недавние исследования на гельминтах говорят в пользу конечного этапа с участием CoA-трансферазы (рис. 5-3). Но каков бы ни был конкретный путь сбраживания глюкозы (гликогена) в пропионат, его значение при длительной аноксии у двустворчатых моллюсков (например, у *Mytilus*) заметно возрастает. Считается, что выход энергии на уровне сукцината составляет максимум 4 моль АТФ на 1 моль глюкозы; в целом же в реакциях пропионатного пути (если принять схему, приведенную на рис. 5-3) энергетический выход может достигать 6 моль АТФ на 1 моль глюкозы.

АТФ образуется в процессе субстратного фосфорилирования на уровне фумарата (при участии фосфоглицераткиназы и

ФЕП-карбоксикиназы) и фосфорилирования, сопряженного с транспортом электронов (на уровне фумаратредуктазы, табл. 5-2). Последний этап пропионовокислого брожения, приводящий к образованию АТФ, катализируется карбоксилазой (рис. 5-3).

Общий путь образования летучих жирных кислот, по-видимому, состоит из трех фаз:



В последней реакции (тиокиназной) возможен синтез одной молекулы АТФ на 1 моль образующейся летучей жирной кислоты. У большинства животных-анаэробов эти реакции не служат важными источниками АТФ, но у *Fasciola* они, вероятно, играют первостепенную роль в его синтезе, так как сопряжены с путем сбраживания глюкозы в пропионат. Общий энергетический выход в таких случаях может достигать 8 моль АТФ на 1 моль глюкозы + 2 моль используемой аминокислоты (лейцина или другой аминокислоты с разветвленной цепью).

Концентрация аспартата в сердечной мышце устрицы (Collicutt, Hochachka, 1977), *Mytilus* и других двустворчатых моллюсков (De Zwaan, 1983) в аэробных условиях довольно высока (около 15 мкмоль/г). При аноксии большая часть аспартата сбраживается до сукцината, причем роль этого процесса особенно велика на начальном этапе аноксии, когда он скорее всего сопряжен с гликолизом через соответствующие окислительно-восстановительные реакции. Это увеличивает выход энергии на 1 моль АТФ/моль аспартата, если последний сбраживается до сукцината, или на 2 моль АТФ, если брожение идет до образования пропионата. Максимальная же величина общего энергетического выхода достигает 8 моль АТФ на 1 моль глюкозы + +1 моль аспартата, сбраживаемых до пропионата.

Из всего сказанного видно, что разнообразие форм анаэробного метаболизма достаточно велико, и формы, обычные у высших позвоночных, составляют лишь малую долю этого разнообразия. Оценить энергетическую эффективность различных видов брожения по сравнению с эффективностью «обычного» анаэроб-



ного гликолиза нелегко, так как на разных этапах аноксии, оказывается, могут использоваться разные комбинации метаболических путей (De Zwaan, 1983). Однако даже в этом случае выход АТР может быть увеличен в два — четыре раза; поэтому в анаэробных условиях у всех животных, использующих такие виды брожения, автоматически снижается в два — четыре раза потребность в глюкозе. Эта цифра, конечно, впечатляет, однако она недостаточна для того, чтобы сгладить различие между энергетической эффективностью анаэробного гликолиза и окислительного расщепления глюкозы. Чтобы приспособиться к аноксии, животному остается только одно — *снизить до минимума потребность в глюкозе, уменьшив интенсивность метаболизма, а тем самым и потребность в АТР.*

#### **Уменьшение потребности в глюкозе в анаэробных условиях путем снижения метаболизма**

Золотая рыбка и пресноводная черепаха, вероятно, изучены лучше всех других позвоночных, способных к анаэробизму, и поэтому о них мы имеем больше всего данных (о пресноводной черепахе уже шла речь в главе 5). Хорошо известно, что при пониженной температуре золотая рыбка может длительно выживать при полной аноксии — от нескольких дней до нескольких недель, в зависимости от состояния организма, времени года и особенно от температуры окружающей среды. Уровень гликогена в печени золотой рыбки, акклимированной к зимним условиям, составляет около 1300 мкмоль глюкозильных единиц на 1 г ткани. Это означает, что рыбка весом 100 г (масса печени около 6 г) содержит в своем центральном депо примерно 7800 мкмоль гликогена (глюкозы). Интенсивность ее метаболизма в покое при 4°C соответствует расходованию около 0,05 мкмоль АТР·г<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>, т. е. 7200 мкмоль в сутки. При таком уровне метаболизма глюкоза, образующаяся из гликогена печени, была бы полностью израсходована в условиях аноксии всего лишь за 2,2 дня. При 5-кратном снижении метаболизма по сравнению с уровнем покоя в аэробных условиях этого запаса при аноксии хватило бы уже примерно на 11 дней. Как показали прямые калориметрические исследования в условиях аноксии, указанные выше величины почти совпадают с фактическими данными об интенсивности метаболизма рыбки и ее устойчивости к аноксии (подробное обсуждение и ссылки на литературу см. Shoubridge, Hochachka, 1981).

Аналогичную стратегию используют и двустворчатые моллюски: для уменьшения потребности в глюкозе при анаэробных условиях у них тоже снижается интенсивность метаболизма.

Наиболее надежные данные были получены в опытах на *Mytilus*. Прямые измерения дыхания (De Zwaan, Wijsman, 1976) показали, что окислительный метаболизм у этого моллюска в аэробных условиях обеспечивает выход примерно 20 мкмоль АТР в день на грамм сырой массы (за вычетом раковины). Максимальное содержание гликогена в мантии и печени составляет около 50% сухой массы, или около 550 мкмоль глюкозильных единиц на 1 г. Можно принять, что при массе тела 2 г эта величина отражает размеры центрального депо гликогена. Если анаэробный метаболизм *Mytilus* по своей энергетической эффективности не отличается от классического гликолиза, то при аноксии для поддержания метаболизма на том же уровне, что и в аэробных условиях, гликогена мантии и печени хватило бы только на три дня. При сбраживании всей глюкозы до сукцината выход АТР мог бы удвоиться, а время выживания при аноксии — возрасти примерно до шести дней. Если бы глюкоза сбраживалась до пропионата, выход АТР увеличился бы в еще большей мере и животное могло бы выдержать 9 дней аноксии. Во всех этих трех ситуациях мы должны были бы наблюдать эффект Пастера, т. е. возрастание потребления глюкозы в первом случае в 12 раз, во втором — в 6 раз и в третьем — в 4 раза. Однако в действительности при переходе *Mytilus* из аэробных условий в анаэробные этого не происходит. Эффект Пастера не наблюдается и у ряда других исследованных моллюсков. Отсутствие этого эффекта можно объяснить лишь заметным снижением интенсивности метаболизма при аноксии. Измерив накопление сукцината и расходование фосфоаргинина и АТР, можно оценить скорость оборота АТР. Оказывается, во время аноксии она снижается до одной двадцатой величины, которую находят при нормальных аэробных условиях (De Zwaan, Wijsman, 1976). Таким образом, даже при обычной эффективности гликолиза запасов гликогена, содержащихся в мантии и гепатопанкреасе, будет достаточно для обеспечения метаболизма в течение примерно 60 дней! Если бы вся глюкоза превращалась при анаэробном метаболизме в сукцинат или пропионат, то животное смогло бы прожить соответственно 120 или 150 дней (при отсутствии иных лимитирующих факторов).

Приведенные расчеты весьма поучительны. Во-первых, из них следует, что организмы, подобные *Mytilus*, благодаря особенностям своего метаболизма в буквальном смысле *свободны в выборе местообитания, их не лимитирует условие постоянства содержания кислорода в окружающей среде*. Во-вторых, эти расчеты позволяют понять, почему в процессе эволюции выработались организмы с разными путями анаэробного метаболизма в различных тканях и органах и почему на разных стадиях аноксии в организме преимущественно накапливаются те или

иные конечные продукты. И, наконец, в-третьих, эти расчеты дают возможность сравнить эффективность двух механизмов, позволяющих уменьшить зависимость анаэробного метаболизма в целом от уровня глюкозы, — общего замедления метаболических процессов и повышения энергетического выхода брожения. Большая эффективность первой стратегии очевидна; *она позволяет продлить время жизни Mytilus при аноксии с 3 до 60 дней, тогда как вторая продлевает его всего лишь до девяти суток.*

Сочетание обоих механизмов настолько эффективно организует потребление резервной глюкозы, что толерантность этих удивительных животных к аноксии вряд ли может лимитироваться недостатком субстрата. Однако продолжительность их жизни при аноксии может определяться накоплением избыточных количеств конечного продукта. Эта проблема настолько серьезна, что способ ее решения в любой системе анаэробного жизнеобеспечения можно считать одной из фундаментальных особенностей данной системы.

## Условие II:

успешное разрешение проблемы  
конечных продуктов

### Сущность проблемы и варианты ее решения

Накопление значительных количеств конечных продуктов обычно приводит к сдвигам рН (наиболее частая ситуация), резким изменениям осмотического давления или нарушениям метаболизма в результате ингибирования тех или иных процессов. Наряду с этим высокая концентрация конечных продуктов может благоприятствовать неконтролируемым побочным реакциям — факт, с которым организмы должны были столкнуться уже на ранних этапах филогенеза. Самая значительная из этих проблем связана с закислением внутренней среды. Мы уделим ей особое внимание, так как сущность ее часто понимают неверно.

### Протон как метаболический интермедиат

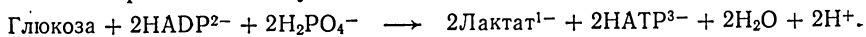
Из главы 2, где говорилось о синтезе АТФ, читателю должно быть ясно, что одним из важнейших промежуточных продуктов клеточного метаболизма является протон. Количество ионов  $H^+$ , участвующих в обычном аэробном обмене, исключительно велико. Простой расчет показывает, что в организме че-

ловека весом 70 кг с основным обменом, соответствующим потреблению около 700 ммоль  $O_2$  в час, образуется примерно 150 г ионов  $H^+$  в день! В основном все эти ионы расходуются в процессах окислительного фосфорилирования, так как скорость образования протонов тесно коррелирует со скоростью их потребления в процессах ресинтеза АТФ и окисления восстановленных компонентов электрон-транспортной системы. Благодаря такому балансу величина рН при аэробном метаболизме остается неизменной (Krebs et al., 1975; Vaghy, 1979).

При анаэробном метаболизме работа этой тщательно сбалансированной системы нарушается. Как же и почему это происходит? На этот вопрос отвечают по-разному. Недоразумение здесь чаще всего, по-видимому, связано с представлением, что при гликолизе образуется молочная кислота — довольно сильная кислота, которая затем диссоциирует на анионы лактата и ионы  $H^+$ . На самом же деле это упрощенное представление ошибочно. Собственно гликолиз приводит к расщеплению глюкозы (или глюкозильных групп гликогена) на два аниона лактата; и одновременно образуется АТФ из АДФ и неорганического фосфата ( $P_i$ ). Очевидно, что сама по себе полная последовательность реакций, приводящих к расщеплению глюкозы, при высоких значениях рН ( $>8,0$ ) не приводит ни к накоплению ионов  $H^+$ , ни к снижению их концентрации:



В этом выражении мы уравнивали коэффициенты в левой и правой частях уравнения и заряды. Лишь при достаточно низких значениях рН ( $<6,0$ ), выходящих за пределы физиологических значений, гликолиз может быть описан уравнением, которое обычно приводится в учебниках:



Оба уравнения отражают очень важные моменты, но в живых системах течение всего процесса существенно усложняется, главным образом под влиянием трех факторов — ионов магния ( $Mg^{2+}$ ), величины рН и природы сбраживаемого субстрата — глюкозы или гликогена (табл. 5-3).

### Влияние $Mg^{2+}$ на стехиометрию образования протонов при гликолизе

Величина рН, концентрация свободных ионов  $Mg^{2+}$  и наличие глюкозы или гликогена — все эти параметры тканеспецифичны, и поэтому нет единого уравнения, которое описывало бы гликолиз в любой ткани, и даже в какой-либо одной ткани при различных условиях. Рассмотрим в качестве примера мыш-

цу позвоночного животного в условиях аноксии. Как показали недавние исследования, концентрация  $Mg^{2+}$  в мышце составляет от 3 до 4,4 мМ, поэтому при физиологических значениях рН практически весь АТФ связан с ионами  $Mg^{2+}$ , а АДФ связан с магнием лишь частично; комплекс  $P_i$  с  $Mg^{2+}$  весьма непрочен, и можно считать, что большая часть  $P_i$  находится в свободном состоянии. Это означает, что форма аденилата, участвующего в гликолизе, определяется концентрацией  $Mg^{2+}$  (табл. 5-3, А и Б). Однако эта концентрация в свою очередь видо- и ткане-

Таблица 5-3

А. Стехиометрия  $H^+$  при анаэробном гликолизе. (Hochachka, Mommsen, 1983)

рН	$H^+$ /моль глюкозы в отсутствие $Mg^{2+}$	$H^+$ /моль глюкозы при 4,4 мМ $Mg^{2+}$
6,8	0,93	1,15
7,4	0,33	0,40
8,0	0,09	0,11

Б. Стехиометрия  $H^+$  при сбраживании гликогена до лактата (брожение идет при концентрации  $Mg^{2+}$ , равной 4,4 мМ)

рН	Образование $H^+$ на моль глюкозы	Потребление $H^+$ на моль глюкозы
6,8	0,72	—
7,4	—	0,40
8,0	—	0,84

специфична (например, в эритроцитах она составляет всего лишь 0,25 мМ), поэтому и суммарное уравнение гликолиза неизбежно будет специфичным для определенных клеток. Величины рК для комплекса  $Mg$  АТФ и свободного АТФ различны, поэтому различным может быть и число молей  $H^+$ , образующихся при сбраживании одного моля глюкозы: при любом данном рН выход ионов  $H^+$  будет тем больше, чем большая доля АТФ образует комплекс с ионами магния (табл. 5-3, А и Б).

#### Стехиометрия образования протонов при гликолизе и гликогенолизе и величина рН

Как уже говорилось, стехиометрия реакций гликолиза должна зависеть от рН. Влияние рН на образование ионов  $H^+$  при гликолизе можно продемонстрировать более ясно, если рассмотреть сбраживание глюкозы в мышце в условиях аноксии, предполагая, что концентрация магния остается постоянной. В этом случае при понижении рН выход  $H^+$  на 1 моль сбраживаемой

глюкозы будет возрастать (табл. 5-3, А). Так же обстоит дело и при сбраживании гликогена, хотя стехиометрия этого процесса иная, поскольку здесь исключен один этап, приводящий к образованию протонов, — гексокиназная реакция. При рН чуть выше нейтрального сбраживание гликогена до лактата (табл. 5-3, Б) сопровождается потреблением, а не образованием ионов  $H^+$  (например, при  $pH > 7,4$  на сбраживание 1 моль глюкозильных групп расходуется 0,3 моль  $H^+$ ). Детальное изучение аланопинового, стромбинового и октопинового путей показало, что по выходу протонов они практически не отличаются от гликолитического пути млекопитающих. Характерной особенностью анаэробного метаболизма двустворчатых моллюсков (в отличие от позвоночных) является способность сбраживать глюкозу до сукцината или пропионата; поэтому интересно будет рассмотреть стехиометрию протонов в соответствующих реакциях.

#### Протонный баланс в реакциях образования сукцината и пропионата

Если мы примем, что сбраживание глюкозы до сукцината или пропионата происходит при тех же, что и в предыдущем случае, постоянных концентрациях свободного  $Mg^{2+}$ , и рассмотрим суммарные уравнения этих процессов, то здесь выявится ряд поразительных особенностей (табл. 5-4, 5-5). Будет видно, например, что реакция пропионатного брожения протекает с потреблением  $H^+$ . При рН, близком к нейтральному, на моль сбраживаемой глюкозы расходуется около одного моля ионов  $H^+$  (табл. 5-5). При более высоких значениях рН (вероятных при понижении температуры тела у эктотермных животных) потребление  $H^+$  в пересчете на моль сбраживаемого субстрата еще больше возрастает. При сбраживании гликогена до

Таблица 5-4. Стехиометрия  $H^+$  при сукцинатном брожении. (Hochachka, Mommson, 1983)

рН	Выделение $H^+$ на 1 моль глюкозы	Потребление $H^+$ на 1 моль глюкозы (или глюкозильных групп)
<i>При сбраживании глюкозы:</i>		
6,8	0,77	
7,4		1,07
8,0		1,75
<i>При сбраживании гликогена:</i>		
7,4		1,87

пропионата тоже потребляются ионы  $H^+$ , причем в значительно больших количествах, чем при сбраживании глюкозы (опять-таки из-за отсутствия гексокиназной реакции в пути сбраживания). «Чистое» образование ионов  $H^+$  в реакции гликоген  $\rightarrow$   $\rightarrow$  пропионат отмечается только при  $pH < 6,5$  (табл. 5-5).

Таблица 5-5. Стехиометрия  $H^+$  при пропионатном брожении.  
(Hochachka, Mommsen, 1983)

pH	Выделение $H^+$ на 1 моль глюкозы	Потребление $H^+$ на 1 моль глюкозы (или глюкозильных групп)
<i>При сбраживании глюкозы:</i>		
6,8		0,55
7,4		2,80
8,0		3,67
<i>При сбраживании гликогена:</i>		
7,4		3,60

Из сказанного очевидно, что процессы брожения вовсе не обязательно приводят к накоплению протонов; при некоторых видах брожения протоны даже потребляются. Почему же тогда накопление конечных продуктов анаэробного обмена и ацидоз так часто сопутствуют друг другу? И где, если не в реакциях брожения, образуются наблюдаемые в этих условиях ионы  $H^+$ ? Можно показать, что их источник — гидролиз АТР.

### Гидролиз АТР и образование ионов $H^+$

В условиях анаэробнозиса АТР, образующийся в процессе брожения, расходуется на совершение клеткой различных видов работы. Гидролизу может подвергнуться любая молекула АТР независимо от способа ее образования — аэробного или анаэробного. В обоих случаях гидролиз АТР приводит к образованию ADP,  $P_i$  и ионов  $H^+$  (табл. 5-6).

Таблица 5-6. Стехиометрия ионов  $H^+$  при гидролизе АТР. (Концентрация  $Mg^{2+}$  принята равной 4,4 мМ, а значения констант диссоциации те же, что в работе Hochachka, Mommsen, 1983)

pH	Высвобождение $H^+$ на 1 моль АТР
6,8	0,425
7,4	0,800
8,0	0,945

Количество ионов  $H^+$ , высвобождаемых при гидролизе АТР, в основном определяется теми же двумя внутриклеточными факторами, о которых уже говорилось в связи с процессами анаэробного гликолиза, — концентрацией  $Mg^{2+}$  и величиной рН. Данные о гидролизе АТР, идущем в мышце млекопитающего

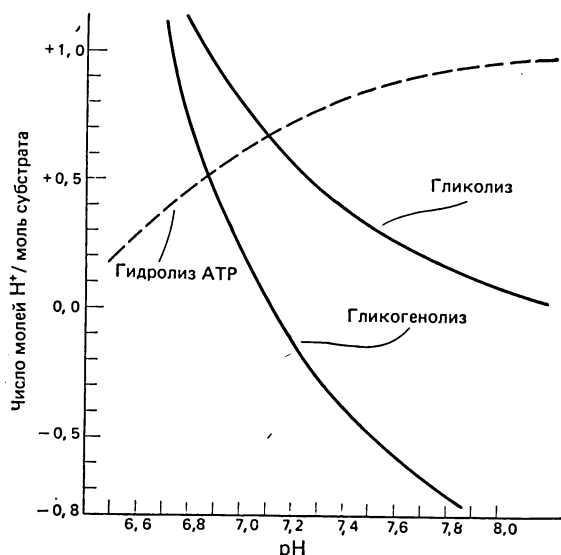


Рис. 5-4. Влияние рН на стехиометрию образования протонов при гидролизе АТР и сбраживании гликогена или глюкозы. Общий вид кривых не зависит от конечного продукта брожения (которым может быть лактат, аланопин, стромбин или октопин). (По уравнениям из работы Hochachka, Mommsen, 1983.)

при постоянной концентрации  $Mg^{2+}$ , выявляют интересную зависимость стехиометрии этой реакции от величины рН (табл. 5-6): *чем ниже рН, тем меньше молей  $H^+$  образуется при гидролизе одного моля АТР*. Таким образом, *повышение рН увеличивает продукцию  $H^+$  при гидролизе АТР и уменьшает ее при гликолизе* (рис. 5-4). Эта закономерность имеет фундаментальное значение для метаболизма в целом, поскольку, как мы уже видели в главе 4, эти два процесса (синтез АТР в ходе гликолиза и гидролиз АТР, катализируемый АТФазой) в условиях *in vivo* в большей или меньшей степени сопряжены между собой, и ни один из них нельзя рассматривать изолированно от другого.



### Каким образом сопряжение процессов брожения с АТРазной реакцией влияет на стехиометрию образования ионов $H^+$ ?

Как мы уже подчеркивали в главе 2, сопряженные реакции образования и использования АТР занимают центральное место и в аэробном, и в анаэробном метаболизме (Atkinson, 1977). Сопряжение этих реакций основано на функции аденилатов, так как АТР является, с одной стороны, одним из продуктов гликолиза или окислительного фосфорилирования, а с другой — главным субстратом для внутриклеточных АТРаз. Однако механизмы этого сопряжения при анаэробном гликолизе и при аэробном метаболизме существенно различны. Во втором случае все продукты гидролиза АТР ( $ADP$ ,  $P_i$  и  $H^+$ ) снова используются клеткой в процессах окислительного фосфорилирования (Vaghy, 1979). При анаэробном же гликолизе для регенерации АТР стехиометрически реутилизируются только  $ADP$  и  $P_i$ ; ионы  $H^+$  в случае сбраживания глюкозы вообще не исполь-

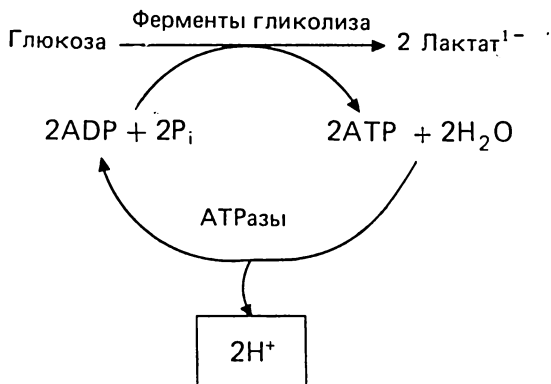
Таблица 5-7. Сопряжение процессов брожения и ферментативного гидролиза АТР. (Hochachka, Mommsen, 1983)

Путь	pH	Число молей $H^+$ на 1 моль глюкозильных групп (А)	Высвобождение $H^+$ (в молях) при гидролизе АТР, образованного в результате брожения (Б)*	А+Б
Глюкоза → лактат	6,8	1,15	0,85 (2)	2,00
(аланолин)	7,4	0,40	1,60 (2)	2,00
(октопин)	8,0	0,11	1,89 (2)	2,00
Гликоген → лактат	6,8	0,72	1,28 (3)	2,00
(аланолин)	7,4	—0,40	2,40 (3)	2,00
(октопин)	8,0	—0,84	2,84 (3)	2,00
Глюкоза → пропионат	7,4	—2,80	4,80 (6)	2,00
Глюкоза → сукцинат	7,4	—1,07	3,20 (4)	2,13

\* В скобках приведены значения, принятые для выхода АТР (в молях) при сбраживании моля глюкозильных групп.

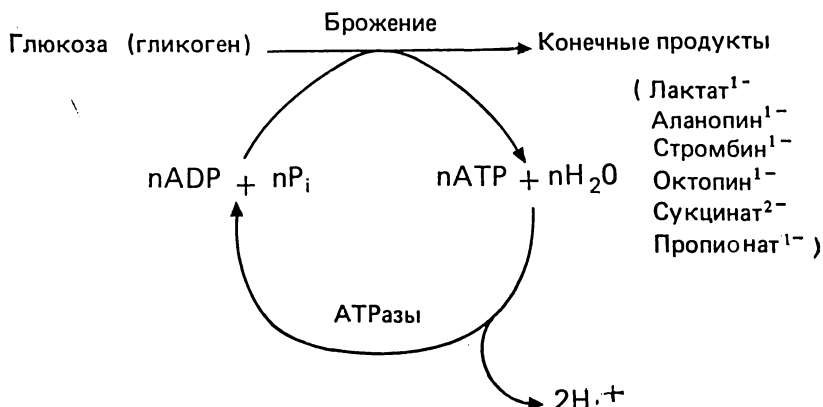
зуются, а сбраживание гликогена (при  $pH > 7,2$ ) сопровождается лишь частичной утилизацией протонов (см. табл. 5-3, Б). Поскольку при гидролизе АТР и при гликолизе выход ионов водорода изменяется под влиянием pH противоположным образом, суммарное количество образовавшихся ионов  $H^+$ , т. е. число молей  $H^+$  на 1 моль сбраживаемой глюкозы (или глюкозильных единиц гликогена) *плюс* число молей  $H^+$ , высвобождаемое в реакции АТРазного гидролиза АТР, синтезированного в процессе брожения, *остается неизменным и равно двум* (табл. 5-7).

Для системы в целом (гликолиз + АТРазная реакция) процесс образования протонов может быть описан единым уравнением, стехиометрия которого уже не зависит от величины рН и концентрации  $Mg^{2+}$ :



При сбраживании гликогена суммарная стехиометрия протонов не изменяется даже в том случае, если само брожение идет с потреблением ионов  $H^+$ : при этом на один моль сбраживаемых глюкозильных групп образуется уже не два, а три моля АТФ, после гидролиза которых в АТРазной реакции общий выход протонов по-прежнему составляет  $2H^+$  на каждую глюкозильную группу (табл. 5-7).

Анализ процессов сбраживания субстратов в тканях разных животных выявляет удивительное постоянство стехиометрии реакций образования протонов. Конечно, если и синтез, и гидролиз АТФ протекают при одних и тех же значениях рН и концентрациях  $Mg^{2+}$ , то естественно, что количество протонов, потребляемое или выделяемое в связи с регенерацией АТФ при



сбраживании глюкозы (гликогена), будет меняться в зависимости от конечного продукта, т. е. от того, будет ли это а) аланопин, стромбин или октопин или же б) сукцинат или пропионат (табл. 5-3, 5-4; 5-5); и все-таки благодаря сопряжению этого процесса с гидролизом АТР, образующегося в результате брожения (табл. 5-7), *выход протонов будет всегда удовлетворительно соответствовать уравнению, приведенному на с. 190 внизу. Теперь понятно, почему у всех животных при длительной аноксии в организме накапливаются ионы  $H^+$  и почему обычно существует корреляция между накоплением конечного продукта и ацидозом.*

### Соотношение между ресинтезом АТР и образованием $H^+$ зависит от типа анаэробного пути

Из-за путаницы в вопросе о подлинном источнике ионов  $H^+$  при анаэробнозе обычно принимают стехиометрию их образования согласно приведенному выше уравнению. Однако лучше было бы характеризовать анаэробный метаболизм соотношением числа молекул АТР и ионов  $H^+$ . Например, при брожении глюкоза  $\rightarrow$  лактат образование и последующий распад 1 мкмоль АТР сопровождаются накоплением 1 мкмоль ионов  $H^+$ , т. е. это соотношение равно 1:1. При сбраживании гликогена оборачивается 1,5 мкмоль АТР на 1 мкмоль аккумулярованного  $H^+$ . Это отношение возрастает до 2:1 при брожении глюкоза  $\rightarrow$  сукцинат и даже до 3:1, когда глюкоза сбраживается до пропионата. Все это важно для понимания механизмов адаптации, так как выявляется принципиальное преимущество метаболизма беспозвоночных, хорошо приспособленных к анаэробным условиям благодаря использованию сукцинатного или пропионатного пути брожения: *при аноксии на 1 моль накопившихся ионов  $H^+$  у таких животных может оборачиваться в три раза больше АТР, чем у млекопитающих, использующих только гликолиз.*

Хотя эти механизмы и дают ощутимую выгоду, они все же не позволяют полностью преодолеть трудности, связанные с постепенным нарастанием ацидоза при аноксии. Изучение метаболизма животных — факультативных анаэробов — выявило еще не менее четырех дополнительных способов борьбы с чрезмерным закислением тканей в условиях аноксии:

1. Самое простое — это свести к минимуму скорость накопления конечного продукта, уменьшив интенсивность метаболизма при аноксии.

2. Другая возможность — повышение толерантности с помощью высокой буферной емкости крови и тканей.

3. Закисление тканей может быть отчасти уменьшено путем «детоксикации» анаэробных конечных продуктов. С этой целью они либо метаболизируются в местах, удаленных от мест их образования, либо выводятся из организма.

4. Проблему можно также решить с помощью метаболических путей, в которых ионы  $H^+$  каким-то образом использовались бы.

Каждую стратегию нужно будет рассмотреть по отдельности, так как у разных организмов часто реализуются разные комбинации этих стратегий.

#### **Уменьшение выхода конечных продуктов за счет снижения потребности тканей в АТФ**

Необходимо ясно осознать, что благодаря сниженному потреблению АТФ в условиях аноксии организм не только расходует меньше глюкозы в малоэффективных реакциях брожения, но и автоматически снижает скорость образования анаэробных конечных продуктов. Оба этих результата взаимосвязаны и выгодны для организма. Фактором, определяющим границы применимости данной стратегии, является время: независимо от общей продолжительности процесса брожения — будь то три дня или три месяца — при распаде 7800 мкмоль глюкозы в организме будет образовываться 15 600 мкмоль лактата. Поэтому такая стратегия эффективна лишь в случае не очень длительной аноксии или в условиях, когда экскреция ионов  $H^+$  может идти независимо от дальнейшего метаболизма лактата, как это, по-видимому, имеет место в мышцах лягушек, крыс и костистых рыб (Benade, Heisler, 1978).

#### **Пути повышения устойчивости к накапливаемым конечным продуктам**

Один из простых способов «справиться» с периодическим накоплением больших количеств анаэробных конечных продуктов (таких, как лактат) и соответственно ионов  $H^+$  состоит в увеличении буферной емкости тканей. У водных черепах, например, это достигается повышением резерва бикарбонатов. К аналогичному способу увеличения буферных свойств прибегают, вероятно, двусторчатые и головоногие моллюски и ракообразные (Baldwin, личное сообщение). Даже у позвоночных интенсивность гликолиза и буферная емкость тканей коррелируют между собой (Castellini, Somero, 1981), так что эта общая стратегия, видимо, широко распространена в различных филогенетических линиях.

Высокая толерантность к накоплению конечного продукта может быть также достигнута путем создания таких ферментов, активность которых либо вообще не зависела бы от pH, либо даже повышалась бы в условиях ацидоза. Вероятно, именно поэтому у «эффективных анаэробов», например у золотой рыбки и черепах, активность такого ключевого фермента, как пируваткиназа (Hochachka, Storey, 1975), максимальна в кислой среде, в то время как оптимум активности гомологичных ферментов у наземных животных сдвинут в область гораздо более высоких значений pH. В связи с этим при переключении метаболизма приспособленных к аноксии видов на путь анаэробного гликолилиза в их тканях создаются благоприятные условия для функционирования пируваткиназы. Еще одним примером может служить лактатдегидрогеназа черепахи — фермент, хорошо работающий даже при высоком уровне лактата в тканях (Hochachka, Storey, 1975).

#### Минимизация накопления лактата за счет его дальнейшего метаболизма

Рассмотренные выше стратегии адаптации к большим количествам лактата основаны на повышении толерантности к его накоплению. Очевидно, что еще более эффективным средством было бы превращение нежелательного конечного продукта в менее вредные для организма метаболиты, т. е. его «детоксикация». Среди позвоночных лучший из известных примеров такого механизма мы находим у золотой рыбки. Подобно большинству позвоночных, при аноксии она сбрасывает гликоген (глюкозу) до лактата. Практически во всех ее тканях активность лактатдегидрогеназы достаточно высока, и можно было бы ожидать накопления большого количества лактата. Однако вот уже двадцать лет исследователей удивляет не то, как много, а, наоборот, как мало лактата накапливается в организме этого животного при длительной аноксии. Проблема была решена лишь недавно, после того как удалось показать, что при аноксии  $^{14}\text{C}$ -лактат, содержащийся в тканях золотой рыбки, частично окисляется, и притом почти в 10 раз быстрее, чем даже  $^{14}\text{C}$ -глюкоза (Shoubridge, Hochachka, 1981). Путь образования  $\text{CO}_2$  при окислении лактата (рис. 5-5) окончательно еще не выяснен, хотя очевидно, что в качестве интермедиата в нем участвует ацетальдегид. Именно этим объясняется то, что в экспериментах с лактатом, меченным по карбоксилу, метка активно включалась в  $^{14}\text{CO}_2$ , тогда как с меткой в метильной группе этого не происходило (Shoubridge, Hochachka, 1981; Van den Thillart, 1982). В скелетных мышцах ацетальдегид восстанавливается до этанола в реакции, катализируемой этанолдегидрогеназой. У золотой рыбки, акклимированной к зимним усло-

виям, содержание этого фермента в белых и красных мышцах обеспечивает образование соответственно 30 и 90 мкмоль продукта на грамм ткани в минуту при 25 °C; однако в экстрактах из других тканей и органов (мозг, сердце, печень) этанолдегидрогеназа не выявляется. Концентрация этанола в организме

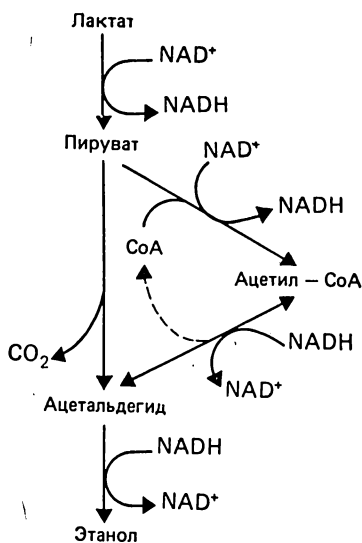


Рис. 5-5. Возможные пути превращения пирувата в этанол в организме золотой рыбки в условиях аноксии. (По Shoubridge, Hochachka, 1981; Van den Thillart, 1982.)

рыбки (в отличие от лактата у других животных при аноксии) не достигает высокого уровня — обычно не более 4 мкмоль/г в тканях (и 4 мкмоль/мл в крови). Низкая концентрация этанола в тканях объясняется тем, что он легко переходит в окружающую воду.

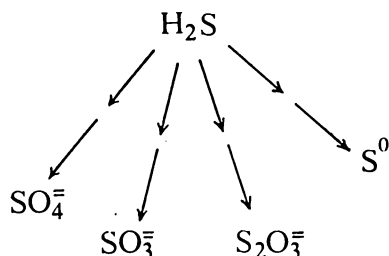
Рассмотренные процессы, протекающие у золотой рыбки в анаэробных условиях, вероятно, свойственны не всем толерантным к аноксии животным. Известно, однако, несколько видов костистых рыб, хорошо приспособленных к гипоксии, у которых Д. К. необычайно высок, а скорость образования CO<sub>2</sub> при гипоксии в 1,5—2 раза выше скорости поглощения O<sub>2</sub>. Метаболическое образование CO<sub>2</sub> наблюдали в условиях аноксии

также и в препаратах изолированных тканей (Shoubridge, Hochachka, 1981). Таким образом, не исключено, что механизмы превращения лактата, сходные с обнаруженными у золотой рыбки, используются и у других животных.

### Детоксикация сероводорода

В некоторых местообитаниях накапливается сероводород (H<sub>2</sub>S) — конечный продукт анаэробного метаболизма бактерий, а возможно, и некоторых животных. Он чрезвычайно токсичен для организмов даже в невысоких концентрациях (Powell et al., 1980). Хотя метаболические системы низших позвоночных менее чувствительны к сероводороду, повседневное воздействие экзогенного или эндогенного H<sub>2</sub>S все же не безвредно для любого организма. Метаболическая стратегия, используемая организмами в случае накопления H<sub>2</sub>S, аналогична стратегии обезврежи-

вания лактата в тканях золотой рыбки [по крайней мере у пяти всесторонне исследованных в настоящее время обитателей серо-сульфидного биота (Powell et al., 1980)]; вредные последствия накопления  $\text{H}_2\text{S}$  сводятся к минимуму благодаря его превращению в менее токсичные соединения:



В природе реализуются все эти четыре пути. Выбор того или иного из них определяется, вероятно, доступностью кислорода (Powell et al., 1980). Как мы увидим позже в главе, посвященной глубоководным организмам, некоторые виды используют эти же метаболические превращения с иной целью ( $\text{H}_2\text{S}$  служит у них источником энергии для фиксации  $\text{CO}_2$ ), а некоторые обладают дополнительными средствами защиты от токсического действия  $\text{H}_2\text{S}$ .

### Реакции, в которых потребляются ионы $\text{H}^+$

Оценивая эффективность реакций, идущих с потреблением ионов  $\text{H}^+$ , как средства для предотвращения ацидоза, нужно иметь в виду, что уровень ацидоза зависит от способа сопряжения анаэробного пути образования АТФ с реакциями его расщепления АТРазами. Теоретически возможны две крайние ситуации. В первой из них — при очень тесном сопряжении обоих процессов — уровень ацидоза в периоды длительной аноксии не зависит от используемого пути брожения: при любом из них образуется 2 моль  $\text{H}^+$  на 1 моль глюкозильных групп. В другом крайнем случае сопряжение между брожением и ферментативным гидролизом АТФ отсутствует. Поскольку эти процессы разделены в пространстве (и осуществляются с помощью различных ферментативных путей), *они могут протекать независимо и во времени*. Вследствие этого при совершении работы в анаэробных условиях (например, в аноксичной мышце) весь имеющийся в клетке АТФ может израсходоваться раньше, чем активируется гликолиз. Однако в действительности, как правило, ни та, ни другая ситуация в чистом виде не реализуется: процессы активации брожения и гидролиза АТФ довольно хорошо согласованы между собой, и поэтому переход в режим более интен-

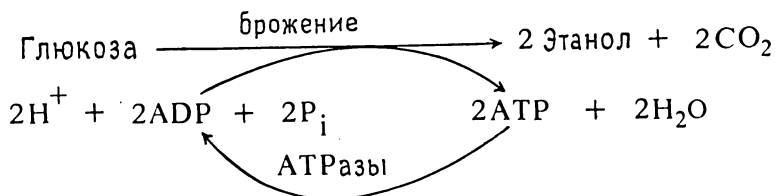




существуют. Одна из таких систем, свойственная многим микроорганизмам и некоторым животным, сбраживает глюкозу в этанол, а другая — глюкозу в бутанол (этот путь встречается у некоторых микроорганизмов).

### Баланс ионов $H^+$ при спиртовом брожении

В литературе отмечалось (Hochachka, Mommsen, 1983), что при сопряжении спиртового брожения с ферментативным гидролизом АТФ в клетке не происходит ни накопления, ни поглощения протонов:



Но если в этих условиях  $CO_2$  гидратируется, то на каждый моль сбраживаемой глюкозы фактически образуется два моля  $H^+$ , т. е., по существу, сводится на нет преимущество данной системы. Вот почему при этой стратегии необходим также способ удаления  $CO_2$ . У золотой рыбки, например, при аноксии  $CO_2$  выводится через жабры (для водных животных окружающая среда всегда служит огромным резервуаром, поглощающим  $CO_2$ ). Аналогичным образом выводится  $CO_2$  из организма личинок *Chironomus* и различных эндопаразитов, у которых при ограниченном доступе  $O_2$  образуется этанол.

Путь сбраживания глюкозы до бутанола у микроорганизмов активируется только при кислых значениях рН, неблагоприятных для гидратации  $CO_2$ . В этих условиях  $CO_2$  (наряду с  $H_2$ ) тоже может выводиться в окружающую среду.

За преимущества рассмотренных видов брожения организму приходится расплачиваться тем, что в окружающую среду уходит источник углерода (конечный продукт), который можно было бы использовать в окислительном метаболизме после возвращения к аэробизму. Тем не менее в природе возникли пути брожения с потреблением протонов, выделяемых при гидролизе АТФ.

Как это ни парадоксально, такие виды брожения редко встречаются у животных, хорошо приспособленных к анаэробным условиям. Эта стратегия адаптации к аноксии известна пока только у золотой рыбки и некоторых беспозвоночных. Почему же она не получила более широкого распространения? Одна из гипотез (которая нуждается в тщательной проверке)

объясняет это тем, что у большинства животных имеются пока еще не изученные механизмы, действующие при недостатке кислорода. Четыре возможных механизма рассмотрены в другой работе (Hochachka, Mommsen, 1983). В нашем контексте наибольший интерес представляет ускоренное выведение конечных продуктов из аноксичных тканей в кровь и их последующее превращение в глюкозу. Значение этих процессов особенно велико при переходе от аноксии к нормальным условиям.

### Условие III:

#### восстановление метаболического гомеостаза

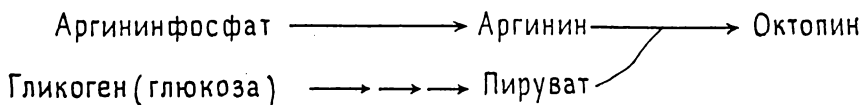
#### Существо проблемы

Третий важный момент, который должен быть предусмотрен в организации метаболизма факультативных анаэробов, состоит в том, что по окончании периода аноксии должен восстанавливаться метаболический гомеостаз. Это предполагает решение двух связанных между собой задач: 1) необходимо избавиться от лактата или иных конечных продуктов, образовавшихся в период аноксии, и 2) нужно «подзарядить» центральные и периферические депо гликогена. Рассмотрим каждую из этих задач в отдельности.

#### Освобождение от анаэробных конечных продуктов у беспозвоночных

Проблема восстановления метаболического гомеостаза после периода аноксии у беспозвоночных разработана довольно слабо. В тех случаях, когда конечные продукты (например, этанол, ацетат или пропионат) выходят в окружающую среду, эта проблема решается «сама собой». Избавиться от таких продуктов, как сукцинат и аланин, тоже достаточно просто, так как эти вещества включены в главные пути окислительного метаболизма. Например, у головоногих моллюсков в условиях *in vivo* аланин интенсивно окисляется. Таким образом, реальная проблема возникает лишь тогда, когда организму нужно освободиться от «настоящих» конечных продуктов гликолиза, таких как лактат, аланопин, стромбин, лизопин и октопин. Лучшее всего изучен механизм выведения октопина (о других веществах данных практически нет).

У головоногих моллюсков октопин образуется главным образом при интенсивном сокращении мышц мантии в условиях гипоксии (Storey, Storey, 1983) в результате следующих превращений:



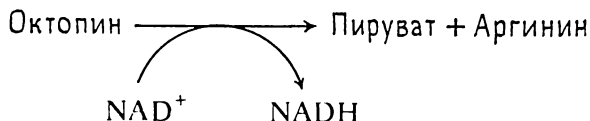
Здесь существенны (по крайней мере в тех случаях, когда гипоксия сочетается со значительной мышечной нагрузкой) временные отношения событий, так как накоплению аргинина предшествует отчетливо выявляемый период накопления октопина. Судя по имеющимся данным, можно даже предположить, что аргинин должен накапливаться в больших количествах, чем октопин; однако этот вывод не вполне достоверен, поскольку аргининфосфат — очень нестабильное соединение, и данные о его содержании в тканях в большинстве случаев, вероятно, занижены, а о содержании аргинина — завышены (см. Noshachka et al., 1983). Таким образом, вопрос оказывается сложнее, чем предполагалось: предметом обсуждения должен стать не только метаболизм октопина, но и превращения аргинина, так как эти процессы тесно связаны между собой.

Уровень аргинина в крови всегда низок (он измеряется микромолями) и, по-видимому, не изменяется и при переходе к аэробнозу. Иными словами, большая часть аргинина метаболизируется *in situ*. Очевидно, это происходит в основном путем обратного превращения аргинина в аргининфосфат. А что можно сказать о судьбе октопина?

Большая часть октопина, по-видимому, тоже метаболизируется *in situ* (в отличие от лактата, который у позвоночных может быть обнаружен не только в месте своего образования, но и в других тканях — см. гл. 4 и 6). Показано, например, что в организме *Sepia* не более одной шестой суммарного количества октопина и аргинина, исходно содержавшихся в мышце, переходит в другие ткани (см. Storey, Storey, 1983). Благодаря такому распределению октопина его концентрация в крови после окончания периода аноксии хотя и возрастает примерно в восемь раз, но по абсолютной величине остается невысокой, что указывает на быстроту его переноса и превращений в других (немышечных) тканях. Эксперименты с  $^{14}\text{C}$ -октопином показали, что к числу таких тканей и органов относятся сердечная мышца, мозг, почки и жабры.

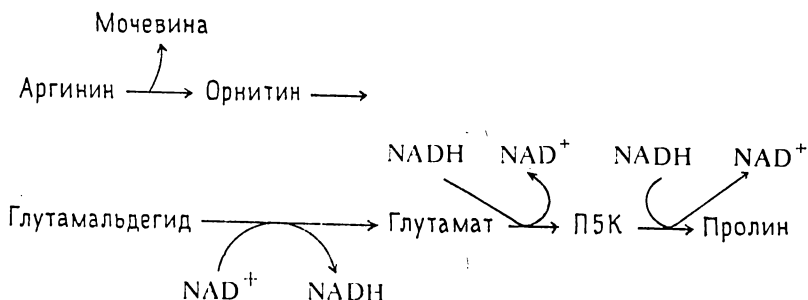
### Видоизмененный цикл Кори у головоногих моллюсков

Ни у одного из исследованных животных судьба октопина в различных тканях не была прослежена с достаточной полнотой, но основные пути его превращения уже раскрыты. Полученные данные указывают на функционирование видоизмененного цикла Кори. Сначала происходит обратная октопиндегидрогеназная реакция; в почках (и, возможно, в других тканях) протекает следующий процесс:



Пируват может частично окисляться, а частично превращаться в глюкозу и поступать обратно в мышцы. Таким образом, создается циклический процесс, который у позвоночных называют циклом Кори.

Метаболизм аргинина в некоторых случаях гораздо более сложен. Один из возможных путей состоит в его расщеплении аргиназой до орнитина и мочевины, причем орнитин в конце концов превращается в глутамат или пролин:



Как пролин, так и глутамат могут затем вернуться в мышцу. Глутамат может поступать в цикл Кребса и подвергаться полному окислению. Вместо этого углеродные скелеты, образовавшиеся в цикле Кребса из аргинина, могут переходить в большой и разнообразный пул свободных аминокислот, содержащихся в тканях моллюска. По-видимому, первый из этих путей имеет более важное значение (Hochachka, Fields, 1983).

Процесс превращения углеродных скелетов в глутамат или пролин интересен тем, что служит связующим звеном между аргинином (который, будучи фосфагеном и субстратом октопиндегидрогеназы, занимает центральное место в анаэробном метаболизме) и пролином (используемым после активации окисли-

тельного метаболизма). Это означает, что все три вещества — аргинин, глутамат и пролин — могут превращаться друг в друга (Hochachka, Fields, 1983) и что у головоногих моллюсков возможен процесс, в целом аналогичный циклу Кори позвоночных (Storey, Storey, 1983).

### Освобождение от лактата у позвоночных

У позвоночных восстановление метаболического гомеостаза после аноксии, как и у беспозвоночных, сопряжено с двумя задачами — освобождением от лактата и «перезарядкой» гликогенных депо. Вся эта проблема исследовалась довольно интенсивно, поэтому мы начнем с простого перечисления процессов, которые в общем итоге приводят к восстановлению ситуации, существовавшей до аноксии:

- 1) окисление лактата *in situ* в местах его образования;
- 2) обратное превращение *in situ* лактата в гликоген;
- 3) выведение лактата в кровь и перенос его в различные ткани к местам последующего окисления;
- 4) выведение лактата в кровь и перенос его в печень и почки, где он превращается в гликоген;
- 5) превращение лактата (через пируват) в аланин и последующий метаболизм аланина как одного из компонентов аминокислотного пула.

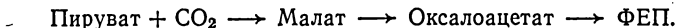
Показано, что у позвоночных в той или иной мере осуществляются все перечисленные процессы, и усилия исследователей в последние годы были в основном направлены на выяснение относительной роли каждого из них. Убедительные данные по этому вопросу получены при изучении млекопитающих (в частности, крысы). В опытах с перфузией задней конечности крысы было установлено, что 7% лактата окисляется *in situ*, около 45% превращается обратно в гликоген в мышцах и примерно 20% поступает в цикл Кори. Механизм, регулирующий распределение лактата между этими процессами, выяснен лишь недавно, и поэтому его следует рассмотреть более обстоятельно.

### Перезарядка периферических и центральных депо гликогена

Основную массу тела у позвоночных составляет мышечная ткань — она и становится в случае аноксии главным источником лактата. При выходе же из этого состояния около 7% лактата окисляется непосредственно *in situ* (McLane, Holloszy, 1979). Выявить обратное превращение лактата в гликоген довольно трудно, так же как и определить активность ферментов глюконеогенеза в мышце. Поэтому еще пятнадцать лет назад был сделан вывод, что в мышце обратное превращение лактата

в глюкозу (или гликоген) невозможно и что этот процесс происходит только в печени и почках. Такое представление, конечно, хорошо согласуется с данными о высокой способности последних двух органов к глюконеогенезу. По своему конечному результату глюконеогенез представляет собой обращенный гликолиз, однако эти процессы различаются в деталях, так как некоторые реакции гликолиза в физиологических условиях практически необратимы. Таким образом, отмечая высокую способность печени и почек к глюконеогенезу, мы тем самым имеем в виду, что эти органы содержат специфические ферменты, позволяющие «обойти» односторонние этапы гликолиза. Обычно упоминают четыре таких фермента: пируваткарбоксилазу, ФЕП-карбоксикиназу (в обход пируваткиназной реакции), фруктозобисфосфатазу (в обход фосфофруктокиназной реакции) и глюкозо-6-фосфатазу (катализирующую образование свободной глюкозы в обход гексокиназной реакции). Для синтеза гликогена последний фермент, конечно, не нужен, однако в этом процессе участвуют два других фермента, которые действуют в обход гликогенфосфорилазы: UDP-глюкозофосфорилаза и гликогенсинтаза.

Рассмотренная схема знакома большинству из нас по обычным учебникам биохимии. В соответствии с ней периферические (мышечные) депо гликогена «перезаряжаются» главным образом благодаря образованию глюкозы в печени и почках. Однако уже в первые два года после того, как стали отрицать возможность ресинтеза гликогена из лактата *in situ*, было обнаружено присутствие в мышцах позвоночных ФЕП-карбоксикиназы и яблочного фермента, т. е. ферментов, которые вместе с малатдегидрогеназой катализируют реакции еще одного пути, идущего в обход пируваткиназной реакции:



Ньюсхолм и его сотрудники обнаружили в мышце лягушки и в смешанных мышцах млекопитающих фруктозобисфосфатазу, присутствие которой тоже указывает на способность ткани к синтезу гликогена. Эти данные стимулировали дальнейшее изучение аэробного метаболизма в портняжной мышце лягушки, и здесь было выявлено довольно быстрое превращение лактата в гликоген. Позднее появился ряд других работ (см. McLane, Holloszy, 1979), ясно показавших, что большая часть лактата, образующегося при анаэробном гликолизе в «быстрых» белых и красных мышцах, может снова превращаться в гликоген *in situ*. В «медленных» же красных волокнах млекопитающих (и сердечной мышце) этого не происходит, главным образом потому, что в них нет ключевых ферментов глюконеогенеза, в частности фруктозобисфосфатазы. Как показали недавние исследо-

вания, у рыб значительная часть лактата не переходит из белой мускулатуры в кровь, и есть основание предполагать, что он и здесь может превращаться в гликоген *in situ* — необходимые для этого ферменты имеются (Gurru et al., 1979).

Но даже если значительная часть мышечного лактата превращается *in situ* в гликоген, все же заметная его доля (более 20%) вымывается из мышц кровью и переносится в различные ткани, где затем метаболизируется. В связи с этим можно оценить физиологическое значение накопления ионов  $H^+$  при аноксии. На протяжении десятилетий бытовало представление о том, что лактат переходит из одного компартмента организма в другой путем простой диффузии. Лишь недавно стало ясно, что в транспорте лактата обычно участвуют переносчики. В почках перенос лактата, по-видимому, связан с транспортом  $Na^+$ . Во всех других исследованных клетках и тканях (в ряде линий опухолевых клеток, эритроцитах, печени и сердечной мышце) молекулы переносчика перемещаются в направлении, противоположном движению лактата, причем анионы лактата обмениваются на ионы  $OH^-$  (в связи с чем система весьма чувствительна к изменениям pH). Таким образом, закисление тканей при аноксии должно способствовать выведению из них лактата при восстановлении нормального снабжения их кислородом. Закисление же крови в свою очередь будет благоприятствовать поглощению лактата печенью и его последующему метаболизму (ссылки на литературу см. Hochachka, Mommsen, 1983). Уже много лет известно, что важное место в обмене лактата занимает обратное превращение его в гликоген и глюкозу в печени; в дальнейшем глюкоза из этого центрального депо может использоваться для пополнения периферических депо гликогена.

Однако лактат служит не только предшественником глюкозы, но и превосходным субстратом в реакциях окисления, протекающих в различных органах и тканях позвоночных. Поэтому второй важный путь метаболизма лактата при возвращении к аэробизму состоит в полном окислении этого вещества. Если концентрация лактата в крови повышена, он может использоваться в скелетных мышцах, легких, сердце и даже в ткани головного мозга как источник углерода и энергии, нередко предпочтительно перед глюкозой. Таким образом, эти органы завершают «очистку» организма от лактата при выходе из аноксии.

### Системы жизнеобеспечения при аноксии: резюме

В этой главе мы рассматривали организмы, находящиеся в условиях аноксии, как своеобразные автономные системы. В таких условиях основным источником углерода и энергии у всех видов животных служит гликоген; обычно он запасается

на случай аноксического стресса в центральных депо. Для увеличения энергетического выхода наряду со сбраживанием глюкозы используются и другие источники углерода; к наиболее важным из них относятся свободные аминокислоты (особенно аспартат и аминокислоты с разветвленной цепью). Снабжение организма энергией в анаэробных условиях сопряжено с двумя трудностями: это, во-первых, низкая эффективность анаэробного метаболизма (измеряемая в молях образующегося АТР на моль мобилизуемого субстрата) и, во-вторых, то, что сопряжение большинства видов брожения с функцией клеточных АТР приводит к накоплению ионов  $H^+$  и других конечных продуктов. Поэтому «конструкция» анаэробной системы жизнеобеспечения должна разрешать две главные задачи — обеспечить 1) запасаание достаточных количеств гликогена (глюкозы) и 2) освобождение организма от потенциально вредных для него конечных продуктов. Чтобы свести к минимуму вероятность полного истощения центральных углеводных депо, обычно применяются следующие стратегии: 1) распределение больших количеств гликогена по периферическим депо; 2) использование более эффективных видов брожения и 3) снижение интенсивности метаболизма при аноксии. Решение проблемы конечных продуктов обычно достигается следующим образом: 1) предпочтение отдается тем видам брожения, которые позволяют регенерировать на 1 моль аккумулированных ионов  $H^+$  больше молей АТР, чем при классическом гликолизе; 2) повышается буферная емкость тканей, что увеличивает их устойчивость к накоплению протонов; 3) сводится к минимуму накопление конечного продукта (он включается в метаболизм или экскретируется); 4) используются процессы, идущие с потреблением ионов  $H^+$ ; 5) при аноксии происходит общее замедление метаболических процессов. Все эти механизмы дополняют друг друга, но наиболее эффективным средством защиты тканей от аноксии служит общее снижение метаболизма. Вероятно, именно поэтому все животные — факультативные анаэробы (такие, как двусторчатые моллюски или золотая рыбка) — способны резко притормаживать свои метаболические процессы в периоды аноксии. Таким образом, метаболические системы жизнеобеспечения, эффективно работающие в условиях недостатка или полного отсутствия  $O_2$ , способны к переключению на более низкий уровень функционирования. Сам факт такого переключения проявляется в отсутствии эффекта Пастера (или даже в его обращении), но механизм переключения пока не вполне понятен.

И наконец, одно из важнейших свойств анаэробов — их способность эффективно восстанавливать метаболический гомеостаз при выходе из аноксии. К сожалению, беспозвоночные анаэробы в этом отношении очень мало изучены; это область, ожи-



дающая своих исследователей. С позвоночными дело обстоит несколько лучше. Два аспекта проблемы — освобождение от лактата и регенерация запасов глюкозы — явно связаны между собой. Накопленный во время аноксии лактат после возвращения к аэробизму может быть 1) превращен обратно в гликоген в местах своего образования или 2) выведен в кровь и метаболизирован в других тканях. В печени и почках лактат в основном используется в процессе глюконеогенеза; в большинстве других тканей и органов, включая мозг, сердце и легкие, лактат служит превосходным субстратом для окислительного метаболизма и нередко утилизируется даже прежде глюкозы, что способствует скорейшему восстановлению метаболического гомеостаза.

### Дополнение

Недавно были описаны совершенно новые виды адаптации, способствующие выживанию некоторых наземных лягушек в условиях замерзания. Лактат в этом случае накапливается как конечный продукт анаэробного метаболизма, а глюкоза выполняет функции криопротектора (см.: Storey K. B., Storey J. M., *Experientia* [1984], в печати).

# Метаболические адаптации к нырянию

## Проблемы и стратегии

Одним из наиболее ярких примеров самоподдерживающихся систем жизнеобеспечения может служить метаболизм водных ныряющих позвоночных, будь то двоякодышащие рыбы озер Восточной Африки, амазонская арапаима, бакланы американских озер, тюлени, дельфины или киты в море. Подобно всем живым системам, обсуждавшимся в главе 5, ныряющие животные должны «иметь на борту» все материалы, необходимые при задержке дыхания, и механизмы их регулируемого использования, чтобы были обеспечены все потребности организма. Все вредные продукты обмена, образующиеся при задержке дыхания, должны временно накапливаться, включаться в обмен веществ, обезвреживаться или выводиться из организма так, чтобы они как можно меньше сокращали время пребывания под водой и меньше влияли на активность животного. После выхода на поверхность эти механизмы должны возвращать животное в исходное состояние. Все эти требования уже встречались нам при рассмотрении особенностей метаболизма в системах жизнеобеспечения, приспособленных к условиям полной аноксии. Эти системы вполне пригодны и для использования ныряющими животными в тех крайних ситуациях, когда все ткани и органы полностью лишены кислорода (например, при длительном пребывании под водой морских черепах). Однако у большинства ныряющих животных кислород в тканях и органах расходуется не полностью; время пребывания под водой и уровень активности регулируются таким образом, чтобы истощение запасов  $O_2$  и субстратов не приводило к экстремальному состоянию. Цель этой главы состоит в том, чтобы выяснить, как выполняются сформулированные выше требования к метаболизму у водных позвоночных при нырянии и возвращении на поверхность.

Адаптации ферментного аппарата клеток и тканей низших животных, сталкивающихся с недостатком кислорода, в общих чертах хорошо известны (De Zwann, 1983). С самого начала важно подчеркнуть, что они не входят в арсенал приспособительных стратегий, используемых ныряющими позвоночными:

из имеющихся данных следует, что нет какой-либо простой связи между организацией метаболизма и активностью ферментов, с одной стороны, и способностью к длительному пребыванию под водой — с другой. В тех случаях, когда такие особенности выявляются, они, как сейчас принято считать, связаны не с самим нырянием, а с другими признаками, такими как общая активность, способ локомоции в воде, скорость передвижения, предпочитаемая пища и т. п. Таким образом, ныряющие животные отличаются от неныряющих не какими-то качественными чертами организации ферментного аппарата, а способами его использования (Castellini et al., 1981). Каковы же эти способы?

### Черепахи и двоякодышащие рыбы в условиях гипоксии расходуют гликоген печени

Рассмотрим сначала низших позвоночных на примере двух хорошо изученных групп — водных черепах и двоякодышащих рыб. У тех и других длительное пребывание под водой в условиях сильной гипоксии или аноксии приводит к активной мобилизации больших запасов гликогена в печени. При расходовании этого гликогена концентрация глюкозы в крови возрастает, но при этом различие ее концентраций в крови и в печени остается благоприятным для перехода глюкозы в кровь (рис. 6-1). Интересно, что у обеих групп животных существует механизм, гарантирующий надежность системы в целом; даже при максимальной длительности пребывания под водой центральные запасы гликогена не истощаются полностью. Таким образом, организму удастся избежать расходования больших количеств глюкозы в энергетически неэффективных процессах брожения. Существуют по меньшей мере три механизма сохранения углеводных резервов печени — те самые, которые мы уже обсуждали при рассмотрении животных-анаэробов:

- 1) животное расходует запасы гликогена, накопленные в других тканях;
- 2) оно использует более эффективные пути брожения;
- 3) оно снижает интенсивность метаболизма и соответственно потребность в субстрате и кислороде.

Первый механизм особенно хорошо представлен у водных черепах. Например, концентрация гликогена в сердце у черепах выше, чем у каких-либо других исследованных позвоночных, и составляет около 250 мкмоль/г. В сердце африканских двоякодышащих рыб она тоже высока (Dunn et al., 1983). Кроме того, гликоген запасается в форме крупных альфа-частиц диаметром 1000 Å, а у двоякодышащих рыб даже в форме включающих гликоген мембранных комплексов, называемых «гликогеновыми тельцами». Определение концентрации гликогена в мозгу

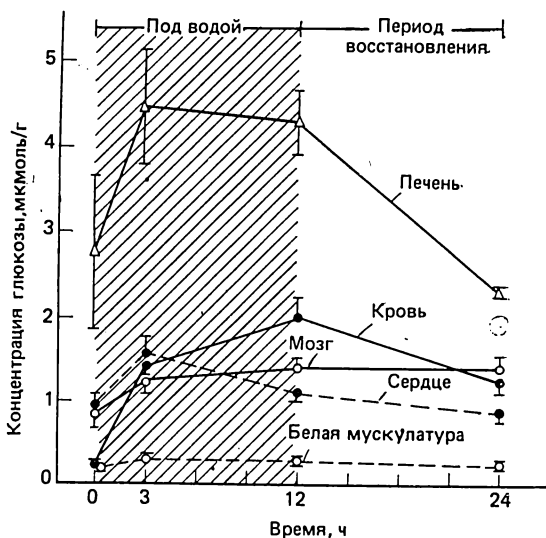
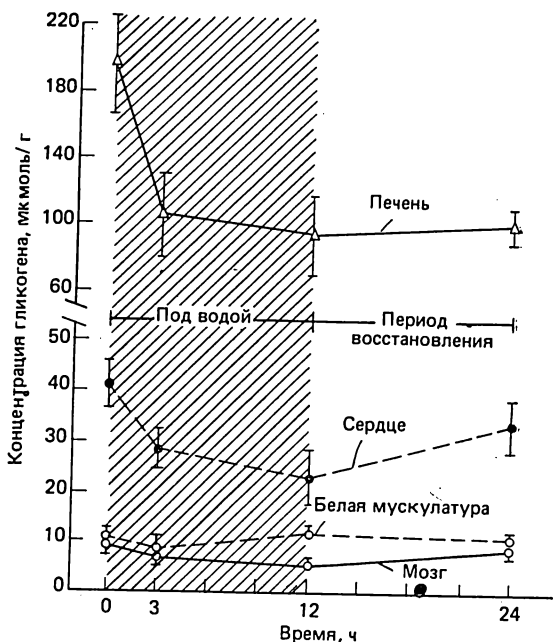


Рис. 6-1. *Вверху*: изменения концентрации гликогена в тканях (в микромолях глюкозильных остатков на 1 г сухого веса ткани) у африканской двоякодышащей рыбы во время 12-часового пребывания под водой и после выхода на поверхность.

*Внизу*: изменения концентрации глюкозы в крови и тканях в тех же условиях. (По Dunn et al., 1983.)

черепях показывает, что она почти на порядок выше, чем у родственных ныряющих животных (ссылки на литературу см. Hochachka, 1982).

Однако, даже если такие запасы полезны, содержащийся в сердце гликоген должен был бы в основном расходоваться за несколько часов гипоксии, тогда как в природных условиях такое состояние растягивается на многие недели, а может быть, и месяцы. Запасы гликогена в мозгу черепях примерно вдесятеро меньше и должны истощаться еще быстрее. Поэтому простого расходования нецентрализованных запасов гликогена недостаточно.

Факультативно-анаэробные беспозвоночные, сталкиваясь с этой проблемой, снижают потребность в углеводах печени путем использования энергетически более эффективных брожений. То же самое в некоторой степени происходит и у позвоночных (например, в гипоксичных тканях у позвоночных вообще, а особенно у черепях, накапливается сукцинат). Однако альтернативные пути брожения довольно мало используются позвоночными животными, и считается, что их вклад в анаэробный энергетический бюджет количественно невелик (обсуждение других возможных функций этих процессов в метаболизме анаэробных животных можно найти в работах Hochachka, 1980; Hochachka, Murphy, 1979). Они не могут свести к минимуму потребность анаэробных животных в глюкозе. Таким образом, чтобы увеличить время пребывания под водой, черепахам и двоякодышащим рыбам остается лишь одно: *они могут уменьшать потребность в глюкозе, снижая интенсивность метаболизма, а тем самым и потребность в АТФ со стороны аноксичных плохо перфузируемых тканей.* По количественным результатам этот выход из положения оказывается гораздо более важным. У двоякодышащих рыб снижение метаболизма затрагивает главным образом мышцы (Dunn et al., 1983), но у черепях оно носит более общий характер.

### Снижение интенсивности метаболизма у черепях под водой

На этот счет существуют три группы экспериментальных данных; а) результаты прямой калориметрии во время пребывания под водой, б) косвенные данные, основанные на анализе кислородной задолженности, и в) оценки интенсивности метаболизма на изолированных препаратах сердца и мозга. Прямые калориметрические измерения на находящихся под водой черепахах, впервые осуществленные более десяти лет назад, убедительно показали, что общая интенсивность метаболизма в этих условиях падает примерно до 15% исходной величины. Эти первые наблюдения были позднее подтверждены анализом кисло-

родной задолженности. Если бы уровень метаболизма под водой оставался неизменным, то дефицит кислорода в ткани после выхода на поверхность легко было бы подсчитать, зная этот уровень и продолжительность пребывания в воде. В действительности же эксперименты показывают, что дефицит примерно в 6 раз меньше ожидавшегося; значит, интенсивность обмена под водой составляет лишь около одной шестой от нормы, и это хорошо согласуется с данными калориметрии (Caligiuri et al., 1981).

Исследования на изолированных препаратах сердечной и мозговой ткани показали, что интенсивность метаболизма здесь крайне низка по сравнению с метаболизмом тех же органов других млекопитающих, и это тоже в общем соответствует данным, полученным в физиологических экспериментах на целых животных. Хорошим примером могут служить результаты экспериментов на мозговой ткани черепахи. На изолированных препаратах можно показать, что интенсивность метаболизма (измеряемая в микромолях АТФ на грамм ткани в минуту) при 37 °С в мозгу черепахи примерно вдесятеро меньше, чем в мозгу мыши; однако если сравнивать уровни метаболизма при 37 °С у мыши (нормальная температура) и при 4 °С у черепахи (нормальная температура при нырянии), то окажется, что для мыши будет получена величина в 250 раз больше! Это означает, что интенсивность метаболизма мозговой ткани у черепахи вообще низка, но особенно низка во время пребывания под водой, когда температура мозга падает до температуры придонных слоев воды в озере. Столь же важен еще один факт: хотя при отсутствии кислорода электрон-транспортная система в мозгу, как и следовало ожидать, полностью выключается (Lutz et al., 1980), никакого эффекта Пастера на препаратах *in vitro* обнаружить не удастся. Отсутствие эффекта Пастера по определению означает, что при аноксии метаболизм мозга снижается примерно на порядок.

Такого рода исследования ясно показывают, что понижение метаболизма — удачный способ продления времени пребывания под водой у черепах. Однако до каких пределов может быть таким способом продлено это время?

### **Снижение интенсивности метаболизма очень сильно увеличивает время задержки дыхания у черепах**

Приблизительный ответ на поставленный выше вопрос легко получить несложными расчетами. У черепах концентрация гликогена в печени в нормальном (надводном) состоянии составляет около 880 мкмоль/г (Hodhachka, 1982). У стограммовой черепахи (не считая панциря) печень весит примерно 8,6 г и, следовательно, содержит около 7600 мкмоль гликогена (глюко-

зы). Интенсивность метаболизма в покое у черепах при температуре  $3^{\circ}\text{C}$  и парциальном давлении кислорода около 70 мм рт. ст. равна примерно  $0,036 \text{ мкмоль АТР} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ; принимая значение  $Q_{10}$  для дыхательного метаболизма равным двум, получаем суммарную интенсивность обмена стограммовой черепахи, равную 5180 мкмоль АТР в сутки. При таком уровне метаболизма запасов гликогена в печени черепахи должно хватить на 2,9 суток бескислородного существования. Запасы гликогена в других органах могут немного увеличить этот срок, однако в сердце, например, запасы гликогена в основном истощаются за несколько часов аноксии. При сравнительно недолгом пребывании под водой (несколько часов) и температуре  $24^{\circ}\text{C}$  интенсивность обмена составляет примерно 15% исходной величины. Если эти результаты экстраполировать на температуру  $3^{\circ}\text{C}$ , то получается, что продолжительность задержки дыхания у черепахи может увеличиться в шесть-семь раз, т. е. достичь примерно 19 дней. Но и этого еще недостаточно.

В северных частях ареала, например в провинции Онтарио (Канада), пресноводные черепахи многих видов проводят 5—6 зимних месяцев (с октября по март) на дне маленьких озер и прудов. В частности, известно, что каймановые черепахи осенью зарываются почти целиком в ил и остаются там иногда на весь период зимовки. Такие наблюдения побудили Ултша и Джексона (Ultsch, Jackson, 1982) поставить эксперимент по содержанию черепах в лишенной кислорода воде при температуре  $3^{\circ}\text{C}$ . Эксперимент продолжался шесть месяцев! Непохоже, чтобы при этом у черепах усиливался анаэробный гликолиз за счет сбраживания аминокислот, так как после погружения на три-четыре недели соотношение и содержание свободных аминокислот не изменяется и не происходит сколько-нибудь значительного накопления ни сукцината, ни аланина — двух конечных продуктов анаэробного метаболизма (В. Emmett, личное сообщение). Значит, поразительная продолжительность задержки дыхания у пресноводных черепах, по-видимому, невозможна без сильного понижения основного метаболизма приблизительно до  $1/60$  нормальной интенсивности, составляющей  $0,036 \text{ мкмоль АТР} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Та же самая оценка получается, если исходить из накопления молочной кислоты при длительной задержке дыхания (Ultsch, Jackson, 1982; Hochachka, 1982), и это тоже подкрепляет предположение, что под водой в организме черепах используется главным образом анаэробный гликолиз.

Менее драматичная, но похожая картина возникает в исследованиях, симулирующих длительное погружение с задержкой дыхания у африканских двоякодышащих рыб (Dunn et al., 1983). У этих и других животных, способных долго обходиться без дыхания, наиболее эффективным средством удлинения жиз-

ни в условиях аноксии служит понижение оборота АТФ. Пресноводные черепахи так хорошо приспособлены к длительному существованию в условиях нехватки кислорода, что возникает вопрос: не стоят ли они особняком среди других животных, способных к продолжительной задержке дыхания? Черепахи, кроме всего прочего, холоднокровные животные, и механизмы, благодаря которым они способны так долго находиться под водой, могут быть совершенно отличны от используемых млекопитающими и птицами. Кроме того, можно считать, что погружение обычно дышащих воздухом пресноводных черепах на дно водоемов для зимовки — это, по сути дела, не «ныряние», а зимняя спячка. Хотя такая способность — в любом случае поразительное достижение, однако в контексте настоящей главы все сказанное может не иметь отношения к тюленям или дельфинам. Поэтому нам следует выяснить, снижается ли уровень метаболизма при нырянии водных млекопитающих и птиц.

#### **Снижение интенсивности метаболизма — одно из рефлекторных физиологических изменений при нырянии**

Ответ на вопрос о скорости оборота АТФ при нырянии прост и давно известен физиологам. Больше сорока лет назад Шоландер (Scholander, 1940) впервые показал, что ныряние у млекопитающих сопровождается замедлением ритма сердца и сужением периферических сосудов. Позже это наблюдение было многократно подтверждено на различных видах (Butler, Jones, 1982). Такие данные явно указывают на то, что при нырянии интенсивность работы сердца, а значит, и метаболизм сердечной ткани понижаются; это, вероятно, относится и ко многим другим тканям, нормальное функционирование которых зависит от кровоснабжения. Как мы увидим, общее снижение интенсивности метаболизма может быть очень значительным, однако для количественной оценки этого явления нужны тщательные и подробные исследования на млекопитающих, способных к длительному пребыванию под водой. Наиболее полные данные по физиологии и метаболизму имеются для тюленя Уэдделла, к которым мы и обратимся.

Хотя тюлень Уэдделла — один из самых хороших ныряльщиков среди млекопитающих, интересно, что его физиологическая реакция на имитируемое в лаборатории «ныряние» качественно сходно с реакцией, наблюдавшейся у многих других морских млекопитающих и птиц. Частота сокращений сердца у него падает очень быстро и резко — с 60 до 15 ударов в минуту, но в этом нет ничего необычного. Минутный объем уменьшается с 40 до 6 л, тогда как среднее кровяное давление остается при таком имитируемом нырянии постоянным, составляя около



120 торр, что указывает на сильное сужение периферических сосудов. Исследование кровотока в отдельных тканях показывает, что при нырянии и последующем выходе на поверхность не изменяется кровоснабжение одной только центральной нервной системы. Почти во всех остальных органах и тканях (за исключением надпочечников) кровоток значительно уменьшается, составляя от  $\frac{1}{6}$  до  $\frac{1}{12}$  нормального. Даже коронарный кровоток сокращается до  $\frac{1}{6}$  исходной величины в соответствии с уменьшением нагрузки на сердце. Одновременно с этим во столько же раз уменьшается поток крови и в легочных артериях.

### Биохимические проявления реакции на погружение в воду

Перечисленные выше физиологические адаптации сопровождаются изменениями концентраций газов, растворенных в крови, относительных концентраций различных метаболитов и скорости оборота субстратов. Что именно происходит при нырянии в естественных условиях, не вполне ясно, и для простоты в нашем анализе мы будем в основном исходить из экспериментальных данных и из данных, полученных при имитируемом в лабораторных условиях «нырянии», когда соответствующие рефлексy, вероятно, проявляются в наибольшей степени. У тюленей, как и у других морских млекопитающих, при нормальном снабжении организма кислородом основным источником энергии служат жиры и обмен жирных кислот в тканях происходит довольно быстро. У серого тюленя, для которого имеются соответствующие данные, скорость оборота свободных жирных кислот составляет около  $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$  при времени полужизни пальмитата в плазме от 4 до 5 мин (Castellini, Hochachka, 1982). После погружения скорость обмена жирных кислот (определяемая по  $^{14}\text{C}$ -пальмитату) резко падает до таких малых величин, что их нельзя количественно определить обычными методами. В таких же экспериментах на тюлене Уэдделла было показано, что как при кратковременном, так и при длительном пребывании под водой уменьшается концентрация глюкозы в крови (кровь брали из легочной артерии и из аорты). Одновременно с этим в артериальной крови концентрация лактата повышалась с менее чем  $1 \text{ мкмоль/мл}$  перед погружением до  $3 \text{ мкмоль/мл}$  к концу погружения. Молочная кислота, появляющаяся в крови за это время, составляет лишь малую долю от ее общего количества: в основном она остается в местах своего образования, но после выхода животного на поверхность быстро переходит в кровь до выравнивания концентраций в крови и тканях (Hochachka et al., 1977).

Все эти данные, вместе взятые, показывают, что физиологическая реакция на погружение приводит к различиям в кровоснабжении разных участков тела, и соответственно возникают различия в основном источнике энергии для разных органов. Ни у одного из видов животных эти различия полностью не изучены, но если мы сможем ответить на вопрос, какое количество энергии необходимо тому или иному органу во время ныряния, то тем самым выясним также роль различных механизмов в снижении уровня обмена при соответствующей адаптации.

### Энергетические потребности мозга при нырянии

Как и у других позвоночных, у тюленей метаболизм головного мозга базируется в основном на поступающей с кровью глюкозе. В экспериментах, имитирующих ныряние, поглощение глюкозы мозгом не изменялось существенно по сравнению с исходным состоянием; это неудивительно, так как измерения мозгового кровотока показывают, что во время пребывания животного под водой он остается неизменным. Интересно, что не

Таблица 6-1. Размеры мозга и его метаболизм у тюленя Уэдделла во время пребывания под водой в эксперименте (в сопоставлении с данными о человеке в состоянии покоя). (Hochachka, 1981)

	Тюлень (450 кг)	Человек (70 кг)
Вес мозга, кг	0,5	1,4
Вес мозга, % от веса тела	0,1%	2,0%
Интенсивность метаболизма мозга <sup>1)</sup> , ммоль O <sub>2</sub> /1,2 ч	48	151
Основной уровень метаболизма всего тела, м/моль O <sub>2</sub> /1,2 ч	5697	960
Интенсивность метаболизма мозга, % от метаболизма всего тела	0,8%	15,0%

<sup>1)</sup> Вычислена по потреблению глюкозы в предположении о ее 80%-ном окислении (Murphy et al., 1980). В качестве единицы времени выбран период 1,2 ч, поскольку это максимальная известная продолжительность пребывания под водой у тюленя Уэдделла.

меняется и образование молочной кислоты: оно по-прежнему соответствует примерно 20—25 процентам поступающей в мозг глюкозы (Murphy et al., 1980). Зная относительные размеры мозга и общий объем крови, можно показать, что потребление энергии мозгом у тюленя составляет не больше 1% общего потребления энергии организмом, тогда как у человека соответствующая доля по крайней мере в 25 раз больше и составляет не менее 15% общего потребления энергии (табл. 6-1).

Интересно сравнить метаболизм мозга у тюленя Уэдделла и человека, сопоставляя данные о потреблении глюкозы, так как

они показывают роль абсолютного и относительного объема крови. Хотя нормальное содержание глюкозы в крови у обоих видов примерно одинаково (около 5 мкмоль/мл), относительный объем крови у тюленя больше, чем у человека, а абсолютный объем крови в 11—12 раз больше. Уже за счет этого суммарное количество глюкозы в крови тюленя больше в 11 раз. Простое вычисление показывает, что в результате мозг тюленя Уэдделла за 1,2 ч потребляет лишь 3,6% общего количества содержащейся в крови глюкозы, тогда как у человека эта цифра достигла бы 90% (табл. 6-2). Максимальное время пребывания тюленя

Таблица 6-2. Потребление глюкозы крови мозгом тюленя Уэдделла при экспериментальных погружениях (в сопоставлении с данными о человеке в состоянии покоя). (Hochachka, 1981; Murphy et al., 1980)

	Тюлень (60 л крови)	Человек (5,6 л крови)
Общее количество глюкозы в крови, ммоль	300	28,0
Потребление глюкозы мозгом, ммоль/1,2 ч	10,8	25,0
Доля общего запаса глюкозы, потребляемая мозгом за 1,2 ч, %	3,6%	90%

Уэдделла под водой составляет 1,2 ч, и ясно, что это не может определяться истощением запасов кислорода или глюкозы в крови в результате их потребления мозгом. Более того, умеренное поглощение глюкозы мозгом не может быть ответственно за значительное падение ее концентрации в крови, наблюдаемое при нырянии.

### Энергетические потребности легких при нырянии

Для того чтобы оценить потребление энергии легкими во время нахождения животного под водой, важно учесть, что при этом главным источником энергии и углерода служит, вероятно, содержащаяся в крови молочная кислота. Данные об артериовенозной разности концентраций этого вещества в легких тюленя говорит о том, что в легкое поступает довольно много молочной кислоты и что большая часть ее здесь окисляется. При этом может потребляться и глюкоза, однако эксперименты на срезах ткани показывают, что скорость поглощения и окисления молочной кислоты в 2—10 раз выше по сравнению с глюкозой в зависимости от отношения концентраций этих веществ. При измерениях интенсивности метаболизма в легких *in vivo* и *in vitro* были получены близкие значения. У человека на долю легких приходится лишь около 1% общего метаболизма (табл. 6-3).

### Энергетические потребности сердца при нырянии

В настоящее время нет прямых данных о потреблении  $O_2$  сердцем тюленя Уэдделла, поэтому возможны лишь косвенные оценки потребности этого органа в энергии. Ситуацию несколько осложняет еще то, что в сердце у тюленя Уэдделла содержатся очень большие запасы гликогена, а также высока концентрация лактатдегидрогеназы, что указывает на способность к интенсивному гликолизу. Однако распределение изотимов при этом в основном такое же, как в сердечной ткани других млекопитаю-

Таблица 6-3. Интенсивность метаболизма легких у тюленя Уэдделла во время пребывания под водой в эксперименте (в сопоставлении с данными о человеке в состоянии покоя). (Hochachka, 1981; Murphy et al., 1980, с изменениями)

	Тюлень (450 кг)	Человек (70 кг)
Вес легких, кг	4,0	0,5
Вес легких, % от веса тела	0,9%	0,7%
Интенсивность метаболизма легких, ммоль/1,2 ч	72,0	12,6
Интенсивность метаболизма легких, % от метаболизма всего тела	1,2%	1,3%

щих: преобладают характерные для сердца кинетически бифункциональные субъединицы, способные быстро использовать молочную кислоту. Зная общий объем кровотока, минутный объем сердца и артериальное давление, можно показать, что при нырянии коронарный кровоток в расчете на единицу работы сердечной мышцы остается почти неизменным. Это означает, что во время пребывания тюленя под водой его сердце работает в основном, если не исключительно, за счет аэробного метаболизма. Хотя у млекопитающих окисляемыми субстратами могут служить различные вещества (глюкоза, жирные кислоты, лактат), известно, что при концентрациях лактата, превышающих нормальную, это вещество окисляется в первую очередь (Drake, 1982). Именно так обстоит дело во время ныряния, и поэтому можно думать, что высокая концентрация лактатдегидрогеназы у тюленя Уэдделла используется для окисления лактата. В экспериментах, имитирующих длительное ныряние обыкновенного тюленя, превышение выработки лактата над его потреблением может наступать на более поздних этапах (Kjekshus et al., 1982). Независимо от источника субстрата интенсивность метаболизма сердечной мышцы у тюленя Уэдделла можно рассчитать, исходя из развиваемой сердцем мощности; оказывается, эта интенсив-

Таблица 6-4. Интенсивность метаболизма сердца у тюленя Уэдделла при различной нагрузке (ЧС — частота сокращений; УО — ударный объем)

	Потребление $O_2$ , ммоль <sup>1)</sup>	Доля потребленного $O_2$ из 1000 ммоль общего запаса в крови, %
Отсутствие брадикардии (ЧС 60, УО 568,5 в течение 1,2 ч)	993	99
Первые 0,3 ч <sup>2)</sup> ЧС 25, УО 568,5	130	
Последние 0,9 ч ЧС 15, УО 366	148	
Всего за 1,2 ч	278	27,8
Первые 0,3 ч <sup>2)</sup> ЧС 25, УО 568,5	130	
Последние 0,9 ч ЧС 7,5, УО 366	74	
Всего за 1,2 ч	204	20,4
ЧС 10, УО 366 в течение 1,2 ч <sup>3)</sup>	132	13,2
ЧС 7,5, УО 366 в течение 1,2 ч <sup>3)</sup>	80,2	8,9

<sup>1)</sup> Интенсивность метаболизма вычислена по работе в предположении, что КПД составляет 10%. Например, мощность левого желудочка при кровяном давлении 122 мм рт. ст. составляет 122·1330 (множитель, дающий работу в эргах)·ударный объем сердца·частота сокращений·время (мин). Параметры работы сердца взяты из Zapol et al. (1979). Мощность правого желудочка, работающего при меньшем давлении (30 мм рт. ст.), составляет около четверти мощности левого.

<sup>2)</sup> Условия, по-видимому, наиболее приближающиеся к предполагаемым условиям длительного пребывания под водой в море (Кооуман, Campbell, 1972; Кооуман et al., 1980).

<sup>3)</sup> Условия длительного экспериментального погружения (Zapol et al., 1979; Lig-gins et al., 1980; Zapol, неопубликованные данные).

ность определяется реакцией организма на погружение. Если сразу же развивается крайняя брадикардия, расход кислорода может падать ниже 100 ммоль за 1,2 ч. Если же брадикардия развивается постепенно, так что в начале пребывания под водой ритм сердца замедляется примерно до 25 ударов в минуту и лишь позднее — до 10 ударов, то уровень метаболизма сердечной мышцы соответствует потреблению 150—300 ммоль  $O_2$  за 1,2 ч. Это означает, что на долю сердца приходится 2—6% общего метаболизма (табл. 6-4).

#### Потребление мозгом, легкими и сердцем кислорода, запасенного в организме

Приведенные выше расчеты показывают, что суммарный метаболизм трех центральных органов составляет довольно малую долю общего метаболизма всего тела. Однако, может быть, такая постановка проблемы неверна, поскольку под водой у тюленя запасы кислорода ограничены, а именно они обеспечивают окислительный обмен. Не служат ли эти запасы лимитирующим

фактором, так как они расходуются на аэробный метаболизм мозга, легких и сердца? Ответ на этот вопрос будет отрицательным. Из предшествовавших исследований мы знаем, что общий запас кислорода в крови тюленя Уэдделла составляет примерно 1000 ммоль; еще 500 ммоль связано миоглобином мышечной ткани. Таким образом, за максимальное время пребывания под водой (1,2 ч) мозг тюленя расходует лишь 3—4% общего запаса кислорода в крови. Сердце из-за большого объема крови за это же время потребляет 15—20% имеющегося кислорода, а легкие — около 7%. В сумме мозг, сердце и легкие за 1,2 ч расходуют всего лишь около 25% общего запаса кислорода в крови (Ночачка, 1981; см. также табл. 6-1, 6-2 и 6-4).

Из сказанного можно сделать два важных вывода. Во-первых, максимальное время пребывания под водой (1,2 ч) не может определяться расходом запасов кислорода или субстрата в метаболизме мозга, сердца и легких. Во-вторых, *в этот период примерно 95% глюкозы и 75% кислорода, содержащихся в крови, «резервируются» для других органов и тканей.* Как долго организм тюленя мог бы поддерживать свою жизнедеятельность за счет одного лишь окислительного метаболизма? Ответ на этот вопрос зависит от общей реакции организма на ныряние.

### Максимальное время аэробного жизнеобеспечения при нырянии

Зная потребление кислорода центральными органами, легко подсчитать интенсивность метаболизма всех остальных органов и тканей, так как суммарная интенсивность известна — она составляет 5697 ммоль  $O_2$  за 1,2 ч на 450 кг массы тела. Из этого легко вывести, что максимальное время пребывания под водой *при полностью аэробном метаболизме всех тканей* должно составлять около 20 мин (табл. 6-5). Показательно то, что при аэриозе оно почти не зависит от интенсивности работы сердца: его максимальная продолжительность при *нормальном* ритме сердца лишь на 3—4 мин меньше, чем при глубокой брадикардии, т. е. при падении частоты сокращений до 7,5 ударов в минуту. Это обусловлено тем, что метаболизм сердечной мышцы даже при нормальной работе сердца составляет очень малую долю общего метаболизма тела. Таким образом, если в первые 20 мин (или около того) жизнь всецело поддерживается аэробными процессами, то *после этого сердце, легкие и мозг должны полностью переходить на анаэробный гликолиз.* У большинства млекопитающих ни сердце, ни мозг не в состоянии сколько-нибудь нормально функционировать на основе чисто анаэробных процессов; поэтому ныряние без специальной реакции организма связано с серьезным риском. И все же полевые наблюдения

Таблица 6-5. Максимальное время погружения тюленя Уэдделла (вес 450 кг) при аэробном метаболизме

Частота сокращений сердца, мин <sup>-1</sup>	Потребление O <sub>2</sub> сердцем, легкими и мозгом, ммоль/мин <sup>1</sup> )	Максимальное время «аэробного» ныряния, мин	Остаток O <sub>2</sub> к концу пребывания под водой <sup>2</sup> )
60	15,3	19	0
25	10,1	21	0
7,5	2,6	22,6	0

<sup>1</sup>) Эта величина вычислялась по Nochachka, 1981; интенсивность метаболизма в остальных тканях и органах принята эквивалентной 63,8 ммоль O<sub>2</sub>/мин (по Коопман, 1980).

<sup>2</sup>) В дальнейшем потребовался бы полный переход сердца, легких и мозга на анаэробный метаболизм.

показывают, что тюлени могут нырять (в частности, за кормом), используя только аэробное дыхание (Коопман et al., 1980); это дает определенное преимущество: тюлень, только что появившись на поверхности, может почти сразу нырнуть снова (время восстановления при аэробном нырянии очень мало).

### Разделение функций на аэробные и анаэробные при нырянии

Хотя физиологическая реакция на задержку дыхания мало что дает для увеличения времени чисто «аэробного» ныряния, однако она лежит в основе более длительного, так называемого исследовательского, ныряния тюленей. Простые вычисления (табл. 6-6) показывают, что замедление ритма сердца *влияет на максимальное время как строго аэробного, так и анаэробного функционирования периферических тканей*. Из этих вычислений следуют два важных вывода: 1) максимальное время, в течение которого периферические ткани могут функционировать аэробно, приближается к 20 мин (тогда при максимальной продолжительности пребывания под водой метаболизм этих тканей должен быть полностью анаэробным в течение последних 55—60 мин); 2) *в этом случае кислорода будет достаточно для того, чтобы сердце, легкие и мозг функционировали аэробно в течение всего времени, т. е. 1,2 ч. Таким образом, хотя увеличение максимальной продолжительности аэробного метаболизма периферических тканей за счет физиологической реакции невелико и составляет всего 5 мин, общее время пребывания под водой при этом возрастает с 22 до 72 мин без риска аноксии для центральных органов*. (В этом и состоит выгода использования физиологической реакции; недостаток же состоит в удлинении восстановительного периода — см. ниже.)

И наконец, важно подчеркнуть, что приводимые оценки максимальной продолжительности аэробного метаболизма основаны на предположении, что интенсивность метаболизма различных тканей и органов примерно та же, что в условиях покоя при нормальной обеспеченности кислородом, и почти соответствуют расчетам Кооуман et al. (1980). И те и другие оценки близки к максимальной продолжительности аэробного метаболизма, наблюдаемой при нырянии тюленя Уэдделла в естественных ус-

Таблица 6-6. Относительная роль аэробных и анаэробных функций при нырянии. (Кооуман, Campbell, 1972; Zapol et al., 1979; Liggins et al., 1980)

Частота сокращений сердца, мин <sup>-1</sup>	Доля кислорода в крови, потребляемая сердцем, легкими и мозгом за 1,2 ч, %	Максимальное время полного аэробноза для остального тела, мин	Время анаэробноза для остального тела, мин <sup>1)</sup>	Общее максимальное пребывание под водой, мин
25	48,5	12	60	72
25→15 <sup>2)</sup>	38,6	14	58	72
25→7,5 <sup>3)</sup>	31,2	15	57	72
10	24,0	16	56	72
7,5	18,8	17	55	72

<sup>1)</sup> В течение этого времени остается достаточно O<sub>2</sub> для полностью аэробного метаболизма сердца, легких и мозга.

<sup>2)</sup> Предполагается, что начальная частота составляет 25/мин, а затем за первые 0,3 ч снижается до 15/мин.

<sup>3)</sup> За 0,3 ч частота сокращений сердца уменьшается до 7,5/мин. При продолжительном «нырянии» в лабораторных условиях наблюдалась частота ниже 10/мин (см., например, Liggins et al., 1980).

ловиях, когда метаболизм мышц должен активироваться для плавания. Это означает, что поскольку метаболизм мышц возрастает, аэробный обмен в остальных органах и тканях должен при 20-минутном нырянии снижаться. Иными словами, либо мышцы должны переходить на анаэробноз, либо время пребывания под водой должно сокращаться (или может происходить и то и другое). Этот вопрос очень важен для понимания метаболизма при нырянии, и мы должны рассмотреть его более подробно.

### Мышечный метаболизм при кормовом (кратковременном) и исследовательском (длительном) нырянии

Из двух видов ныряния, наблюдаемых в естественных условиях (Кооуман et al., 1980), энергетические потребности легче оценить для кормового ныряния (менее 20 мин), так как при этом известен запас расходуемого кислорода. Считая, что масса



мышц составляет 135 кг и что 75% кислорода тратится на мышечную работу, получаем, что при 20-минутном погружении тюленя массой 450 кг для мышечного метаболизма потребуется 1125 ммоль  $O_2$ , что эквивалентно расходу приблизительно 6750 ммоль АТФ. Если бы при подводном плавании тюленя работали все его мышцы (что маловероятно!), то потребление энергии составляло бы всего лишь  $2,5 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , т. е. примерно лишь  $1/8$ — $1/12$  максимальной величины для мышц млекопитающих (см. гл. 4). Если работает лишь половина общей массы мышц, то потребление энергии составляет примерно  $5 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , т. е. примерно одну треть от потребления энергии у других млекопитающих. Поскольку интенсивность аэробного метаболизма у ныряющих тюленей может изменяться лишь в 3—4 раза (Ночаска, 1981), тогда как у других млекопитающих — в 10 раз, такая низкая величина вполне правдоподобна.

При долговременных погружениях ситуация сложнее. Предположим, что тюлень будет оставаться под водой не 20, а 40 мин, причем вторую половину этого времени — в анаэробном режиме. Если скорость передвижения при этом остается прежней, то для работы мышц необходимо 6750 ммоль АТФ (что соответствует накоплению более 100 мкмоль лактата на 1 г работающей мышечной ткани). А при максимальной длительности пребывания под водой после первых 20 мин аэробноа накопление лактата в мышцах к концу должно превысить 300 ммоль!

Даже если полученные выше оценки в 3—4 раза уменьшить (соответствующие аргументы приводятся ниже), то и тогда они останутся много выше реально наблюдаемых величин. Из этого можно заключить, что у тюленей, как и у других животных, мышцы работают в анаэробном режиме главным образом при кратковременных очень высоких нагрузках, но не при длительной работе, характерной для «исследовательского» ныряния. Ни на суше, ни в море марафонскую дистанцию не осилить на анаэробном гликолизе. Мы полагаем, что в этом случае, так же как и при кормовом нырянии, работа мышц обеспечивается энергетически эффективным аэробным метаболизмом, но поскольку запас кислорода «на борту» ограничен, то пребывание под водой можно продлить не иначе, как жертвуя скоростью. Снижая *интенсивность* мышечной работы в 3—4 раза по сравнению с кормовым нырянием, тюлень за счет этого может в 3—4 раза увеличить *продолжительность* аэробного плавания. Скорость синтеза и потребления АТФ при этом составит лишь  $1,5$ , а не  $5 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , как при кормовом нырянии (соответствующая величина для мышц млекопитающих в покое составляет  $0,3 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ; см. гл. 4). Запас кислорода «на борту» достаточен для поддержания такой интенсивности аэробно-

го дыхания мышц в течение примерно 70 минут (т. е. времени, близкого к наблюдаемому в естественных условиях).

Вообще можно было бы предсказать, что чем большая доля кислородного запаса расходуется на мышечную работу, тем меньше будет время пребывания под водой или же сильнее подавление аэробного метаболизма в тканях с пониженным кровотоком — вплоть до теоретического предела, т. е. нулевого потребления ими  $O_2$ . Таким образом, мы снова возвращаемся к вопросу об эффекте Пастера. Не прибегая к такому механизму, черепахи способны снижать оборот АТР. Возникает вопрос: может ли тот же самый процесс осуществляться у тюленей?

### **Снижение оборота АТР при недостатке $O_2$ во время пребывания под водой**

Ответ на поставленный выше вопрос, по-видимому, должен быть утвердительным, однако для того, чтобы получить его, нам надо знать интенсивность метаболизма в тканях с пониженным кровотоком в анаэробной фазе ныряния. В первом приближении эту интенсивность можно оценить по концентрации лактата, предполагая, что на мышечную работу расходуются три четверти резервного кислорода. В экспериментах с длительным (50 мин) пребыванием под водой без мышечной работы концентрация лактата в крови быстро поднимается примерно до 15 мкмоль/мл (Nochachka et al., 1977). Если предполагать, что при этом достигается равновесие концентраций лактата в крови и в тканях, где он образуется, то это означает, что в периферических тканях при максимальном времени пребывания под водой образуется примерно 30 ммоль лактата на 1 кг ткани. Поскольку ткани с пониженным кровотоком остаются в анаэробном режиме в течение примерно часа (табл. 6-6), можно заключить, что во всем теле (массой 450 кг) за это время накапливается около 13,5 моль лактата, что соответствует общему обороту АТР от 13,5 до 20 моль/ч, тогда как нормальная скорость оборота АТР близка к 34 моль/ч (на те же 450 кг). Другими словами, в экспериментах с почти максимальным временем пребывания животного под водой *скорость оборота АТР лежит между половиной и двумя третями нормальной величины*. Это весьма осторожная оценка происходящего снижения, в действительности оно может быть даже более значительным, хотя, по-видимому, и не столь радикальным, как у водяных черепах.

### **Размеры тела и продолжительность ныряния**

Хотя интуитивно ясно, что все полученные выше оценки максимального времени пребывания под водой могут сильно зависеть от массы тела, количественный анализ этой зависимости

для млекопитающих произведен не был. Такой анализ был, однако, проделан для ныряющих птиц. Джонс и его сотрудники показали, что соотношение между запасом кислорода «на борту» и массой тела может быть описано следующей зависимостью:

$$\text{Запас кислорода} = {}^1\text{Масса тела}^{1,131}.$$

С другой стороны, интенсивность аэробного метаболизма пропорциональна массе тела в степени 0,723. Следовательно,

$$\text{Максимальное время «аэробного» ныряния} = \frac{{}^1\text{Масса тела}^{1,131}}{\text{Масса тела}^{0,723}} = \text{Масса тела}^{0,4}.$$

Так, например, если масса тела увеличивается в 20 раз, то максимальное время ныряния при аэробном метаболизме тоже увеличивается, но лишь примерно в 5 раз (D. R. Jones, личное сообщение).

В экспериментах с утками было показано, что во время пребывания под водой у них (в отличие от тюленей Уэдделла) большая часть запаса  $O_2$  расходуется на работу сердца и легких. Суммарная масса этих органов пропорциональна массе тела в степени 0,65, а интенсивность метаболизма — массе тела в степени 0,73. Следовательно, при вынужденном пребывании под водой (включающем как аэробный, так и анаэробный режимы)

$$\text{Максимальная продолжительность} = \frac{\text{Масса тела}^{1,131}}{(\text{Масса тела}^{0,65})^{0,73}} = \text{Масса тела}^{0,65}.$$

Таким образом, при двадцатикратном увеличении массы тела максимальная продолжительность погружения, включающего аэробный и анаэробный режимы метаболизма, увеличивается примерно в 10 раз, тогда как при строго аэробном метаболизме она увеличивается только в 5 раз. Иными словами, крупные размеры тела удлиняют время пребывания под водой как при аэробном, так и при анаэробном режиме, но это преимущество сильнее сказывается при анаэробном метаболизме. Поскольку активность ферментов гликолиза в мышцах пропорциональна массе тела в степени 1,1—1,2, а активность ферментов аэробного обмена — массе тела в степени 0,73 (Emmett, Nochashka, 1981), преимущество больших размеров тела может быть еще более значительным, чем это следует из аллометрических зависимостей, использованных в расчетах Джонса и его сотрудников.

<sup>1)</sup> То техническим причинам этим знаком заменен знак пропорциональности. — *Прим. ред.*

**Проблема конечных продуктов:**  
**основное решение — толерантность к их накоплению в тканях**

Насколько нам сейчас известно, даже при наиболее долгом пребывании под водой работу центральных органов у млекопитающих и птиц обеспечивает в основном окислительный метаболизм, конечные продукты которого ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ) относительно безвредны. Однако в испытывающих недостаток кислорода периферийных тканях накапливаются лактат, пируват, сукцинат, аланин и глутамин (см. Murphy et al., 1982), хотя в значительных концентрациях — только лактат. Теоретически возможны разные способы решения проблемы конечных продуктов: накопление в ткани, медленная транспортировка в другие ткани и переработка там, выведение из организма. В действительности наиболее важен первый способ, второй используется в меньшей степени, третий не используется вовсе. Со времен пионерской работы Шоландера (Scholander, 1940) мы знаем, что молочная кислота (лактат), образуемая в гипоксичных тканях в экспериментах, имитирующих ныряние, в основном просто накапливается там, где она образуется, и равновесие между кровью и периферическими тканями из-за сужения сосудов не устанавливается. Поэтому важнейшее решение проблемы конечного продукта состоит в адаптации к его накоплению в тканях, в частности в мышцах.

Хотя концентрация лактата в крови после длительного пребывания под водой может значительно возрастать, обычно при нырянии млекопитающих и птиц она повышается весьма умеренно (Hochachka, Murphy, 1979). Черепахи в этом отношении сильно отличаются: концентрация лактата в их крови может после очень долгого анаэробнозиса достигать 200 мкмоль/мл, т. е. поразительно высокого уровня, несравнимого с тем, что можно встретить у других групп позвоночных. Эта концентрация настолько велика, что к серьезным проблемам поддержания кислотно-щелочного баланса добавляется еще необходимость нейтрализовать значительное количество ионов молочной кислоты. По крайней мере в экспериментах, имитирующих пребывание черепах под водой в зимний период, наблюдалось выделение в кровь кальция, смещающее кислотно-щелочной баланс, но в какой форме поступает кальций, пока неизвестно (Ultsch, Jackson, 1972). В опытах с менее длительными погружениями Робин и его коллеги (см. Caligiuri et al., 1981) обнаружили, что «катионная проблема» решается с помощью буферного действия белков.

По-видимому, у черепах выработались еще два механизма биохимического приспособления к столь высоким концентрациям молочной кислоты. Во-первых, у них повышена буферная

емкость крови и тканей за счет поддержания большого резерва бикарбонатов. Во-вторых, в сердце черепах по меньшей мере у двух регуляторных ферментов — фосфофруктокиназы и пируваткиназы — оптимум pH много ниже, чем у гомологичных ферментов высших позвоночных (Hochachka, Storey, 1975). Это можно рассматривать как приспособление либо к пониженному pH, либо к более изменчивым внутриклеточным величинам pH, варьирующим в диапазоне от 7,4 до по крайней мере 6,8 при апноэ, связанной с нырянием.

Биохимическое приспособление к накоплению лактата, известное к настоящему времени у морских млекопитающих, характерно, по-видимому, не только для этой группы и состоит в значительной буферной емкости ткани. Обнаружена хорошая (особенно в мышечной ткани) корреляция между буферной емкостью и активностью лактатдегидрогеназы (Castellini, Somero, 1981), указывающая на то, что буферная емкость ткани отвечает требованиям, возникающим при закислении в результате анаэробного метаболизма.

#### **Проблема конечных продуктов: вспомогательное решение — переработка молочной кислоты**

Хотя при нырянии кровеносные сосуды периферийных тканей и органов сужаются, кровоток все же не прекращается полностью, и поэтому происходит медленное накопление лактата в крови. Оно было бы еще более значительным, если бы лактат не окислялся в различных частях организма, в частности в легких. Как уже упоминалось, артериовенозные градиенты лактата в легких тюленя Уэдделла указывают на то, что лактат здесь поглощается из крови, где его концентрация во время ныряния обычно возрастает приблизительно до 3 ммоль/мл. Эксперименты с молочной кислотой, меченой  $^{14}\text{C}$ , показали, что вскоре после ее введения в легочную артерию, когда общая концентрация лактата и концентрация меченого лактата в легочной крови еще продолжает снижаться, в крови аорты уже появляется  $^{14}\text{CO}_2$ ; эти молекулы  $\text{CO}_2$  могли образоваться только в процессах легочного метаболизма, так как меченый лактат поступил (помимо крови) только сюда. Эти данные, а также эксперименты со срезами легкого показывают, что при различных условиях молочная кислота окисляется здесь быстрее глюкозы, т. е. в легких тюленей, так же как и других млекопитающих (Wolf et al., 1979), лактат определенно служит более предпочтительным субстратом окислительного метаболизма по сравнению с глюкозой. Помимо легких в окислении лактата могут участвовать также другие ткани и органы, например сердце (Drake, 1982) или работающие красные мышцы. Такое использование лактата

было продемонстрировано и у тюленей, ныряющих в естественных условиях (Кооутан et al., 1980), так что результаты экспериментов получают независимое подтверждение.

Остается неясным вопрос: поскольку перенос конечного продукта с кровью и его окисление в других тканях, видимо, лучше всего позволяют избежать накопления его в ткани и этот механизм широко используется у низших животных, то почему роль аналогичных процессов сравнительно невелика у ныряющих водных позвоночных?

Существуют два очевидных ответа. Прежде всего перенос лактата к другим тканям требует интенсивного кровообращения, а сужение сосудов представляет собой неотъемлемую составную часть физиологической реакции организма при нырянии. Эта реакция необходима для надлежащего распределения  $O_2$  между тканями организма. Таким образом, сама ее природа препятствует интенсивному переносу конечных продуктов метаболизма, в частности лактата.

Однако это хотя и главная, но не единственная причина. Вторая состоит в том, что, как уже говорилось, во многих, если не в большинстве тканей интенсивность метаболизма при нырянии значительно снижается, и потому нет особой нужды в дополнительном субстрате для окислительных процессов. При этом конечные продукты метаболизма, такие как молочная кислота, остаются потенциальным источником значительных количеств химической энергии, которая может быть сохранена для использования в более подходящих условиях. Эти условия фактически возникают при выходе на поверхность, когда необходимо восстановить гомеостаз глюкозы и гликогена и когда ощущается острая потребность в субстратах для глюконеогенеза. Поэтому весьма целесообразным оказывается сохранение лактата до того времени, когда кровоток в периферических тканях быстро восстановится.

### Восстановление гомеостаза при выходе на поверхность

Процессы, происходящие после выхода на поверхность, во многих отношениях не менее интересны, чем происходящие при самом нырянии. Чтобы понять это, полезно вспомнить, что у вынырнувшего животного частота сокращений и минутный объем сердца сразу же возвращаются к норме, а в течение первой минуты могут даже удвоиться по сравнению с нормой (M. Snyder, личное сообщение). В то же время те ткани, в которых кровоток был сильно уменьшен, начинают получать нормальное количество крови или даже больше обычного благодаря дополнительному расширению сосудов (Zapol et al., 1979). Конечные продукты реакций, накопившиеся в тканях, теперь вымываются

кровью, и концентрации их в крови и тканях приходят в равновесие. Эти процессы можно лучше всего проиллюстрировать, определяя содержание этих веществ в крови в течение некоторого времени после выхода животного на поверхность; при этом выявляются характерные резкие пики поступления метаболитов в кровь. В основном это те вещества, которые накапливаются в период пребывания под водой: пируват, лактат, сукцинат, аланин и глутамин (Murphy et al., 1982). При восстановлении метаболического гомеостаза возникают две взаимосвязанные задачи: 1) устранение накопленных излишков конечных продуктов и 2) восстановление до прежнего уровня запасов гликогена и глюкозы. Несмотря на связь между этими задачами, рассматривать их удобнее порознь — отчасти потому, что разные ткани участвуют в этих процессах по-разному.

### Устранение избытка лактата, пирувата, аланина и глутамина

В главе 4 мы уже рассмотрели основные способы восстановления прежнего уровня молочной кислоты, а именно: 1) окисление *in situ*, 2) окисление в каких-либо иных тканях организма, 3) использование для синтеза гликогена *in situ* и 4) использование в цикле Кори для превращения обратно в глюкозу и гликоген в печени и почках. Теоретически устранение излишков пирувата могло бы происходить теми же способами; но, поскольку эти процессы у ныряющих животных никогда не исследовались, мы будем считать, что пируват метаболически ведет себя так же, как лактат, и на том закончим обсуждение этого вопроса.

Из четырех перечисленных возможностей первая и третья не изучались экспериментально, вторая была исследована для трех органов — мозга, легких и сердца, а четвертая количественно изучена у обыкновенного тюленя (Davis, 1983):

### Восстановление запасов глюкозы и гликогена: решающая роль времени

Как и у других млекопитающих, у которых лактат переходит в кровь большими порциями, у ныряющих животных большая часть его поглощается печенью и почками и перерабатывается в глюкозу и гликоген. В этот процесс, по крайней мере у тюленей, вносят свой вклад аланин и глутамин, тоже поступающие в кровоток после выхода животного на поверхность. Хотя все три метаболита могут быть хорошими предшественниками в глюконеогенезе, однако, судя по их концентрациям в крови, вклад молочной кислоты в ресинтез глюкозы в 2—4 раза больше, чем аланина и глутамина вместе взятых.

Интересно, что восстановление после выхода на поверхность обычно занимает по меньшей мере столько же времени, сколько животное пробыло под водой, а для полного восстановления гомеостаза глюкозы обычно требуется еще больший период. Этот процесс идет под контролем глюкагона, концентрация которого уже на раннем этапе возрастает и стимулирует глюконеогенез. Совместное действие глюкагона (способствующего превращению лактата, аланина и глутамина в глюкозу) и повышенной концентрации катехоламинов (стимулирующих гликогенолиз) обычно приводит в этот период даже к некоторой гипергликемии (Murphy et al., 1980; Robin et al., 1981).

Судьба азота, входящего в состав аланина и глутамина, специально не изучалась, но по аналогии с другими млекопитающими можно довольно уверенно предположить, что он переходит главным образом в мочевины, образующуюся в печени. Фактически основная функция аланина и глутамина у млекопитающих состоит в транспорте избыточного азота в печень. Однако пока не известно, приводит ли это к повышению уровня мочевины в крови после ныряния<sup>1</sup>.

### Почему при нырянии используется в основном аэробный метаболизм?

Множественные метаболические процессы восстановления после длительного пребывания под водой сильно ограничивают частоту ныряния, так как животному, находившемуся под водой

---

<sup>1</sup> Давняя мечта многих морских биологов — всесторонний непрерывный биохимический анализ крови с одновременным слежением за ритмом сердца при нырянии животного в природных условиях — недавно осуществилась при работе с тюленем Уэдделла. Это стало возможным в результате создания специальной микро-ЭВМ и перистальтического насоса, позволяющих регистрировать ЭКГ и брать пробы артериальной крови. Компьютер может давать команду к взятию проб крови при определенных комбинациях времени пребывания под водой, глубины погружения и частоты сокращений сердца. Микрокомпьютер может быть связан с лабораторной ЭВМ световодом, через который программу можно время от времени видоизменять, так что желаемые пробы могут быть получены в разные сроки пребывания животного под водой и в период восстановления после выхода на поверхность. Детальный анализ ЭКГ (Hill et al., Fed. Proc. ABSTRACTS 42, 1983) указывает на регулируемую брадикардию (причем минимальная частота сокращений сердца отмечается при длительном «исследовательском» нырянии) и на прямую зависимость между ритмом сердца и скоростью перемещения по вертикали. Из исследованных потенциальных субстратов (триацилглицеролы плазмы, свободные жирные кислоты, аминокислоты и глюкоза) при нырянии снижалась только концентрация глюкозы в плазме крови. Концентрация мочевины в плазме возрастала при нырянии того и другого типа, но суммарная концентрация аминокислот оставалась неизменной. Содержание лактата в крови при длительном (исследовательском) нырянии и в последующий период было повышено; при кратковременном кормовом нырянии оно не повышалось. Получен-



в течение периода, близкого к предельному, требуется по крайней мере такое же (обычно даже большее) время для восстановления метаболического гомеостаза. Поэтому использование при каждом погружении всех анаэробных возможностей метаболического арсенала было бы для животного расточительной и неэффективной стратегией. Как подчеркивают Кооуман et al. (1980), при кормежке тюлени Уэдделла могли бы проводить под водой гораздо больше времени, если бы они в большинстве случаев обходились одними лишь аэробными механизмами. И действительно, полевые наблюдения показали, что продолжительность примерно 97% погружений в природных условиях не достигает 20 мин. При этом в большинстве систем тела большую часть времени используется только окислительный метаболизм. С другой стороны, при исследовательском нырянии и вынужденных задержках под водой приходится иногда пускать в ход все метаболические средства, чтобы можно было дольше не выходить на поверхность и проплыть наибольшее расстояние. Компромисс между эффективностью и продолжительностью может быть целесообразен, если затраты на обследование новой кормовой территории окупятся более легким ее освоением в будущем.

Ключом к успеху является, по-видимому, метаболическая пластичность: приспособлявая возможности ферментного аппарата к метаболическим потребностям тканей, ныряющие морские млекопитающие создают изолированную самоподдерживающуюся систему жизнеобеспечения с новыми метаболическими «правилами выживания», позволяющую им проникнуть в среду, существовать в которой все время они не способны. Однако, проводя в ней значительное время и покрывая при этом внушительные расстояния, они могут успешно исследовать и осваивать море.

---

ные данные, по-видимому, подтверждают, что физиологическая реакция при нырянии бывает пластичной и регулируется в зависимости от обстоятельств в каждом конкретном случае (R. D. Hill, W. M. Zapol, G. C. Liggins, R. C. Schneider, A. H. Schuette, P. W. Hochachka, Metabolite biochemistry of the Weddell seal diving at sea, Amer. J. Physiol. [1984].)

# Выключение активного метаболизма: от ангидробиоза до зимней спячки

Когда и почему животные снижают интенсивность обмена веществ?

В природе существует множество примеров того, как животные на различные промежутки времени впадают в спячку или иного рода неактивное состояние. Например, для того чтобы пережить период полного обезвоживания, рачок *Artemia* инцистируется, блокируя метаболические процессы, и может оставаться в таком состоянии неопределенно долго. Такая способность существовать в полностью обезвоженном состоянии (ангидробиоз) свойственна не только этому животному. Еще одним примером сложного многоклеточного организма, способного к полному обезвоживанию без каких-либо вредных последствий, могут служить личинки комара *Polypedilum vanderplanki* (Chironomidae). Эти личинки обитают в мелких водоемах с каменистым дном в Нигерии и Уганде. В начале сезона дождей такие водоемы могут по несколько раз образовываться и снова пересыхать, иногда они возникают на короткое время и в засушливый сезон. Когда водоем исчезает, живущие в нем личинки высыхают и остаются в таком состоянии до следующего дождя.

Степень обезвоживания личинок зависит от влажности воздуха. При относительной влажности 60% содержание воды в личинках составляет 8%, а при относительной влажности менее 1% падает ниже 3%. Чтобы вернуться в обычное состояние, личинке нужно пробыть в воде около часа, за это время восстанавливается нормальное содержание жидкости в организме (80—90%), и личинка снова может потреблять пищу (Hinton, 1968). Таким образом личинки приспособились к условиям, в которых обводнение чередуется с периодами жестокой засухи. Аналогичная способность известна у коловраток, тихоходок и нематод и, вероятно, довольно широко распространена среди низших беспозвоночных.

Способность существовать в обезвоженном состоянии позволяет выживать в местообитаниях, временами полностью лишенных воды; в периоды засухи организм не может питаться, и ему выгодно максимально сократить свой метаболизм. В таких «сухих биологических системах» интенсивность обмена может па-

дать до нуля, что полностью устраняет потребность в питании.

Нулевой уровень метаболизма — это предельный случай. У большинства других организмов, периодически впадающих в спячку, обмен веществ прекращается не полностью — он лишь уменьшается на один-два порядка по сравнению с нормальным уровнем покоя. Иногда это сопровождается перестройкой ферментативных процессов. Условия, вызывающие такую реакцию организма, могут быть разными, чаще всего это недостаток воды или пищи (или же того и другого). Например, африканские и южноамериканские двоякодышащие рыбы известны своей способностью впадать в спячку в засушливый сезон, когда пересыхают водоемы. Пустынные улитки способны по нескольку лет пережидать засуху, спрятавшись в раковине и закупорившись там. В обоих случаях такая летняя спячка (эстивация) исключает возможность питания, и резкое снижение интенсивности метаболизма по сравнению с нормальным уровнем составляет необходимую биохимическую стратегию.

У мелких обитателей пустыни впадение в спячку часто определяется сочетанием трудностей, связанных с жарой и с недостатком воды и пищи. Терморегуляция в жаркое сухое время года требует расхода большого количества воды на испарение, а воды для питья не хватает. Кроме того, высокая интенсивность метаболизма у мелких млекопитающих не позволяет им просто голодать в ожидании лучших времен. Все эти проблемы одновременно хорошо решаются с помощью спячки, при которой метаболические потребности организма резко снижены.

Для мелких млекопитающих и птиц умеренного пояса стимулом к впадению в спячку может быть сочетание нехватки пищи с холодом. В этом случае поддержание высокой температуры тела требует постоянного усиленного питания; другими словами, нехватка пищи не позволяет поддерживать высокую интенсивность метаболизма. Ночное оцепенение, характерное для мелких летучих мышей умеренного пояса, мелких птиц (например, колибри) и некоторых мелких наземных млекопитающих, представляет собой превосходное и широко распространенное решение проблемы.

Спячка позволяет пережить неблагоприятный период не только короткой ночью, но и долгой зимой. У насекомых такого рода состояние покоя называется диапаузой, у млекопитающих и птиц — зимней спячкой (гибернацией). Диапауза может наступать на любой стадии жизненного цикла насекомого — на стадии яйца, личинки, куколки и даже взрослой особи, но обычно диапауза все же характерна для ранних стадий развития. Во время диапаузы интенсивность метаболических процессов сильно понижена, что позволяет пережить неблагоприятный период за счет внутренних резервов.

Зимняя спячка может быть нескольких типов. У мелких млекопитающих (весом до 10 кг) спячка представляет собой глубокий продолжительный сон, сопровождающийся резким снижением температуры тела, замедлением дыхания, ритма сердца и обмена веществ. У некоторых видов температура тела остается низкой около недели, после чего примерно на день поднимается до нормы, и животное при этом пробуждается; однако во время таких пробуждений оно не потребляет пищи. Характерным примером животного, впадающего в такую периодическую спячку, может служить американский лесной сурок, не запасавший в норе корм на зиму.

Многие другие мелкие млекопитающие впадают в зимнюю спячку другого типа: перед тем как залечь, они делают большие запасы корма. Они спят по 5—10 дней, после чего, так же как и лесной сурок, просыпаются примерно на день, но в отличие от сурка в периоды пробуждения они очень прожорливы.

Еще один тип зимней спячки встречается у крупных млекопитающих, у которых спячка может длиться до семи месяцев. Температура тела при этом понижается не очень сильно, однако животные в период спячки не едят, не испражняются и не выпускают мочу. Такой тип спячки известен у трех видов медведей, и некоторые биологи считают его наиболее специализированным из всех типов, свойственных млекопитающим.

Для всех видов спячки и анабиоза, описанных выше (а также и многих других), характерна одна общая биологическая особенность: *организм прекращает потребление внешних пищевых ресурсов и при этом в различной, но всегда контролируемой степени снижает интенсивность своего метаболизма*. Период голодания может быть сравнительно коротким, в других же случаях охватывает значительную часть жизненного цикла. Именно с этим связано широко распространенное представление, что метаболизм в периоды спонтанного голодания имеет много общего с метаболизмом при спячке и ближе к нему, чем к нормальному метаболизму. Такое представление следует считать чрезмерно упрощенным и в основе своей неверным. На самом деле особенности метаболизма в состоянии спячки резко отличаются от его особенностей при спонтанном голодании и служат совершенно иным целям. Поскольку эти цели (и соответствующие метаболические механизмы) часто бывают специфичны для различных типов спячки, мы рассмотрим их по отдельности, каждый раз подчеркивая черты сходства и различия.

## Ангидробиз и обезвоженные организмы

Необходимость воды для жизни представляется столь непреложным биологическим принципом, что существование многочисленных исключений может некоторым читателям показаться удивительным. Однако в таких особых случаях речь не идет об активном метаболизме. Способность выживать при утрате всей клеточной воды (кроме, вероятно, воды, прочно связанной с макромолекулами) и при этом не подвергаться необратимому повреждению в действительности широко распространена. Кейлин (Keilin, 1959) ввел термин *криптобиоз* («скрытая жизнь»), однако позднейшие авторы предпочитают называть это явление *ангидробизом* («жизнь без воды»).

К ангидробизу способны две группы организмов. Первая из них — это организмы, способные к ангидробизу лишь на ранних стадиях развития; таковы семена растений, споры бактерий и грибов, яйца и ранние эмбрионы некоторых ракообразных и личинки некоторых насекомых. Ко второй группе относятся организмы, способные к ангидробизу на всех стадиях жизненного цикла, — некоторые простейшие, коловратки, нематоды и тихоходки (Crowe, 1971). Несмотря на коренное различие между этими двумя группами, у них, судя по имеющимся данным, есть много общего в биохимических механизмах перехода в состояние ангидробиза и выхода из него. Мы подробно рассмотрим два хорошо изученных примера, а именно рачка артемию (*Artemia*), относящуюся к первой группе, и нематод — представителей второй группы.

## Основные морфологические особенности цист

Циста артемии состоит из зародыша на стадии ранней гаструлы, окруженного бесклеточной капсулой. Зародыш содержит около 4000 внешне почти не дифференцированных клеток. Эти клетки не обладают никакими видимыми особенностями, которые указывали бы на их приспособленность к высушиванию. Тем не менее эмбрион может оставаться жизнеспособным, практически полностью утрачивая содержащуюся в нем воду. Оказавшись снова в водной среде, он вскоре «оживает» — обмен веществ и процессы развития возобновляются.

## Содержание воды и метаболическое состояние цист артемии

Циста *Artemia* служит не только превосходным объектом для экспериментального исследования толерантности к обезвоживанию, но и моделью для изучения общих свойств внутриклеточной воды в живых системах. Особенно важны полученные на

этом объекте сведения о различных категориях внутриклеточной воды и о роли каждой из них в стабилизации структуры макромолекул и в управлении метаболическими процессами.

Клегг (Clegg, 1981) выявил зависимость между содержанием воды и метаболической активностью, представленную в табл. 7-1. По его данным, при содержании воды менее 0,3 г на 1 г сухого

Таблица 7-1. Зависимость клеточного метаболизма цист *Artemia* от обводненности. (Clegg, 1981, с изменениями)

Содержание воды, г на 1 г цист <sup>1)</sup>	Иницируемые метаболические события	Состояние
От 0 до 0,1 0,1	Не наблюдаются Уменьшение концентрации АТР	Аметаболическое
От 0,1 до 0,3± ±0,05 0,3±0,05	Новых явлений не наблюдается  В метаболизме участвуют некоторые аминокислоты, цикл Кребса и связанные с ним промежуточные соединения, жирные кислоты с короткой цепью, пиримидиннуклеотиды; несколько уменьшается концентрация гликогена	Область ограниченного метаболизма
От 0,3 до 0,6± ±0,07 0,6±0,07	Новых явлений не наблюдается  Клеточное дыхание, синтез углеводов, мобилизация трегалозы, увеличение общего количества АТР; большие изменения в пуле свободных аминокислот, гидролиз белков желтка, синтез РНК и белков; возобновление процессов эмбрионального развития	Область нормального (conventional) метаболизма
От 0,6 до 1,4	Новых явлений не наблюдается	

<sup>1)</sup> Максимальное обводнение достигается при содержании воды примерно 1,4 г на 1 г цист.

вещества цисты находятся в *аметаболическом состоянии*. Никаких метаболических реакций не происходит, а протекающие химические превращения идут без участия ферментативного катализа. При содержании воды около 0,3 г/г появляется некоторая метаболическая активность. Она еще не сказывается на потреблении кислорода (табл. 7-1) и ограничена лишь некоторыми из реакций, идущих при более высоком содержании воды. Соответственно Клегг выделяет *область локализованного, или ограниченного, метаболизма* при концентрациях воды примерно от 0,3 до 0,65 г/г.

При достижении верхней границы этого интервала начинается *область нормального метаболизма*. Потребление кислорода

достигает измеримых значений и растет с увеличением содержания воды. Наблюдаемая при этом метаболическая активность *качественно* не отличается уже от активности клеток с нормальным содержанием воды; таким образом, нормальный метаболизм восстанавливается при содержании воды, несколько меньшем половины нормального, т. е. характерного для полностью гидратированных клеток.

Какое отношение эта зависимость метаболической активности от содержания воды в клетке имеет к природе внутриклеточной воды и ее влиянию на активность ферментов? Рассуждения Клегга в основном состоят в следующем. При добавлении воды к высушенным цистам артемии прежде всего, по-видимому, образуются слои, окружающие макромолекулы, хотя даже при максимальном обезвоживании некоторое количество прочно связанной с макромолекулами воды в цистах сохраняется. Клегг предлагает называть такую воду *связанной* и считает, что ее содержание составляет около 0,15 г/г. При дальнейшем увлажнении появляется *вицинальная вода*, которая хотя и не входит непосредственно в состав слоев, окружающих макромолекулы и другие растворенные вещества, например малые ионы, но все-таки в большей мере структурирована, чем свободная вода, поскольку связана более дальними взаимодействиями с поверхностью мембран и такими макромолекулярными комплексами, как элементы цитоскелета. Фаза вицинальной воды полностью формируется только тогда, когда содержание воды достигает приблизительно 0,6 г/г. При дальнейшем увлажнении в клетке появляется свободная вода, т. е. вода в слабо структурированном состоянии, не связанная с какими-либо компонентами клетки.

Сопоставляя эти гипотетические состояния внутриклеточной воды с обнаруженными в цистах артемии изменениями метаболической активности по мере увлажнения, Клегг высказал предположение, что метаболическая активность не требует присутствия в клетке свободной воды. Таким образом, появление метаболической активности при содержании воды около 0,3 г/г наводит на мысль, что локально метаболические превращения возможны уже в вицинальной воде. Однако лишь с появлением свободной воды восстанавливается нормальный метаболизм. Вода в свободном состоянии может быть необходима для эффективного транспорта метаболитов, источников энергии и т. п. между различными компартментами клетки. Поэтому в модели Клегга появление свободной воды можно рассматривать как создание канала связи между разными частями клетки. По мере роста содержания воды и интенсивности метаболизма свободная вода может все в большей мере способствовать внутриклеточному транспорту материалов (если учесть, что вязкость сво-

бодной воды уменьшается с увеличением ее общего количества).

Хотя такие представления и умозрительны, они открывают интересный подход к оценке потребности клетки в воде. Некоторое количество воды необходимо для гидратации макромолекул и малых молекул; значительно больше воды требуется для внутриклеточного транспорта веществ. К этой простой схеме надо, однако, добавить еще роль водной фазы в поддержании структурной стабильности макромолекул, а это заставляет нас рассмотреть еще одну важную особенность ангидробиотических систем, а именно накопление многоатомных спиртов (полиолов) типа глицерола и трегалозы.

### Роль глицерола и трегалозы

В цистах артемии глицерол составляет около 4%, а трегалола — до 14% сухого веса. Существует сильная корреляция между накоплением этих спиртов в клетке и ее выживанием в обезвоженном состоянии. В главах, посвященных температурной адаптации и осмотической устойчивости, будет говориться о важной роли полиолов в осморегуляции и способности противостоять замораживанию. Какие же свойства полиолов делают их полезными при недостатке воды?

Полиолы в ангидробиотических системах могут выполнять две различные функции. Прежде всего они могут служить заменителями воды, способствуя образованию водородных связей между полярными (заряженными) компонентами клетки и таким образом осуществляя одну из функций воды. Кроме того, полиолы могут играть важную роль в стабилизации структуры белков при низкой активности воды. Недавно было показано (Gekko, Timasheff, 1981a, b), как именно это может происходить. Оказалось, что в присутствии глицерола сильно структурированная вода, окружающая молекулы белков, не образуется. Поэтому добавление возрастающих количеств глицерола к водному раствору белков приводит к увеличению их структурной стабильности. Это же подтверждается термодинамическими доводами. Если белковая цепь развернута (т. е. белок денатурирован), то с растворителем соприкасается большая поверхность молекулы, что приводит к увеличению количества высокоструктурированной воды. Так как глицерол исключается из этой структурированной воды, его добавление способствует сохранению компактной, глобулярной (т. е. нативной) структуры белка. Таким образом, если потеря внутриклеточной воды ведет к дестабилизации структуры белков (вероятно, из-за повышения концентрации низкомолекулярных веществ в их микроокружении), то создание высоких концентраций глицерола может рассматриваться как стратегия, позволяющая сохранять белки в



нативной форме при обезвоживании клетки. Когда период обезвоживания кончается и возникает необходимость быстрого восстановления метаболизма, весь набор ферментов, необходимых для нормального (по терминологии Клегга) метаболизма, оказывается готовым к действию.

### Ангидробиоз у почвенных нематод

Почвенные нематоды — это круглые черви длиной около 0,5—3 мм. Кровеносной и дыхательной систем у них нет, вода и газы проходят прямо через кутикулу путем диффузии. Хотя эти нематоды живут в земле, они фактически представляют собой водных животных, так как для их передвижения необходима водная пленка, поэтому раньше полагали, что переносить обезвоживание способны лишь немногие виды нематод (отчасти такое впечатление возникло из-за малочисленности исследований). Однако после разработки количественных методов извлечения высушенных нематод из почвы пустынь стало ясно, что способность к ангидробиозу распространена у нематод гораздо шире, чем это считалось раньше. Кроме того, эти исследования показали, что способность к ангидробиозу не ограничена лишь отдельными трофическими группами нематод или стадиями жизненного цикла: при увлажнении обезвоженных образцов почвы обнаруживаются как личинки, так и половозрелые особи нематод многих родов.

Попутно следует заметить, что, хотя само явление ангидробиоза известно со времен Левенгука, до самого последнего времени способность почвенных нематод, коловраток и тихоходок переносить высыхание почвы, в которой они обитают, исследовалась очень мало. Положение изменилось только в последнее десятилетие, когда были разработаны методы массового культивирования нематод. Кроу и его ученики, используя эти методы, получили обширные экспериментальные данные о процессах перехода к ангидробиозу и выхода из этого состояния у нематод рода *Aphelenchus* (см. Crowe, Clegg, 1978).

### Морфологические и ультраструктурные изменения у нематод при высушивании

Стимулом к переходу в состояние ангидробиоза для нематод, так же как и для артемии, служит недостаток воды, который приводит к ряду последовательных морфологических изменений, начинающихся в первые 24 ч и практически полностью завершающихся в течение 72 ч. Тело животного укорачивается и закручивается, внутриклеточные органеллы, например миофиламенты, упаковываются в определенном порядке; упорядоченным изменениям подвергаются и мембранные системы. Не-

хватка воды является необходимым, но не достаточным условием этих изменений: Кроу и его коллеги пришли к выводу, что все изменения регулируются самим животным. В настоящее время полагают, что такой эндогенный контроль совершенно необходим для выживания: *организм остается живым лишь постольку, поскольку сохраняется его структурная целостность*. При нарушении такой целостности наступает смерть. Хотя этот восходящий к работе Кейлина (Keilin, 1959) принцип был сформулирован в первую очередь применительно к высшим уровням организации, структурная целостность должна также поддерживаться путем сохранения надлежащей микросреды для каждой клетки и ткани; можно даже сказать, что создание нужных внутриклеточных (и внеклеточных?) условий — это главная функция метаболизма при переходе к ангидробиозу. Каковы же особенности метаболизма во время обезвоживания и какие изменения внутренней среды при этом происходят?

### Изменения метаболизма нематод при переходе к ангидробиозу

В переходе к ангидробиозу у нематод и у цист артемии много общего, характерного для замкнутых систем: в систему извне не поступает никаких питательных веществ, и поэтому все изменения метаболизма, сопровождающие обезвоживание, должны определяться внутренними факторами. Это упрощает для экспериментатора выявление основных метаболических адаптаций. К ним в первую очередь относится *перераспределение углеводов — переход его из запасов гликогена и липидов в большие внутриклеточные пулы глицерола и трегалозы*. Концентрация этих веществ в процессе обезвоживания резко возрастает, достигая соответственно 6 и 10% сухого веса к моменту завершения перехода к ангидробиозу (т. е. по прошествии 72 ч). Увеличение количеств глицерола и трегалозы сопровождается, как и следовало ожидать, почти в точности таким же уменьшением запасов гликогена и липидов.

### Корреляция между содержанием многоатомных спиртов и выживанием

Интересно, что существует поразительное совпадение между началом синтеза глицерола и трегалозы, с одной стороны, и увеличением способности переносить воздействие сухого воздуха — с другой. Если по оси ординат откладывать концентрацию глицерола или трегалозы, а по оси абсцисс — долю выживших особей, то в обоих случаях выявится линейная зависимость с коэффициентами регрессии 0,98 и 0,93 соответственно. Как и в случае цист артемии, это говорит о том, что жизнеспособность в высушенном состоянии скорее всего зависит от содержания

глицерола и трегалозы. Если учесть стабилизирующее действие многоатомных спиртов на структурную целостность ферментов и нуклеиновых кислот, такой результат не покажется неожиданным. Он вполне согласуется и с данными о цистах артемии. Кроме того, Кроу и его коллеги высказали предположение, что эти метаболиты (особенно глицерол) могут играть важную роль в стабилизации мембран при ангидробиозе. Аналогичные изменения в концентрациях многоатомных спиртов известны также и у других организмов, способных к ангидробиозу.

### **Прекращение метаболизма при ангидробиозе**

Хотя в отношении нематод нет данных о перестройке метаболизма, сравнимых с данными о цистах артемии, известно, что высушенные нематоды не потребляют  $O_2$ . Беккерель еще тридцать лет назад научился возвращать к жизни некоторых нематод, коловраток и тихоходок, охлажденных перед тем до температуры  $0,05^\circ K$ . Он вычислил, что если какой-то метаболизм и сохраняется при столь низкой температуре, то его интенсивность должна быть в  $10^7$  раз меньше нормальной. Хинтон (Hinton, 1968) считает, что это уже не будет метаболизм в обычном смысле слова. Таким образом, можно полагать, что обмен веществ у нематод в состоянии ангидробиоза прекращается.

### **«Пробуждение» от ангидробиоза у нематод**

Перестройка метаболизма при увлажнении высушенных нематод, видимо, происходит, как и можно было ожидать, в порядке, обратном последовательности событий при переходе к ангидробиозу. Однако скорости соответствующих процессов радикальным образом различаются. Как уже говорилось, при наступлении ангидробиоза перестройка происходит довольно медленно, занимая в целом до 72 часов. При регидратации восстановление метаболического гомеостаза, напротив, занимает всего несколько часов, причем большинство наблюдаемых изменений происходит в первый же час. Ход исчезновения трегалозы и глицерола почти одинаков, и параллельно обоим этим процессам идет восстановление запасов гликогена: соответствующие кривые выглядят симметрично (рис. 7-1). Эти изменения, вероятно, осуществляются по обычным путям катаболизма трегалозы и глицерола и синтеза гликогена, но ускоренно в связи с повышением общей интенсивности обмена при выходе из ангидробиоза. Различные скорости перестройки метаболизма при высушивании и увлажнении адаптивно, так как оно согласовано с типичными скоростями соответствующих событий в окружающей среде: высыхание почвы происходит сравнительно медленно, а увлажнение (например, после ливня) — гораздо быстрее.

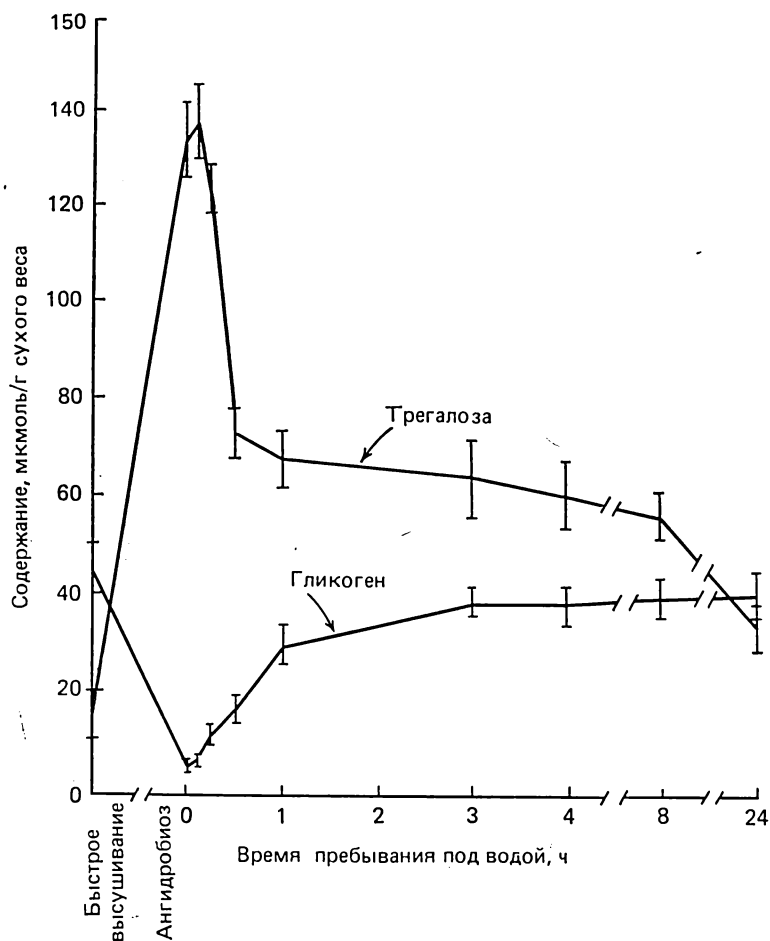


Рис. 7-1. Содержание трегалозы и гликогена в быстро высушенных нематодах *A. avenae* (предполагается, что оно остается таким же, как у свежесобранных червей и в ангидробиотических особях на воздухе, а также в различные сроки после помещения ангидробиотических червей в воду). (По Crowe, Clegg, 1978.)

### Биологическое значение ангидробиоза

Ангидробиоз обычно рассматривают как адаптивную стратегию, которая 1) обеспечивает более эффективное расселение вида, 2) увеличивает шансы на выживание в условиях суровой засухи и 3) позволяет приурочить важные биологические процессы (питание, размножение и т. п.) к периодам или местам с

благоприятными условиями. Кроме того, при ангидробиозе фактически останавливается ход биологического времени, так как прекращаются метаболические процессы; поэтому в некоторых случаях может достигаться огромная долговечность организма в реальном (физическом) времени.

И наконец, хотя в ангидробиозе можно видеть прежде всего адаптацию к условиям засухи, важным побочным результатом оказывается также *колоссальное повышение устойчивости к множеству других неблагоприятных факторов*. Известно, что обезвоженные организмы способны переносить очень низкие и очень высокие температуры и давления, толерантны ко многим органическим веществам, токсинам и аноксии. Учитывая подобные преимущества, легко понять, почему способность к ангидробиозу, по-видимому, независимо возникала в различных филогенетических линиях.

### Диапауза у насекомых

Многие насекомые, для того чтобы пережить неблагоприятный период (обычно зиму или другое суровое время года), впадают в состояние покоя с резко пониженным уровнем метаболизма. У насекомых такое состояние называется диапаузой. Хотя функционально оно близко к ангидробиозу, обмен веществ при диапаузе не прекращается полностью. Диапауза может наступать на любой стадии жизненного цикла, и это происходит при участии различных эндокринных механизмов. На стадии яйца и личинки диапауза индуцируется *появлением* определенного гормона: во время эмбрионального развития воздействует особый белковый гормон, на стадии личинки — так называемый ювенильный гормон. Напротив, на стадии куколки и имаго переход к диапаузе вызывается *отсутствием* определенного гормона — проторакотропного в первом случае и ювенильного во втором (Riddiford, Truman, 1978).

У различных форм диапаузы, а также большинства других форм состояния покоя есть много общих черт (Mansingh, 1971), а именно: а) очень низкая интенсивность метаболических процессов; б) относительная или полная неактивность; в) запрограммированные комплексы биохимических приспособлений, обеспечивающих выживание при низких температурах (иногда ниже нуля), без воды или без пищи. Происходящие при этом изменения метаболизма подчас поистине поразительны в сравнении с тем, что обычно для млекопитающих. Например, интенсивность обмена у диапаузирующей куколки цекропийного шелкопряда — одна из самых низких во всем классе насекомых, тогда как у взрослой бабочки во время полета она, наоборот, одна из самых высоких. Величины потребления кислорода при

этом различаются в 2000 раз (Schneiderman, Williams, 1953). Вероятно, в связи с большим значением насекомых для сельского хозяйства биохимические механизмы диапаузы, особенно зимней, уже довольно хорошо изучены. Они обсуждаются во многих обзорах (см., например, Salt, 1961), а поскольку в них много общего, для наших целей достаточно будет подробно рассмотреть какой-нибудь один пример. Рассмотрим спячку у личинки пестрокрылки.

### Организация метаболизма при зимней диапаузе

У золотарниковой пестрокрылки *Eurosta* личинка третьего возраста проводит зиму в галлах на стеблях золотарника. Находясь выше снежного покрова, личинки должны быть в состоянии пережить суровую северную зиму, когда морозы достигают  $-40$  и даже  $-50^{\circ}\text{C}$ . Удалось выявить некоторые физиологические и биохимические факторы, способствующие выживанию. Прежде всего, хотя интенсивность метаболизма в соответствии с малой потребностью в энергии во время диапаузы невелика, метаболические процессы подвергаются строгой регуляции. Источники углерода и энергии (особенно гликоген, но также и триацилглицерол) запасаются в избытке в предшествующий период, как и у всех насекомых, способных к диапаузе (Mansingh, 1971). Концентрации других источников углерода (низкомолекулярных углеводов, свободных аминокислот и свободных жирных кислот) и быстро реализуемых источников энергии (фосфагенов и АТФ) поддерживаются на постоянном уровне и близки к концентрациям в период активности насекомого, даже при отрицательных температурах; только при  $-30^{\circ}\text{C}$  наблюдалось небольшое снижение концентрации фосфагена и АТФ и общего энергетического статуса организма (Storey et al., 1981).

Главная функция метаболизма в период постепенного понижения температуры состоит в биосинтезе по меньшей мере двух многоатомных спиртов — глицерола и сорбитола, а также, возможно, белка-криопротектора. В полевых исследованиях выявляются необычно высокие концентрации глицерола и сорбитола в гемолимфе. В лабораторных экспериментах уже при  $15^{\circ}\text{C}$  концентрация глицерола достигала 65% максимальной величины и выходила на плато на уровне примерно 235 мкмоль/г сухого веса при температуре, близкой к  $0^{\circ}\text{C}$ . Сорбитол впервые появляется в личинках, когда температура опускается ниже нуля. При дальнейшем понижении температуры концентрация сорбитола постепенно растет, выходя на плато на уровне 145 мкмоль/г сухого веса при температуре ниже  $-10^{\circ}\text{C}$  (рис. 7-2). Обычно считают, что функция этих многоатомных спиртов, как и у нематод, состоит в защите от воздействия низких температур; это

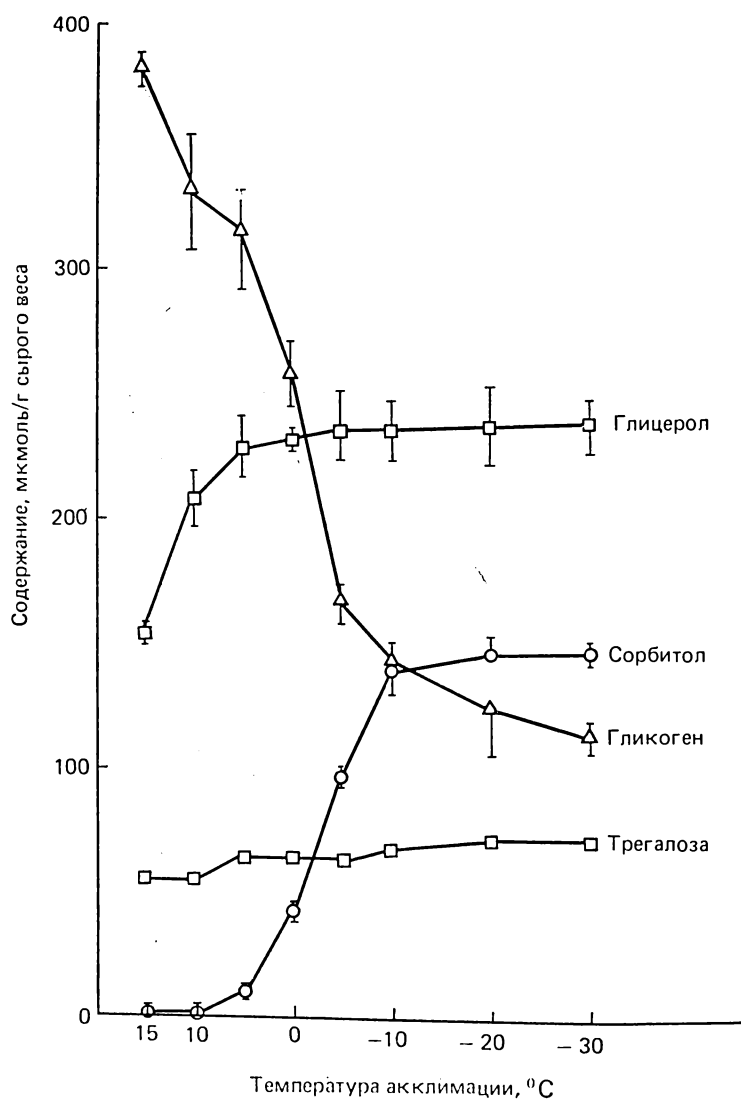


Рис. 7-2. Содержание гликогена, многоатомных спиртов и сахаров в личинках *Eurosta*, акклимированных к отрицательным температурам. (По Storey et al., 1981.)

достигается либо увеличением количества связанной воды, либо прямым взаимодействием с ферментами и другими белками, предотвращающим их денатурацию (эта функция четко отличается от антифризных функций, обсуждаемых в главе 10: глицерол и сорбитол не вызывают температурного гистерезиса при замерзании и оттаивании). В результате этих метаболических адаптаций точка замерзания гемолимфы понижается до  $-10^{\circ}\text{C}$ . Гемолимфа (т. е. внеклеточная жидкость) замерзает лишь тогда, когда температура опускается ниже этой точки, и это не

Таблица 7-2. Изменение содержания сахаров, полиолов и гликогена в личинках при адаптации к низкой температуре по сравнению с содержанием тех же метаболитов при  $15^{\circ}\text{C}$ . (Storey et al., 1981)

Метаболит	Изменение по сравнению с содержанием при $15^{\circ}\text{C}$ , мкмоль $\text{C}_6$ на 1 г сухого веса	
	При $0^{\circ}\text{C}$	При $-30^{\circ}\text{C}$
Глицерол/2	+39,3	+42,1
Сорбитол	+41,5	+145,8
Глюкоза	+16,1	+28,6
Трегалоза $\times 2$	+18,0	+32,0
Итого	+114,9	+248,5
Гликоген	-123,3	-268,1

смертельно для организма. Даже после замерзания гемолимфы потребление кислорода продолжается, хотя обычно активность электрон-транспортной системы во время диапаузы чрезвычайно низка. Напротив, каталитическая способность ферментов цикла Кребса, например цитратсинтазы, остается на нормальном уровне (Storey et al., 1981).

Существование таких различий в активности ферментов — это фактически еще один признак того, что *метаболизм при зимней диапаузе остается под строгим контролем*. Энзимологическая адаптация проявляется также в увеличении активности ключевых ферментов, участвующих в метаболизме гликогена, — фосфорилазы, гексокиназы и фосфофруктокиназы, тогда как активность ферментов второго отрезка гликолитического пути остается неизменной. К числу других ферментов, активность которых изменяется при адаптации к низкой температуре, относятся 3-гидроксинацил-СоА-дегидрогеназа (один из ферментов окисления жирных кислот), глутаматдегидрогеназа и глутамат-пируваттрансаминаза. Последние два фермента участвуют в синтезе пролина и аланина — аминокислот, в некотором количестве накапливающихся в личинках при низкой температуре. Активность сорбитолдегидрогеназы и полиолдегидрогеназы увеличи-



вается по мере того, как температура снижается до  $-30^{\circ}\text{C}$ ; этот процесс идет параллельно с накоплением сорбитола в зимующих морозоустойчивых личинках. Такой параллелизм наряду с данными об активности специфических фосфатаз, вероятно, указывает на то, какие пути могут использоваться для синтеза упомянутых веществ (Storey et al., 1981).

Имеющиеся данные в целом указывают на то, что 1) каталитический потенциал ферментов начального участка гликолиза возрастает, а ферментов последнего участка — остается неизменным; 2) активируется путь, ответвляющийся от пути гликолиза и ведущий к образованию многоатомных спиртов; 3) активность электрон-транспортной системы сильно снижается (судя по крайне малому потреблению кислорода), несмотря на то что каталитический потенциал ферментов цикла Кребса, по видимому, остается неизменным.

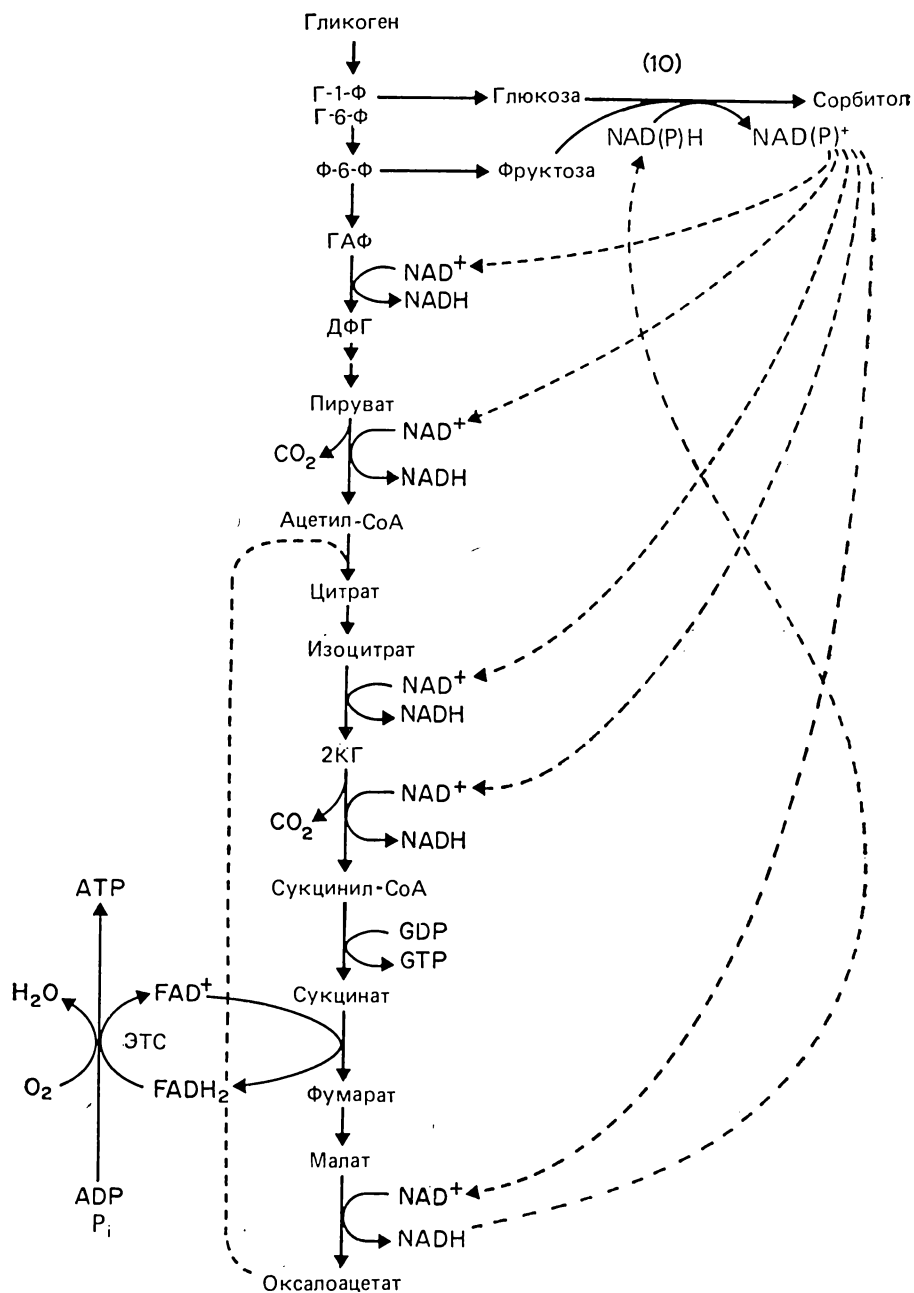
### **Гликоген как предшественник многоатомных спиртов**

Тщательные лабораторные исследования дали возможность построить детальную картину коренной метаболической перестройки, происходящей при зимней диапаузе. Они показали, что, как и в случае ангидробิโอза нематод, у личинки отмечается довольно точная обратная зависимость между расходом гликогена и накоплением сорбитола и глицерола. Если учесть сравнительно меньшие изменения пулов глюкозы и трегалозы, то окажется, что расход гликогена превышает аккумуляцию образующихся из него конечных продуктов лишь примерно на 20 мкмоль/г (табл. 7-2). По имеющимся данным энергию для этих процессов доставляет аэробное расщепление гликогена (Storey et al., 1981); но что служит источником восстановительной силы при образовании глицерола и сорбитола?

### **Возможные источники восстановительных эквивалентов во время диапаузы**

Обычно рассматриваются два основных источника восстановительной силы: образование NADH на этапе гликолиза, катализируемом глицеральдегидфосфат-дегидрогеназой, и образование NADH на более поздних этапах метаболизма. Первый способ может быть анаэробным, второй — обычно аэробный, так как связан с окислением NADH в системе транспорта электронов.

В отношении личинок в состоянии диапаузы можно уверенно исключить первый путь как единственный источник восстановительной силы: при образовании каждого моля сорбитола один моль триозофосфата должен был бы переходить на «нижний»



участок пути гликолиза, а это несовместимо со стехиометрическими отношениями гликогена и спиртов (табл. 7-2). Эти отношения показывают, что большая часть углерода глюкозы не может идти дальше уровня триозы (глицерола) и значительное количество углерода должно войти в состав сорбитола. Поскольку абсолютные количества глицерола и сорбитола должны быть весьма велики (около 0,4 М в личинках пестрокрылки), то такое расхождение нельзя объяснить просто ошибкой эксперимента — даже относительно малые отклонения от теоретически необходимого количества восстановительной силы были бы замечены как весьма значительные изменения абсолютных концентраций. Таким образом, надо искать другие источники, и одним из них мог бы быть цикл Кребса.

### Цикл Кребса как источник восстановительной силы

Если на минуту представить себе, что цикл Кребса не отделен пространственно от путей образования сорбитола и глицерола, то легко показать, что при этом могла бы создаваться восстановительная сила, достаточная для согласования с известными скоростями реакций и конечными количествами образующихся спиртов. Лучше всего это можно показать в случае образования сорбитола. Для поддержания окислительно-восстановительного баланса нужно (рис. 7-3), чтобы на каждые 11 моль образующейся из гликогена гексозы только один моль метаболизировался полностью. При этом генерировалось бы (за счет реакций глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы и пируват-дегидрогеназы и всех сопряженных с  $\text{NAD}^+$  этапов цикла Кребса) достаточно  $\text{NADH}$  для восстановительного синтеза 10 моль сорбитола.

Возникает вопрос: правдоподобно ли, что такой теоретически возможный механизм реализуется в действительности? Мы склонны думать, что да — в качестве рабочей гипотезы можно предположить, что такой механизм существует, по двум причинам. Во-первых, есть данные о том, что активность ферментов цикла Кребса во время зимней диапаузы остается почти на нормальном уровне, хотя это могло бы казаться ненужным ввиду очень сильного замедления окислительного метаболизма. Во-вто-

---

Рис. 7-3. Цикл Кребса как возможный источник восстановительной силы для синтеза сорбитола во время диапаузы у личинок *Eurosta*. Стехиометрическое отношение, указанное в скобках (1 моль окисленных глюкозных остатков на 10 моль остатков, восстановленных до сорбитола), согласуется с данными Storey et al. (1981) об изменениях концентраций метаболитов. ГАФ — глицеральдегидфосфат; 2-ОГ — 2-оксoglутарат; ЭТС — электрон-транспортная система.

рых, в период диапаузы снижена активность электрон-транспортной системы (ЭТС), и если она ниже активности цикла Кребса, то легко могут создаться окислительно-восстановительные условия, благоприятствующие требуемому потоку водорода. В предельном случае в такой системе реакции образования сорбитола (и глицерола) могли бы компенсировать низкую активность ЭТС в отношении NADH, используя лишь  $\text{FADH}_2$  (образующийся на этапе сукцинатдегидрогеназы) в качестве главного донора протонов и электронов для ЭТС. Это могло бы обеспечить медленный процесс окислительного фосфорилирования с синтезом небольших количеств АТФ.

Данные о метаболизме личинок пестрокрылки позволяют проверить по крайней мере одно предсказание, вытекающее из предложенной схемы метаболизма при диапаузе. Из рис. 7-3 ясно, что стехиометрическое соотношение между накоплением сорбитола и катаболизмом глюкозы должно составлять 10:1 (т. е. из 11 единиц глюкозы 10 должны превращаться в сорбитол, а одна — полностью метаболизироваться). У личинок образование сорбитола происходит в основном при температуре между  $0^\circ\text{C}$  и  $-30^\circ\text{C}$ , когда концентрация глицерола постоянна. При этом за все время акклимации содержание сорбитола поднимается примерно до 105 мкмоль/г. За то же время снижение содержания глюкозильных единиц (в сумме по гликогену, глюкозе и трегалозе) эквивалентно 117 мкмоль/г. Таким образом, 10,2% использованной глюкозы не входят в состав образовавшегося сорбитола и, вероятно, в дальнейшем метаболизируются, теоретический же расчет этой величины (рис. 7-3) дает оценку 9,1%, так что предложенная модель хорошо согласуется с экспериментальными данными. В точности такой же вопрос возникает относительно того, откуда берется NADH при образовании глицерола; он тоже не рассматривался работавшими в этой области исследователями, но может быть легко решен с помощью модели, представленной на рис. 7-3.

Наконец, если изложенная интерпретация верна, то возникает мысль, что образование сорбитола или глицерола — это процесс, антагонистичный нормальному дыхательному метаболизму, но сопряженный с ним через сукцинатдегидрогеназу. При такой сопряженности можно вычислить интенсивность дыхания личинок во время охлаждения от  $0^\circ\text{C}$  до  $-30^\circ\text{C}$  — она составит около 4 мкмоль  $\text{O}_2$  на 1 г ткани в сутки. В экспериментах для потребления кислорода личинками *Chironomus* при температурах между  $-15^\circ\text{C}$  и  $0^\circ\text{C}$  (Scholander et al., 1953) были получены величины от 0,12 до 9,6 мкмоль  $\text{O}_2$  на 1 г в сутки с простыми температурными коэффициентами. Таким образом, наша теоретическая оценка кажется правдоподобной. С другой стороны, если, как раньше, предполагать нормальный аэробный катабо-

лизм гликогена, то вся восстановительная сила, необходимая для образования сорбитола и глицерола, должна генерироваться либо в реакции глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы, либо в пентозном цикле. В этом случае на каждый моль образующегося сорбитола по главному пути метаболизма должен направляться один моль триозофосфата. Потребление  $O_2$  при этом составляло бы около 21 мкмоль на 1 г в сутки, т. е. примерно в 5 раз выше ожидаемого. Еще хуже то, что расход глюкозы должен в 1,8 раза превышать фактически наблюдаемый. Хотя ни одна из этих последних альтернатив не кажется нам особенно правдоподобной, вопрос, несомненно, требует дальнейшего тщательного анализа с новыми серьезными попытками сбалансировать окислительно-восстановительные процессы и пути углерода.

От удачной теоретической модели следует ожидать, что она позволит объяснить ранее непонятные результаты наблюдений и выявит новые проблемы. В нашем случае модель прежде всего объясняет происхождение восстановительных эквивалентов, необходимых для образования сорбитола и глицерола, с хорошей точностью в рамках реально наблюдаемой стехиометрии. Она также объясняет: а) почему интенсивность окислительного метаболизма много меньше, чем можно было бы ожидать, исходя лишь из  $Q_{10}$  (потому, что реакции образования сорбитола и глицерола, зависящие от NADH, фактически вступают в конкуренцию за NADH с электрон-транспортной системой); б) почему сохраняется нормальная активность ферментов цикла Кребса, в то время как функция системы транспорта электронов сильно подавлена; в) почему существует тесное стехиометрическое соответствие между гликогеном и многоатомными спиртами (потому, что большая часть углеродных атомов гликогена действительно переходит в эти два конечных продукта). Кроме того, из схемы на рис. 7-3 ясно, что катаболизм при низких температурах вовсе не такой уж аэробный. Вероятно, его правильнее рассматривать как сложный анаэробный путь, из которого углерод и водород выводятся в виде глицерола и сорбитола, подобно тому как в более обычных анаэробных процессах конечными продуктами служат молочная кислота или какие-то иные вещества. Вполне возможно, что именно поэтому глицерол и сорбитол могут накапливаться и при аноксии — в умеренной степени при диапаузе, когда возрастает каталитический потенциал ферментов, участвующих в их образовании. Это означает, что окислительно-восстановительное равновесие на этапе сукцинатдегидрогеназы может поддерживаться независимо от функционирования потребляющей  $O_2$  электрон-транспортной системы, что встречается и в других системах. Однако представленная модель не объясняет, как сопряжены нуждающиеся в NADH реакции в цитозоле с

митохондриальными реакциями цикла Кребса<sup>1</sup>, генерирующими NADH. В других системах используются специальные челночные процессы для переноса восстановительных эквивалентов через мембраны митохондрий. Для понимания таких челночных процессов, происходящих в период диапаузы у насекомых, нужны дополнительные исследования.

### Летняя спячка двоякодышащих рыб

Двоякодышащие рыбы (в особенности африканские *Protopterus*), — вероятно, наиболее изученный пример рыб, дышащих воздухом и способных впадать в длительную летнюю спячку (эстивацию) и таким образом пережить период, когда пруды, озера или реки полностью пересыхают; они первыми были тщательно изучены биологами-экспериментаторами. Вообще-то примеров такой эстивации много, и не только среди рыб, способных к воздушному дыханию, но и среди различных амфибий. Однако мы сосредоточимся на рассмотрении двоякодышащих рыб — отчасти потому, что летняя спячка у них довольно хорошо описана и о ней имеются некоторые биохимические данные.

Как и в случае ангидробиоза, внешним стимулом для эстивации у двоякодышащих рыб и других водных позвоночных служит недостаток воды. Хотя двоякодышащие рыбы обычно живут в больших водоемах, остающихся из года в год относительно постоянными, они часто встречаются и в более мелких озерах, прудах и речках, иногда пересыхающих в засушливое время года. При этом глубина даже крупных озер на протяжении года сильно изменяется. Поэтому и в обычных своих местобитаниях двоякодышащие рыбы иногда оказываются в лужах или болотах, отрезанных от основного водоема и полностью пересыхающих. Задолго до того как это происходит, двоякодышащие рыбы зарываются в ил, образуют нечто вроде кокона с дыхательным каналом, выходящим на поверхность, и затем впадают в спячку, которая может продолжаться от одного засушливого сезона до нескольких лет. В неволе одна африканская двоякодышащая рыба находилась в состоянии спячки в течение девяти лет (К. Johansen, личное сообщение).

### Общая организация метаболизма у двоякодышащих рыб

Двоякодышащие рыбы — довольно малоподвижные существа с низкой интенсивностью аэробного метаболизма. Они не очень сильные пловцы и обычно в активных стадиях жизни подстерегают добычу в засаде. В период активной жизни источником энергии для них служит либо гликоген (глюкоза), либо жир. Первый используется в основном для анаэробного метаболизма,

второй — для окислительного. Гликоген запасается во всех тканях, но, как и у всех позвоночных, в наибольшей степени концентрируется в печени. Жир образует значительные скопления, расположенные вдоль оси тела в хвостовой области между миомами (рис. 7-4). Кроме жиров и гликогена, источником энергии для двоякодышащих рыб в периоды активной жизни служат также белки и аминокислоты.

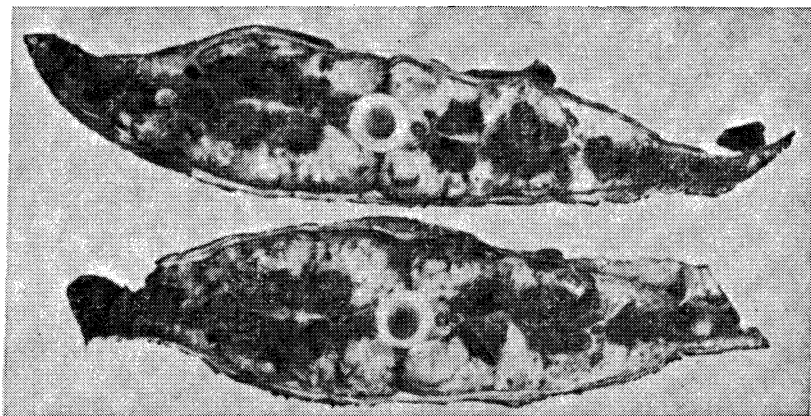


Рис. 7-4. На срезе хвостовой части тела африканской двоякодышащей рыбы хорошо видны обширные жировые запасы (темные пятна). Микроскопический и гистологический анализ показывает, что эти запасы образованы настоящей жировой тканью (J. F. Dunn, личное сообщение). Такие же жировые депо имеются у южноамериканских двоякодышащих рыб (W. C. Hulbert, личное сообщение). (Фото J. F. Dunn.)

Данные о ферментах в различных тканях и органах как южноамериканских, так и африканских двоякодышащих рыб согласуются с представлением, что энергетический метаболизм у них основан на использовании нескольких различных субстратов (Ночашка, 1979). Например, в мускулатуре активность ферментов анаэробного метаболизма значительно выше, чем аэробного, а абсолютные уровни активности тех и других ферментов намного ниже, чем у более подвижных рыб. Даже сердцу и мозгу двоякодышащих рыб свойствен высокий гликолитический потенциал, а возможности окислительного метаболизма невелики по сравнению с другими рыбами. Вместе с тем, однако, печень и почки обладают значительной способностью осуществлять глюконеогенез, а также обмен аминокислот и цикл мочевины.

Общая организация метаболизма у двоякодышащих рыб, даже в период активной жизни, указывает на низкий выход

энергии, что подтверждается и прямыми измерениями. В состоянии спячки интенсивность энергетического обмена еще ниже: по данным Х. Смита (Smith, 1930), она падает примерно до трети нормальной величины. Позднее, однако, было показано, что по мере продолжения спячки интенсивность метаболизма все больше и больше снижается и может уменьшаться на два порядка по сравнению с активным состоянием (К. Johansen, личное сообщение).

### **Экономия гликогена во время летней спячки у двоякодышащих рыб**

Из анализа доступных источников энергии у таких рыб ясно, что даже при низкой интенсивности метаболизма запасов гликогена не хватило бы на длительную спячку. Кроме того, так же как и в других экстремальных ситуациях (например, при миграциях лососей), запасы гликогена и глюкозы, вероятно, сохраняются во время спячки для тех клеток и тканей (мозг, эритроциты, почечные канальцы), которым глюкоза абсолютно необходима, гликоген мышц тоже может сохраняться на случай экстренной надобности при пробуждении (если потребуется быстрое передвижение). Как и у других позвоночных в аналогичных условиях, запасы гликогена должны поддерживаться за счет новообразования глюкозы из аминокислот, освобождающихся при расщеплении белков. Регуляторные свойства по крайней мере одного из ключевых ферментов этого пути (фруктозобисфосфатазы) действительно близки к свойствам того же фермента у других рыб и у млекопитающих. Осуществлению этого процесса способствуют также достаточные концентрации ферментов глутамат-пируваттрансаминазы, глутамат-оксалоацетаттрансаминазы и глутаматдегидрогеназы, необходимых для мобилизации углерода аминокислот в процессе глюконеогенеза (Hochachka, Somero, 1973; обзор: Dunn et al., 1981).

### **Использование источников энергии при летней спячке у двоякодышащих рыб**

Как впервые показал Х. Смит около полувека назад, на первой стадии длительной спячки метаболическая «машина» двоякодышащих рыб использует смесь субстратов, и дыхательный коэффициент в этот период составляет примерно 0,8. До сих пор никто не оценил время, в течение которого рыба может находиться в спячке, используя жиры как единственный источник углерода и энергии. Нам представляется, что жировых запасов в хвостовой части тела африканских двоякодышащих рыб вполне достаточно, чтобы пережить засушливый сезон. Преимущест-



ва использования жиров в этих условиях состоят в следующем: во-первых, жиры — высокоэффективный источник энергии, если эффективность оценивать числом молекул АТР, образуемых на 1 моль субстрата, так что при замедленном метаболизме во время спячки они способны поддерживать метаболизм дольше, чем какие-либо иные вещества; во-вторых, обмен жиров не дает более вредных конечных продуктов, чем двуокись углерода, которая легко выводится из организма. В отличие от голодания у некоторых позвоночных (в том числе у человека) спячка у двоякодышащих рыб не приводит к накоплению кетоновых тел.

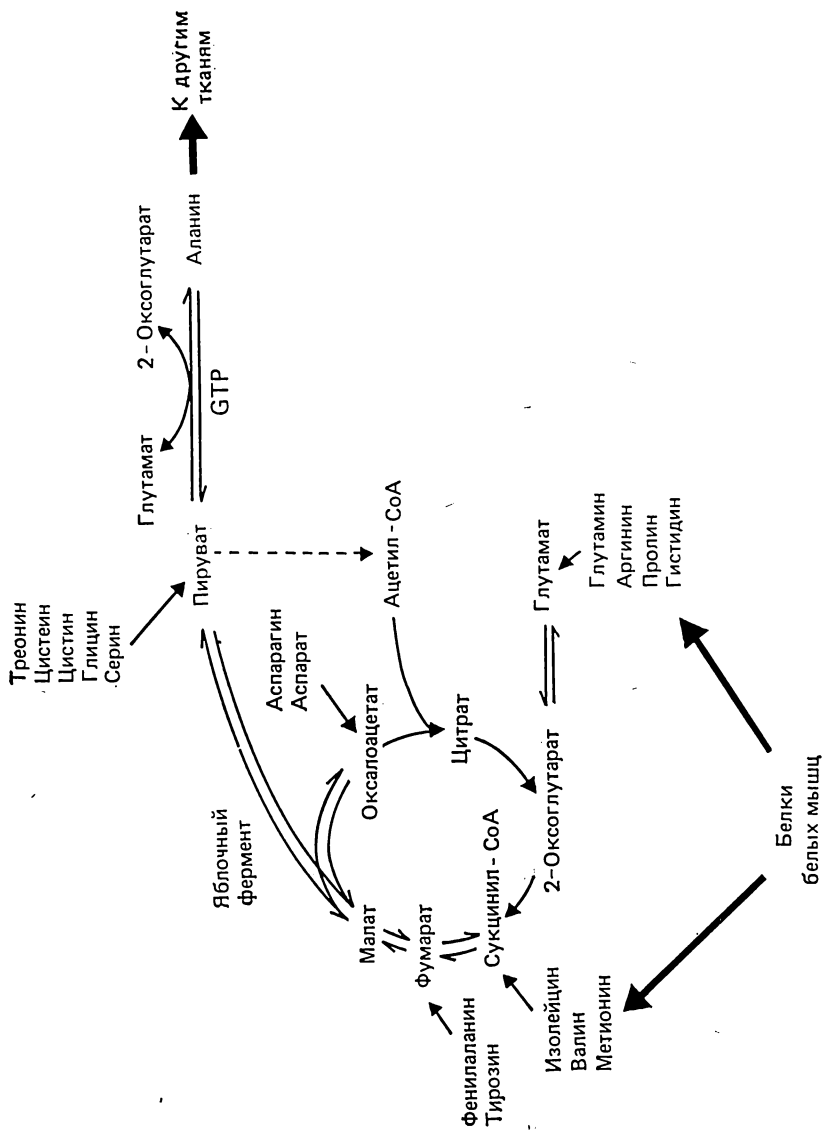
Мы склонны считать, что в большинстве случаев спячки в естественных условиях предпочтительным источником углерода и энергии служат жиры. Однако в условиях эксперимента при очень длительной спячке или, возможно, при недостаточных жировых запасах животные неизбежно должны переходить на «сжигание» собственных белков. Именно так, возможно, обстояло дело в экспериментах Х. Смита, поскольку он не заметил жировых запасов в хвосте у своих подопытных рыб.

### **Метаболизм белков и аминокислот у двоякодышащих рыб**

Хотя уже пятьдесят лет как известно, что белки и аминокислоты могут служить у двоякодышащих рыб потенциальным источником энергии, подробных данных о том, как именно они используются, до сих пор нет. Какие белки в первую очередь мобилизуются? С каких тканей начинается энергетическое использование белков? Какие аминокислоты используются и где именно? Ответы на большинство из этих вопросов дает хорошая рабочая модель метаболизма при нерестовых миграциях лососей. А поскольку ключевые ферменты, необходимые для такой организации метаболизма (глутамат-пируваттрансаминаза, глутамат-оксалоацетаттрансаминаза и глутаматдегидрогеназа), обнаруживают довольно высокую активность в соответствующих тканях двоякодышащих рыб, причем во время спячки эта активность фактически возрастает, то по крайней мере в качестве рабочей гипотезы можно предположить следующее:

1. Главным источником эндогенных белков служит белая мускулатура.

2. Смесь аминокислот, образующаяся в белой мускулатуре в результате протеолиза, не переходит непосредственно в кровь, но и не метаболизируется полностью в месте образования; частичная переработка аминокислот приводит к тому, что из белой мускулатуры в кровь поступает больше аланина (рис. 7-5), который служит главным субстратом для катаболических процессов в других тканях и органах тела.



3. В некоторых тканях аланин в основном окисляется, однако в печени он участвует в глюконеогенезе, обеспечивающем потребности организма в глюкозе (Mommensen et al., 1980).

### Конечные продукты обмена аминокислот у двоякодышащих рыб

Хотя в целом описанная модель метаболизма аминокислот и белков остается гипотетической, его конечные продукты установлены с полной достоверностью; это, с одной стороны,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и глюкоза, а с другой — аммиак и мочевины. Первая группа конечных продуктов в нашем контексте не представляет интереса, однако азотсодержащие отходы важно рассмотреть по двум причинам. Во-первых, двоякодышащая рыба в состоянии спячки, так же как и организмы в состоянии ангидриобиоза, — это относительно изолированная и замкнутая система, которая, насколько известно, обменивается с окружающей средой только кислородом, водой и двуокисью углерода. Поэтому такие конечные продукты, как аммиак и мочевины, должны либо перерабатываться, либо накапливаться в организме в течение всей спячки. Во-вторых, потенциально вредны конечные продукты обеих групп, однако вредные концентрации их совершенно различны.

Эти проблемы были поставлены еще Х. Смитом в его работах, посвященных двоякодышащим рыбам, и он получил данные, по крайней мере частично объясняющие, что происходит во время летней спячки двоякодышащих рыб с азотсодержащими отходами. В соответствии с этими данными, впоследствии подтвержденными Янсенсом, у двоякодышащих рыб даже в активном состоянии в качестве конечных продуктов обмена аминокислот вырабатываются и аммиак, и мочевины. После перехода в спячку скорость образования аммиака резко падает (чего и следовало ожидать ввиду общего замедления метаболических процессов), тогда как образование мочевины, по-видимому, остается неизменным. Таким образом, отношение мочевины/аммиак увеличивается. Так как мочевины менее токсична, обычно полагали, что во время спячки она просто непрерывно накапливается. Однако такое объяснение, возможно, приемлемое для сравнительно коротких периодов, не годится в случае продолжительной спячки. При найденных скоростях образования мочевины ее концентрация в крови должна была бы возрасти за год примерно до 0,3 моль, за три года — до 1 моль, а за девять лет — на целых три моля! Поскольку этого не происходит, что-то в наших представлениях о судьбе конечных продуктов азотного обмена у двоякодышащих рыб, видимо, неверно. Можно заподозрить, что во время спячки они избегают отравления продуктами собствен-

ной жизнедеятельности, подвергая мочевины какой-то метаболической переработке, и что во всех предыдущих гипотезах нехватало предположения о ее вторичном использовании. В отношении двоякодышащих рыб этот вопрос остается открытым, однако он достаточно ясен в отношении летней и зимней спячки мелких грызунов, а также крупных млекопитающих.

### Зимняя спячка грызунов

Всем грызунам и другим мелким млекопитающим неизбежно свойственны две особенности: 1) высокая интенсивность метаболизма и 2) ограниченная способность запастись в организме источники энергии; при этом вторая особенность при недостаточном потреблении пищи может лимитировать первую. Эти метаболические проблемы, связанные с малыми размерами тела, максимально обостряются, когда к нехватке пищи и воды присоединяется холод, так как высокое отношение поверхности тела к объему приводит к большой потере тепла. Иными словами, быть маленьким хуже всего зимой.

Зимняя спячка — это изящная биохимическая адаптация, позволяющая мелким млекопитающим легко решить проблему зимнего дефицита энергии путем сильного понижения интенсивности метаболизма. У тринадцатиполосного суслика, которого нельзя считать нетипичным примером, обмен веществ во время спячки составляет  $1/52$  нормальной величины, а потеря воды через кожу и легкие —  $1/77$  (Deavers, Musacchia, 1980). Ванг (Wang, 1978) подсчитал, что в естественных зимних условиях суслик Ричардсона, залегая в спячку, экономит более 90% энергии, которая в противном случае была бы потрачена на поддержание обычного уровня метаболизма. Интересно, что эта экономия была бы еще больше, если бы не периодические пробуждения, во время которых восстанавливается нормальная температура тела. Расчеты Ванга для этого вида показывают, что за время спячки (при которой вес тела уменьшается наполовину) 90% расходуемой энергии связано с периодическими пробуждениями и согреванием организма. Эти пробуждения могут показаться расточительством, однако они, вероятно, играют важную физиологическую роль (например, в эти промежутки времени может происходить очистка организма от вредных продуктов обмена, таких как кетоновые тела, мочевина и т. п.). Кроме того, энергетические резервы у впадающих в спячку грызунов обычно сильно избыточны и редко (если вообще когда-либо) ограничивают продолжительность спячки. Например, многие грызуны, окончательно выйдя из спячки весной, еще по нескольку недель могут обходиться без пищи! Как достигаются такие поразительные возможности и как организован метаболизм мелких млекопитающих в период спячки?

### Приспособительные особенности питания перед зимней спячкой

Как уже отмечалось во введении, способные к спячке мелкие млекопитающие делятся на две категории — полностью голодающих в период спячки и потребляющих пищу при пробуждениях. Полностью голодающие осенью заранее нагоняют вес, откладывая обширные запасы жира. Животные, подкармливающиеся в период спячки, могут как накапливать заранее, так и не накапливать жир. Бурундук, перед тем как залечь в спячку, делает запасы корма в норе и при этом накапливает собственный жир в не меньшей мере, чем суслик. Запасы пищи могут служить в первую очередь для удовлетворения потребностей в белках, а не как источник энергии. Использование жировых отложений в качестве источника энергии сусликами в период спячки — факт, хорошо установленный; что касается минимальной потребности организма в белках в это время, то таких исследований нет. Однако полевые наблюдения показывают, что и суслики, и некоторые виды бурундуков определенно предпочитают рацион, богатый белком, причем это предпочтение особенно ярко выражено в период, предшествующий спячке (Riedesel, Steffen, 1980). Накопление жировых отложений осенью идет параллельно с питанием грибами, в которых много белка. Тот факт, что у садовой сони безбелковый рацион в любое время года вызывает оцепенение, ясно показывает, что белок может служить лимитирующим фактором в метаболизме животных, впадающих зимой в спячку.

### Зимняя спячка и голодание: сравнительные аспекты

Из сказанного выше ясно, что на наступление, продолжительность и успех зимней спячки могут влиять запасы как жиров, так и белков. Однако из этих двух источников энергии вклад жиров в энергетический метаболизм в период зимней спячки количественно намного больше. Так, например, у длиннохвостого суслика изменения массы тела за вычетом жира во время спячки показывают, что белки могут покрывать в этот период лишь около 10% энергетических затрат, остальную часть обеспечивают жиры. В то же время запасы гликогена в тканях поддерживаются на постоянном уровне (за счет глюконеогенеза из аминокислот). Таким образом, общая организация метаболизма сходна с тем, что наблюдается у человека при голодании.

Для сравнения полезно вспомнить, что у человека весом 70 кг запасы гликогена, мобилизуемых белков и жиров составляют в энергетическом выражении 1600, 24 000 и 135 000 ккал соответственно. Потребность в энергии составляет от 1600 до 6500 ккал

в сутки в зависимости от нагрузки. Следовательно, резервных жиров достаточно при голодании от одного до трех месяцев. При этом запасы углеводов могут быть исчерпаны в один день, так что глюконеогенез жизненно необходим для питания тех тканей и органов (мозг, эритроциты, некоторые клетки почек), которым абсолютно необходима глюкоза. При голодании человека эти потребности должны обеспечиваться в первую очередь. Проблема состоит в том, что предшественники глюкозы имеются в очень малых количествах, так как большая часть доступного углерода хранится в форме жира, а жир нельзя переработать в глюкозу, поскольку ацетилкофермент А не может превращаться в пируват. Глицерол нейтральных жиров может частично перерабатываться в глюкозу, но он доступен лишь в ограниченном количестве. Последний потенциальный источник глюкозы — это аминокислоты, образующиеся при расщеплении белков. Самым обширным источником аминокислот при голодании могут служить мышцы. Однако в природных условиях шансы на выживание часто зависят от подвижности животного, поэтому необходим какой-то компромисс между удовлетворением потребности в глюкозе и сохранением мышечных белков. При этом роль главного источника энергии для некоторых тканей переходит от глюкозы к кетоновым телам. Такое изменение метаболизма происходит через некоторое время после начала голодания (у человека — примерно на четвертый день), когда в печени уже образуются в избытке ацетоацетат и 3-гидроксипутират («кетоновые тела»). Синтез этих соединений из ацетил-СоА заметно возрастает, так как цикл Кребса не может окислять ацетил-СоА с той скоростью, с которой он образуется в процессе бета-окисления. Цикл Кребса и бета-окисление не уравнивают друг друга потому, что глюконеогенез ведет к нехватке оксалоацетата, необходимого для введения ацетил-СоА в цикл Кребса. В результате в печени образуются большие количества кетоновых тел, которые поступают оттуда в кровь и становятся таким образом доступными для мозга. У человека после трех дней голодания треть потребностей мозга в энергии удовлетворяется за счет кетоновых тел, при этом сердце тоже использует их в качестве источника энергии. Такое состояние, при котором кетоновые тела служат важным источником энергии, называется кетозом.

Роль кетоновых тел в метаболизме человека возрастает с длительностью голодания, так что через несколько недель они становятся главным источником энергии для мозга. *Эффективная переработка печенью жирных кислот в кетоновые тела и их использование мозгом значительно уменьшают потребность в глюкозе* (у человека суточная потребность снижается от 120 г в начале голодания до 40 г). При этом достигается четырех-

кратная экономия в расходовании белка на глюконеогенез (5 г вместо 20 г в сутки). В этом, в сущности, и состоит компромисс между удовлетворением потребности в глюкозе и сохранением мышечных белков.

Та же в общих чертах организация метаболизма используется, по-видимому, и мелкими млекопитающими в период зимней спячки. Однако степень кетоза при этом скорее всего тщательно контролируется. У сурков, например, кетоз развивается постепенно во время глубокой спячки, но только до тех пор, пока концентрация кетоновых тел в крови не достигает критического уровня. В этот момент животное пробуждается от спячки. У этого вида (ссылка на литературу см. Nelson, 1980) кетоз считается метаболическим триггером, вызывающим периодические пробуждения, при которых кровь очищается от кетоновых тел (в результате нормализации кровообращения и усиления окислительного метаболизма). Эти пробуждения способствуют также выведению конечных продуктов аминокислотного обмена, которые могут накапливаться в результате использования аминокислот как предшественников глюкозы.

#### **Роль аминокислот при зимней спячке мелких млекопитающих**

Хотя известно, что белки и аминокислоты служат в этом случае жизненно важными источниками углерода и энергии, прямых данных о скорости их оборота во время спячки нет. В тех случаях, когда измерялись концентрации аминокислот в плазме крови, оказалось, что они изменяются весьма умеренно. Так, например, у тринадцатиполосного суслика в период спячки увеличиваются лишь концентрации в плазме лейцина, аргинина и аланина; пулы остальных аминокислот остаются довольно постоянными.

Однако при пробуждении от спячки как концентрации свободных аминокислот в плазме крови, так и интенсивность их метаболизма значительно возрастают. Особенно обращает на себя внимание резкое повышение концентрации аланина. Кроме того, заметно ускоряется окисление аланина, так же как и переработка его в гликоген (глюкозу). Эти процессы вносят свой вклад в потери энергии при периодических пробуждениях, составляющие 90% общего расхода энергии в период зимней спячки. По-видимому, мелкие млекопитающие используют кратковременные периодические пробуждения для восстановления метаболического гомеостаза путем активации некоторых процессов (рис. 7-6). Хорошо известно, что углерод аланина либо окисляется, либо включается в глюкозу. Судьба аминного азота не столь ясна, поскольку одновременно может происходить ряд сложных процессов (изменение функции почек, цикл мочевины, расщепление мочевины уреазой).

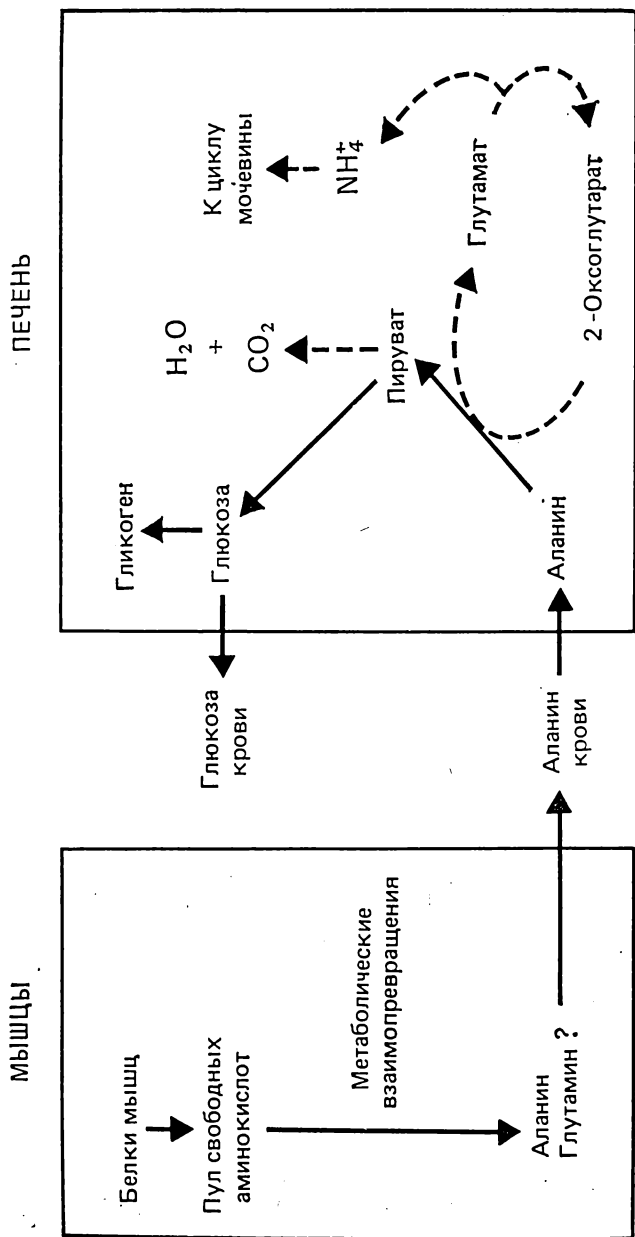


Рис. 7-6. Вероятные метаболические процессы в периоды кратковременного пробуждения у мелких млекопитающих во время зимней спячки. (Riedesel, Steffen, 1980.)



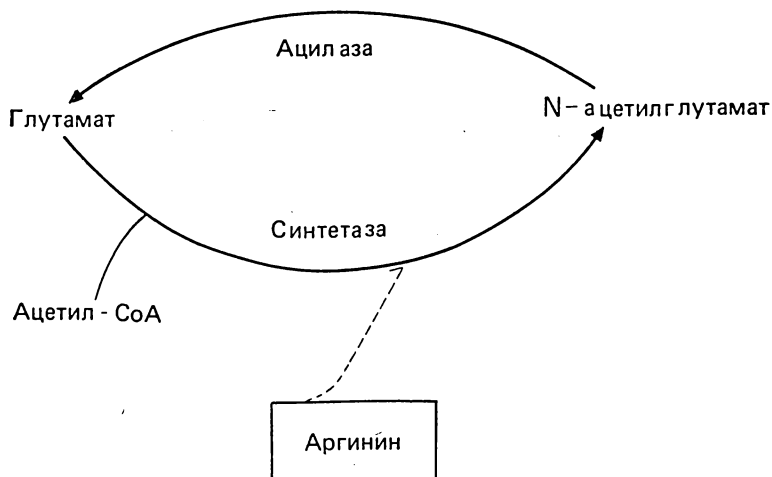
### Работа почек во время спячки

Поскольку в период зимней спячки животное представляет собой замкнутую систему, должны быть внутренние механизмы, которые обеспечивали бы в это время не только баланс углерода и энергии, но также и водный баланс. Интерес к этой проблеме (мы к ней еще вернемся) привел к детальному изучению функции почек у нескольких видов мелких млекопитающих, способных впадать в зимнюю спячку. Исследования показали (Deavers, Musacchia, 1980), что у сусликов работа почек во время спячки почти полностью прекращается (в результате снижения артериального давления и уменьшения относительного кровотока в почках); у сурков действуют те же механизмы, но в меньшей степени, так что почки продолжают работать, но с нагрузкой, составляющей всего 1% от нормальной. Если функция почек резко снижается или прекращается, а цикл мочевины продолжает действовать, то следовало бы ожидать повышения концентрации мочевины в тканях и в крови. Эти ожидания столь обоснованны, что к числу возможных причин периодического пробуждения от спячки часто относят 1) накопление в организме азотсодержащих отходов (в основном мочевины), 2) потенциальную возможность самоотравления и 3) возможное нарушение осмотического равновесия. Хотя в литературе имеются некоторые противоречия, вся совокупность данных позволяет заключить, что *концентрация мочевины в плазме крови и тканях в период спячки не обязательно возрастает (а иногда даже уменьшается!)*. Возможны две причины этого: либо цикл мочевины регулируется таким образом, что накопления мочевины не происходит, либо организм как-то освобождается от нее, но не с помощью почек. Рассмотрим подробно обе возможности.

### Механизмы регуляции цикла мочевины: роль ацетилглутамата

Как уже отмечалось в главе 2,  $\text{NH}_4^+$  поступает в цикл мочевины в результате образования карбамилфосфата под действием карбамилфосфатсинтетазы I (КФС-I). Этого фермента много в печени: в митохондриях из печени крысы он составляет 15—20% всего белка. Хорошо установлено, что КФС-I нуждается в активаторе, которым служит N-ацетилглутамат — продукт ацетилирования глутамата в присутствии ацетил-СоА; концентрация N-ацетилглутамата жестко определяется концентрацией глутамата. Известны еще три способа регуляции образования и количества N-ацетилглутамата: 1) активация ацетилглутаматсинтетазы аргинином по типу положительной обратной связи, 2) изменения в потреблении белка с пищей (см. ниже) и 3) гид-

ролиз ацетилглютаматацилазой (Sonoda et al., 1982). В связи с этим полагают, что возможен механизм быстрой регуляции цикла мочевины путем изменения уровня ацетилглютамата:



(Следует отметить, что существует и другая форма КФС, так называемая КФС-II, которая содержится, например, в селезенке млекопитающих. Она участвует только в биосинтезе пиримидинов, так как соответствующие ткани не способны к синтезу мочевины. Интересно, что КФС-II не активируется N-ацетилглютаматом. По-видимому, такой механизм активации выработался специально для того, чтобы регулировать поступление азота глютамата в цикл мочевины.)

### Роль орнитина в регуляции цикла мочевины

Другой способ регуляции цикла мочевины может быть связан с орнитином, поскольку легко показать, что орнитин «запускает» цикл мочевины. Хорошо установлено, что введение орнитина ускоряет синтез мочевины и таким образом понижает чувствительность к повышению концентрации  $\text{NH}_4^+$ . Аналогичная защита от токсического действия аммиака достигается введением других интермедиатов цикла мочевины, например аргинина. Аргинин, расщепляемый аргиназой на мочевину и орнитин, играет в этой ситуации роль, аналогичную избытку орнитина.

Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами исследований на перфузируемой печени крысы и на изолированных гепатоцитах, показавшими, что при физиологических concentra-

циях орнитина активность орнитин-карбамилтрансферазы лимитирует общую интенсивность цикла мочевины. Это ограничение, вероятно, обусловлено просто величиной  $K_M$  этого фермента, поскольку  $K_M$  для орнитина (около 0,4 мМ у фермента из печени крысы) превышает концентрацию орнитина в ткани (около 0,2 мкмоль/г). Для косубстрата — карбамилфосфата —  $K_M = 0,03$  мМ, но ввиду того, что вопрос о физиологических концентрациях этого метаболита остается спорным, неизвестно, играет ли это фермент-субстратное взаимодействие регуляторную роль. Поскольку по крайней мере в бычьей печени связывание орнитина зависит от предшествующего связывания карбамилфосфата, естественно предположить, что орнитин — важный, а возможно, и основной метаболит, управляющий циклом мочевины (Evered, 1981). По меньшей мере в отношении двух видов (ежа и суслика) известно, что концентрации орнитина и аргинина в плазме крови во время спячки увеличиваются и, как уже отмечалось выше, резко возрастают при периодических пробуждениях, как, впрочем, и концентрации других аминокислот (в особенности аланина). Все эти обстоятельства должны ускорять образование мочевины в период спячки, а поскольку накопления мочевины при этом обычно не наблюдается, нам нужно будет рассмотреть механизмы, ограничивающие активность цикла мочевины.

### Замедление цикла мочевины: выбор управляющего воздействия

Интересно, что помимо описанных выше быстрых механизмов регуляции цикла мочевины (при участии метаболитов, без прямого ингибирования) единственный иной способ регуляции каталитического потенциала этого цикла состоит в регуляции активности его ферментов. Соответствующие механизмы лучше всего изучены у амфибий и двоякодышащих рыб, у которых метаморфоз личинок и переход от активного образа жизни к летней спячке сопряжены с переходом от аммонотелии к уреотелии. Получено много данных в пользу того, что в регуляции ферментов цикла мочевины участвуют два события на разных уровнях функциональной иерархии (см. Hochachka, Somero, 1973):

1. Иницилирующим событием является, по-видимому, активация системы транскрипции. Хотя природа соответствующих специфических сигналов пока не ясна, здесь — по крайней мере у *Rana catesbeiana* — несомненно, участвуют гормональные факторы, в особенности гормоны щитовидной железы. У *Xenopus* роль важного внешнего сигнала играет недостаток воды, так как одни и те же изменения азотного обмена вызываются обезвоживанием и повышением осмотического давления окружающей водной среды. Исследования Янсенса указывают на то, что важным

метаболическим сигналом, активирующим синтез ферментов, служит повышение концентрации  $\text{NH}_4^+$  в тканях и крови. На раннем этапе метаморфоза резко возрастает активность РНК-полимеразы, что сопровождается образованием различных видов мРНК. Вероятно, они определяют синтез ферментов цикла мочевины. Повышение активности этих ферментов может быть очень значительным. Для одного из видов *Rana* отмечается, например, 10—20-кратное увеличение активности, а 6-кратное увеличение активности КФС-I наблюдается у *Xenopus* во время летней спячки. При спячке у двоякодышащих рыб происходит 5—10-кратное повышение активности аспартаттрансаминазы. Оценки скорости синтеза КФС-I de novo указывают на его значительное ускорение при метаморфозе у *Rana*. Многие наблюдения позволяют предполагать, что синтез ферментов цикла мочевины представляет собой единое координированное событие. Например, полностью или почти совпадают а) время активации РНК-полимеразы, б) время инициации синтеза отдельных ферментов, в) временной ход синтеза, г) степень повышения активности разных ферментов, д) дерепрессирющие сигналы для этих событий (гормоны щитовидной железы, концентрация  $\text{NH}_4^+$ , недостаток воды). Всего этого можно ожидать, если все ферменты кодируются тесно интегрированными участками генома.

2. Хотя все ферменты, участвующие в биосинтезе мочевины, очень сходно реагируют на соответствующие факторы, ряд данных указывает на то, что помимо регуляции синтеза ферментов существует и более тонкий уровень управления. Наиболее убедительные данные относятся к КФС-I. Биосинтез этого фермента, как и всех белков, происходит на рибосомах и контролируется мРНК. Этот процесс подвержен влиянию обычных ингибиторов как транскрипции, так и трансляции. Второй этап — эпигенетический — состоит в переносе неактивных субъединиц-предшественников в митохондрии, где происходит сборка из них активного олигомерного фермента. Этот второй этап тоже может активироваться гормоном щитовидной железы. Сходный процесс сборки описан несколько менее подробно для глутаматдегидрогеназы; возможно, что с процессом сборки связаны и изменения аргиназы при метаморфозе у амфибий. Весьма вероятно, что эпигенетический контроль осуществляется и при сборке других олигомерных ферментов цикла мочевины (Mori et al., 1982), а также при их транспортировке в надлежащие клеточные органеллы (два из этих ферментов действуют в митохондриях, остальные — в цитозоле). Поскольку конкретные механизмы эпигенетического контроля отдельных ферментов могут быть разными, наблюдаемые различия в повышении их активности при индукции не должны казаться неожиданными.

### Регуляция цикла мочевины у млекопитающих

У млекопитающих каталитический потенциал цикла мочевины, по-видимому, реализуется механизмом того же типа в общих чертах, что и у низших позвоночных. Хотя количественные изменения в активности ферментов не столь велики, как у двоякодышащих рыб и у амфибий, хорошо известно, что *у крыс суммарная активность ферментов цикла мочевины, а также N-ацетилглутаматсинтетазы в печени пропорциональна потреблению белков с пищей*. При резких изменениях содержания белка в рационе крыс соответствующие изменения в активности ферментов цикла мочевины завершались за время от 4 до 8 дней. Таким образом, в отличие от быстрых регуляторных воздействий с участием метаболитов это эффект «медленных» механизмов регуляции, связанных с изменением содержания соответствующих ферментных белков (Everd, 1981). Таким образом, *уменьшение потребления белков с пищей у млекопитающих может быть стимулом к уменьшению активности цикла мочевины*.

Возникает вопрос: могут ли такие медленно действующие механизмы предотвратить накопление мочевины при зимней спячке у млекопитающих? Для мелких животных, не потребляющих пищи при пробуждениях, это вполне вероятно (хотя потребность в белках может обеспечиваться путем усиленного использования эндогенных белковых резервов); эту возможность необходимо проверить в будущих исследованиях. Однако для тех животных, которые, периодически пробуждаясь, потребляют пищу, такая возможность кажется менее вероятной — отчасти потому, что порции белков продолжают при этом поступать в организм с частотой примерно раз в неделю. Если у этих видов действуют такие же регуляторные механизмы, как у крысы, то вполне можно было бы ожидать колебаний каталитического потенциала цикла мочевины, отстающих по фазе от периодов пробуждения (и подкармливания), однако эти колебания были бы, вероятно, менее заметными из-за гипотермии. Таким образом, нет оснований ожидать сколько-нибудь значительного и постоянного снижения уровня ферментов цикла мочевины в период спячки.

Итак, мы сталкиваемся здесь с интересной ситуацией: во время спячки у мелких млекопитающих функция почек полностью выключена или по крайней мере сильно подавлена, и в то же время нет никаких оснований ожидать существенного снижения концентраций ферментов цикла мочевины, а значит, и их каталитического потенциала. Между тем метаболическая обстановка при спячке больше способствует активности этих ферментов, чем при обычном состоянии животного (так, например, концентрации орнитина, аргинина и аланина часто бывают повышены, особенно в периоды пробуждения); следовательно, можно

думать, что образование мочевины в период спячки продолжается, хотя и более медленно из-за пониженной температуры тела.

Возникают два вопроса. Во-первых, каковы функции цикла мочевины при спячке — иными словами, почему он продолжает работать? Во-вторых, какие механизмы предотвращают постепенное накопление мочевины? Ответ на первый вопрос хотя и не полностью ясен, но, по-видимому, связан с регулированием концентрации  $\text{HCO}_3^-$  и величины pH. Что касается накопления мочевины, то его предотвращает вторичное включение этого продукта в метаболизм. Интересно, что эти два процесса, на первый взгляд совершенно различные, в действительности, как мы увидим, функционально связаны между собой.

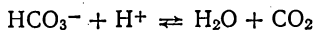
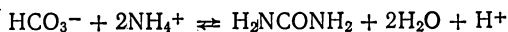
### Роль цикла мочевины в удалении метаболического бикарбоната

То, что мочевина служит «стоком» для отходов азотистого обмена, известно давно. Однако высказанное в работе Эткинсона и Камьена (Atkinson, Camien, 1982) предположение о том, что цикл мочевины может осуществлять еще одну биологически важную функцию, а именно удаление  $\text{HCO}_3^-$  путем протонирования, не получило широкого признания. Это могло быть обусловлено двумя причинами: во-первых, роль цикла мочевины как механизма переноса протонов на  $\text{HCO}_3^-$  не очевидна из уравнения синтеза мочевины; во-вторых, вообще значение метаболического образования  $\text{HCO}_3^-$  недооценивалось. Между тем окисление карбоксилат-анионов при физиологических значениях pH должно приводить к образованию ионов  $\text{HCO}_3^-$  (Atkinson, Camien, 1982). У большинства животных основным источником метаболического бикарбоната являются белки, так как при окислении простых аминокислот, содержащих группы  $-\text{COO}^-$  и  $-\text{NH}_3^+$ , примерно в эквимольных количествах образуются ионы  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{NH}_4^+$ . Кроме того,  $\text{HCO}_3^-$  может образовываться из карбоксильных и карбоксамидных групп боковых цепей аспартата, аспарагина, глутамата и глутамина, а также из солей метаболических кислот (у нежвачных травоядных) или из карбоксилат-анионов, служащих источниками энергии, ацетата и пропионата (у жвачных). В организме человека весом 70 кг ежедневно образуется около одного моля  $\text{HCO}_3^-$ , подлежащего выведению. Если бы такое количество  $\text{HCO}_3^-$  не было выведено, это привело бы к увеличению pH примерно до 8,0 (в предположении, что организм содержит 3,5 л плазмы крови и 10,5 л интерстициальной жидкости). Такое влияние одного моля  $\text{HCO}_3^-$  на pH может быть сведено до минимума действием буферов, однако важно помнить, что буферы защищают лишь от колебаний pH, но не могут противостоять непрерывному добавлению основания. Поэтому конечные продукты метаболизма должны

выводиться из организма животного примерно с той же скоростью, с какой они там образуются. Из различных возможных механизмов (выделение через легкие, почки и пищеварительный тракт) *протонирование*  $\text{HCO}_3^-$ , *приводящее к образованию*  $\text{CO}_2$ , и последующее удаление углекислого газа с выдыхаемым воздухом — способ особенно эффективный. Это, в частности, означает, что в организме человека таким образом ежедневно должно образовываться около одного моля протонов. У сусликов, у которых интенсивность окислительного метаболизма во время сна составляет лишь около  $1/50$  нормальной (Deavers, Musacchia, 1980), ежесуточно образуется около 0,6 ммоль  $\text{HCO}_3^-$ , однако во время периодических пробуждений интенсивность образования  $\text{HCO}_3^-$  составляет около 0,03 моль в сутки. Значит, в период сна приблизительно такой же должна быть скорость образования протонов. Откуда они берутся?

#### $\text{NH}_4^+$ как источник протонов для выведения бикарбоната

Поскольку  $\text{HCO}_3^-$  образуется примерно в эквимольном количестве с  $\text{NH}_4^+$ , сообразительный студент может сразу же подумать: а почему бы иону  $\text{NH}_4^+$  не быть непосредственным донором протонов, необходимых для превращения  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$ ? Но дело в том, что система  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{pK}_a = 6,1$ ) представляет собой кислоту в 1000 с лишним раз более сильную (в качестве донора протонов), чем  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{pK}_a = 9,25$ ). К сожалению, при аэробном метаболизме животных не образуется других подходящих доноров протонов, и поэтому возникает проблема переноса протонов с  $\text{NH}_4^+$  на  $\text{HCO}_3^-$  против довольно высокого термодинамического барьера. Мы уже сталкивались с подобными проблемами при изучении метаболизма и знаем, что они часто решаются в принципе одним и тем же способом — путем сопряжения процесса, идущего «в гору», с гидролизом АТФ. В данном случае таким механизмом служит цикл мочевины, в котором синтез 1 моль мочевины сопровождается выведением 2 моль  $\text{HCO}_3^-$ . Один ион  $\text{HCO}_3^-$  включается в молекулу мочевины, а второй просто протонируется с образованием  $\text{CO}_2$ :



Как мы видели в главе 2, при синтезе 1 моль мочевины в цикле мочевины потребляется 4 эквивалента АТФ, однако в аспекте кислотно-щелочной регуляции существенно то, что *при синтезе 1 моль мочевины происходит перенос 2 моль  $\text{H}^+$  с  $\text{NH}_4^+$  на  $\text{HCO}_3^-$* . Процесс в целом термодинамически очень выгоден, и по-

этому в нашем контексте цикл мочевины можно рассматривать как питаемый энергией АТФ протонный насос, переносящий протоны от  $\text{NH}_4^+$  на  $\text{HCO}_3^-$  через высокий энергетический барьер; одновременно при этом устраняются оба конечных продукта катаболизма белков. Поскольку белки и аминокислоты остаются во время спячки важным используемым субстратом, приведенные выше соображения хорошо объясняют, почему в этот период продолжает функционировать цикл мочевины.

Вернемся к вопросу о том, почему при спячке в организме не накапливается мочевина, хотя функция почек при этом почти полностью блокирована. На упоминавшемся уже примере суслика (Deavers, Musacchia, 1980) легко показать, что при ожидаемых скоростях образования  $\text{HCO}_3^-$  скорость накопления мочевины в цикле мочевины должна составлять до 1—2 мкмоль/г в сутки, т. е. около 7—14 мкмоль/г за неделю спячки. Таким образом, изменения концентрации мочевины в крови и тканях должны быть вполне заметными. Однако они часто не наблюдаются, и следует рассмотреть вопрос о причинах этого.

#### Вторичное использование мочевины у мелких животных при спячке

По крайней мере одна важная причина того, что мочевина во время спячки не накапливается, несмотря на продолжающийся катаболизм белков и аминокислот, состоит в том, что она используется в метаболических процессах. Это нетрудно продемонстрировать на сусликах, вводя им внутривенно мочевину в дозе 0,3 г на 100 г веса тела. Заметного повышения концентрации мочевины в плазме при этом не происходит. У крыс аналогичная нагрузка мочевиной вызывает трехкратное увеличение ее концентрации в плазме, и для восстановления гомеостаза по мочеvine требуется до 24 ч (рис. 7-7). Отсутствие накопления мочевины у суслика обусловлено не более эффективным ее выделением, а быстрым катаболизмом. У тринадцатиполосного суслика четырехдневное голодание в сочетании с одними сутками лишения воды приводило к 10-кратному ускорению катаболизма мочевины и 30-кратному *уменьшению* количества  $^{14}\text{C}$ -мочевины, выделяемой почками (Riedesel, Steffen, 1980). Эти эксперименты убедительно доказывают возможность катаболизма мочевины у сусликов и объясняют, почему во время спячки, во-первых, может не накапливаться мочевина, даже если цикл мочевины продолжает функционировать, и, во-вторых, количество накапливаемой или выделяемой мочевины далеко не соответствует количеству используемого белка. Для того чтобы оценить роль вторичного метаболизма мочевины, мы должны выяснить природу этого процесса.



### Во вторичном использовании мочевины участвуют симбиотические микроорганизмы

Рассматривая путь азота при вторичном использовании мочевины, мы должны вспомнить о том, что обычно ткани животных не содержат уреазы. По этой причине повторная переработка мочевины должна включать ключевые этапы, осуществляемые микроорганизмами пищеварительного тракта. Антибиотики, подавляющие кишечную флору, сильно снижают у сусликов скорость расщепления мочевины, меченной  $^{14}\text{C}$ . Вторичная переработка мочевины лучше всего изучена у жвачных животных, у которых путь этого вещества можно схематически представить следующим образом: печень  $\rightarrow$  кровь  $\rightarrow$  межклеточная жидкость  $\rightarrow$  слюнные железы  $\rightarrow$  слюна  $\rightarrow$  содержимое рубца. В рубце мочевина под действием уреазы гидролизуется на  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{NH}_4^+$ . Впоследствии  $\text{NH}_4^+$  включается в аминокислотный пул микроорганизмов, а затем в состав микробного белка, который в конечном счете переваривается в тонком кишечнике и усваивается животным (Schmidt-Nielsen, 1979).

Количественная роль повторного использования мочевины станет ясной, если мы вспомним, что примерно половина всей воды организма ежедневно проходит через слюнные железы и, следовательно, через рубец. Но каково значение подобного процесса у зимнеящих животных? Простой ответ может состоять в том, что, поскольку цикл мочевины нужен для предотвращения зашлачивания внутренней среды (накопления ионов  $\text{HCO}_3^-$ ), повторное использование мочевины служит простым и изящным способом, позволяющим свести к минимуму ее вредное воздействие в период спячки. Этот механизм может быть особенно важен при непрерывной длительной спячке без потребления пищи. Другая функция его может состоять в интеграции кислотно-щелочного баланса животного-хозяина и симбиотических микроорганизмов.

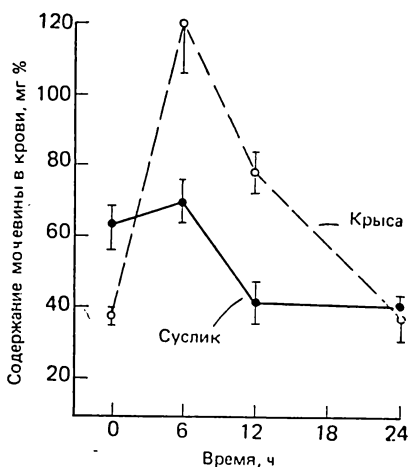


Рис. 7-7. Изменение концентрации мочевины в крови суслика (животного, впадающего в спячку) и лабораторной крысы после инъекции мочевины. (Riedesel, Steffen, 1980.)

### **Роль вторичного использования мочевины в кислотно-щелочной регуляции хозяина и симбионтов**

Эту концепцию можно проиллюстрировать, рассмотрев вопрос об образовании  $\text{HCO}_3^-$  у животных, потребляющих в основном растительную пищу (к которым относятся и зимнеспящие виды). У таких нежвачных травоядных возникают трудности, связанные с вынужденным потреблением больших количеств солей метаболических кислот. Поскольку из карбоксильных групп образуется равное число ионов  $\text{HCO}_3^-$ , количество  $\text{HCO}_3^-$ , подлежащих выведению, может превысить количество ионов  $\text{NH}_4^+$ . Для жвачных эта проблема еще острее, поскольку два типа карбоксильных анионов — ацетат и пропионат — составляют главный источник углерода и энергии. Можно ожидать, что у этих животных должно образовываться очень большое количество  $\text{HCO}_3^-$ , а в связи с этим и много мочевины. Так оно и есть, но поскольку мочевина подвергается вторичной переработке, сравнительно небольшая ее доля выводится с мочой. Таким образом, цикл мочевины выполняет свою роль в регуляции кислотно-щелочного баланса, не создавая затруднений из-за накопления больших количеств мочевины в тканях и выведения ее с мочой.

Вторичная переработка мочевины полезна не только для хозяина, но и для микроорганизмов пищеварительного тракта жвачных. Гидролиз мочевины приводит к образованию  $\text{HCO}_3^-$ , нейтрализующего кислые продукты брожения, которые могли бы вскоре полностью ингибировать метаболизм в рубце. Так как образование щелочи в тканях происходит примерно эквивалентно с образованием кислоты в рубце, вторичное использование мочевины поддерживает кислотно-щелочной гомеостаз и в тканях, и в рубце (Atkinson, Camien, 1982). У зимнеспящих животных точно определить стехиометрию нельзя, но изложенные общие соображения относятся и к ним.

### **Значение вторичной переработки мочевины для удержания воды в организме**

Другое преимущество вторичного использования мочевины может быть связано с водным балансом во время спячки. Эту мысль породили некоторые данные о переработке мочевины симбиотическими микроорганизмами: оказалось, что это явление, известное у ряда различных млекопитающих (овцы, козы и некоторые виды с неподразделенным желудком, в частности кролик и человек), особенно характерно для обитателей пустыни (например, верблюда), приспособленных к бедному белками корму и к недостатку воды. При таких условиях верблюд не выделяет или почти не выделяет мочевину с мочой, так как это

вещество подвергается интенсивной и эффективной переработке (Schmidt-Nielsen, 1979). Упомянутые выше данные о катаболизме мочевины у сусликов показывают, что очень сходные проблемы (недостатка воды и белка), возникающие в период спячки, могут решаться аналогичным способом. В обеих группах организмов *вторичная переработка* мочевины сохраняет для организма *воду, которая иначе потребовалась бы для выделения мочевины с мочой*. Оказывается, это лишь один из моментов, благодаря которым катаболизм белков и аминокислот способствует поддержанию водного гомеостаза в период спячки.

### Источники воды при спячке

Так как находящееся в спячке животное представляет собой практически замкнутую систему, не получающую воду извне, у него должны быть внутренние приспособления, позволяющие уравновесить непрерывную потерю воды. На серьезность этой проблемы указывает то, что потеря воды за весь период спячки составляет до одной четверти общей потери массы организма. Она могла бы быть еще больше, если бы не ряд механизмов, сводящих ее к минимуму. В количественном отношении наиболее важный из таких механизмов — это просто резкое снижение интенсивности метаболизма во время спячки и соответственное сокращение потери влаги путем испарения. Поза во время спячки тоже способствует этому: животное устраивается таким образом, чтобы повторно вдыхать влажный воздух и тем сокращать потерю воды. Вторичная переработка мочевины, как уже отмечалось, позволяет сохранить в организме воду, которая в противном случае выводилась бы через почки. Кроме того, значительный эффект дает использование в качестве метаболического «топлива» во время спячки не только жиров, но и мышечных белков. В последнем случае дело обстоит довольно сложно и требует более тщательного рассмотрения (Riedesel, Steffen, 1980).

Поскольку жир — в наибольшей степени восстановленный из субстратов, его полное окисление дает больше всего метаболической воды. Однако при мобилизации триацилглицеролов из жировой ткани выводится очень немного свободной воды, так как в резервном жире ее сравнительно мало. В отличие от этого в мышцах свободная вода составляет около 75% всей массы ткани, поэтому расщепление мышечных белков приводит к образованию большего количества воды на единицу полученной энергии, чем катаболизм жира. Если бы во время спячки использовались только жиры, то образующейся при этом метаболической воды едва хватало бы только для компенсации испарения. Водный баланс мог бы быть обеспечен лишь при отсут-

ствии каких-либо иных потерь воды (например, с фекалиями или мочой). С другой стороны, катаболизм одних лишь мышечных белков мог бы обеспечить организму положительный водный баланс. Фактически наблюдается смешанный катаболизм (с отношением между жирами и белками 9:1); при этом находящиеся в спячке мелкие грызуны сохраняют положительный водный баланс (получая 0,84 мл воды на 10 ккал метаболической энергии) со значительным резервом безопасности, что особенно важно при раннем пробуждении, когда интенсивность метаболизма и потери воды путем испарения должны одновременно резко возрастать.

### Спячка у крупных млекопитающих (медведей)

В метаболических и физиологических процессах при спячке у медведей и у мелких млекопитающих много общих черт (замедление ритма сердца и обмена веществ, использование жировых запасов и т. п.). Однако спячка медведей во многих отношениях представляет собой уникальный процесс, включающий столь же тонкие реакции на голодание, что и у других млекопитающих, способных или неспособных к зимней спячке. Медведь находится в состоянии спячки от трех до семи месяцев, сохраняя при этом температуру тела, близкую к нормальной (от 31 до 35 °C). Хотя интенсивность метаболизма во время спячки несколько понижена, она все же составляет 4000 ккал в сутки, судя по расходу жировых запасов. При этом медведь не ест, не пьет, не испражняется и не выделяет мочу. Он может довольно легко пробуждаться, переходить в активное состояние и тогда способен постоять за себя. Медведицы в таком состоянии производят на свет медвежат и выкармливают их (см. Nelson, 1980).

Хотя медведь на протяжении всей спячки полностью голодает, обычные конечные продукты белкового обмена в крови не накапливаются. Концентрации аминокислот, общего белка, мочевины и мочевой кислоты остаются неизменными на протяжении всей зимы, так же как объем крови, содержание в ней воды и гематокрит. Поскольку азотистые продукты метаболизма не накапливаются в крови и не выводятся в форме мочевины или в фекалиях, общая масса тела за вычетом жира остается у медведя (в отличие от мелких млекопитающих) относительно постоянной.

Однако у медведя, как и у мелких животных, запаса углеводов в организме недостаточно для поддержания длительной спячки, и в качестве источника энергии приходится использовать жиры. Поэтому Д. К. при исходном значении ~0,8 снижается к концу спячки до 0,6—0,7. Активная мобилизация жиров

проявляется также в высокой концентрации холестерина, триацилглицеролов, жирных кислот и фосфолипидов в крови. Когда Д. К. опускается ниже 0,71 (что соответствует сжиганию одних только жиров), это, возможно, означает, что происходит фиксация или задержка  $\text{CO}_2$ , вероятно сопровождающаяся некоторым ацидозом.

Наконец, поскольку жиры, по-видимому, служат единственным источником энергии, образующаяся при этом метаболическая вода должна быть единственным источником, возмещающим потерю воды при дыхании. Так как общее количество воды в организме, а также содержание ее в эритроцитах и плазме крови, объем крови и гематокрит остаются в пределах нормы, можно заключить, что метаболической воды для этого достаточно.

Ни одна из перечисленных особенностей не выражена в столь высокой степени у мелких млекопитающих, и важно понять, почему это так. Один из секретов такого «совершенства» медведей может заключаться в их крупных размерах, благодаря которым удельная интенсивность метаболизма невелика, а поэтому и проблема потери воды при дыхании не так серьезна. Но, как мы уже видели, у суслика водный баланс при спячке почти сохраняется за счет метаболической воды, получаемой при расщеплении жиров; значит, дело здесь не только в размерах животного. Сами по себе большие жировые запасы тоже не могут дать полного ответа на поставленный вопрос, так как и у медведя, и у мелких млекопитающих жира более чем достаточно для поддержания жизни на протяжении всей спячки. Самое важное преимущество медведя, вероятно, состоит в более тонкой регуляции белкового обмена, позволяющей поддерживать все необходимые метаболические функции так, чтобы не возникало проблемы белковой недостаточности (как это бывает у мелких животных).

### Белковый метаболизм медведя во время спячки

Как мы уже отмечали, рассматривая спячку мелких млекопитающих, освобождающиеся при расщеплении белков аминокислоты выполняют ряд ключевых метаболических функций (например, служат предшественниками глюкозы). Эти функции должны осуществляться и у медведя. Поэтому не удивительно, что белковый метаболизм во время спячки продолжается (и даже приобретает большее значение). Парадокс состоит в том, что при этом уменьшение общего количества белка в организме едва ощутимо. Эту проблему исследовали Нелсон и его коллеги; они выявили у находящегося в спячке медведя интересную особенность организации метаболизма, позволяющую найти реше-

ние этого парадокса. Суть дела в тесном взаимодействии между катаболизмом белков и жиров в период спячки. Катаболизм жиров, очевидно, удовлетворяет в основном потребность животного в энергии, а также в глицероле, скорость оборота которого возрастает при спячке в пять-шесть раз (тогда как общая интенсивность метаболизма резко падает). Важная роль этого глицерола (возможно, наиболее важная) состоит в том, что он затем превращается в глюкозу, хотя, как подчеркивает Нелсон (1980), углерод из молекул глицерола появляется также в аланине.

С другой стороны, ускоренный катаболизм белка, по-видимому, обеспечивает аминокислотами два главных процесса: необходимый остаточный глюконеогенез и биосинтез других белков. Энергию для обоих процессов доставляет окисление жиров. При такой организации метаболизма и глицерол, и аланин (или другие аминокислоты) служат потенциальными предшественниками глюкозы. Таким образом, наблюдаемое во время спячки превращение глицерола в глюкозу оказывается функционально очень важным, так как позволяет фактически сберегать аланин (или другие аминокислоты) и использовать его для процессов катаболизма или для биосинтеза белка. Из этих двух путей использования аминокислот при спячке биосинтетический путь активизируется, а окислительный — заметно ингибируется. В результате скорость включения аминокислот в белки во время спячки примерно втрое возрастает, тогда как скорость окисления и превращения в мочевины снижается.

Если такую метаболическую организацию довести до предела ее возможностей, то поток углерода из аминокислот в глюкозу и  $\text{CO}_2$ , с одной стороны, и поток азота из аминокислот в мочевины — с другой, будут полностью заблокированы. У спящего медведя дело до этого не доходит (возможно, просто потому, что аланин остается жизненно важным предшественником глюкозы — одного глицерола недостаточно для удовлетворения потребности в глюкозе и гликогене). Однако цена, которая платится за утечку азота аминокислот в мочевины, умеренна, так как азот мочевины может быть у спящего медведя использован вторично (микроорганизмы гидролизуют мочевины и включают образующийся  $\text{NH}_4^+$  в свои аминокислоты и белки). После переваривания микробов их аминокислоты поступают в те же метаболические пути, что и эндогенные аминокислоты; наиболее важным при этом является их включение в эндогенные белки (рис. 7-8).

Такая организация катаболизма жиров и белков позволяет организму медведя в состоянии спячки функционировать как относительно замкнутая система, осуществляющая с окружающей средой обмен лишь в отношении  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , воды и тепла. При этом внутренняя среда подвергается минимальным изменениям

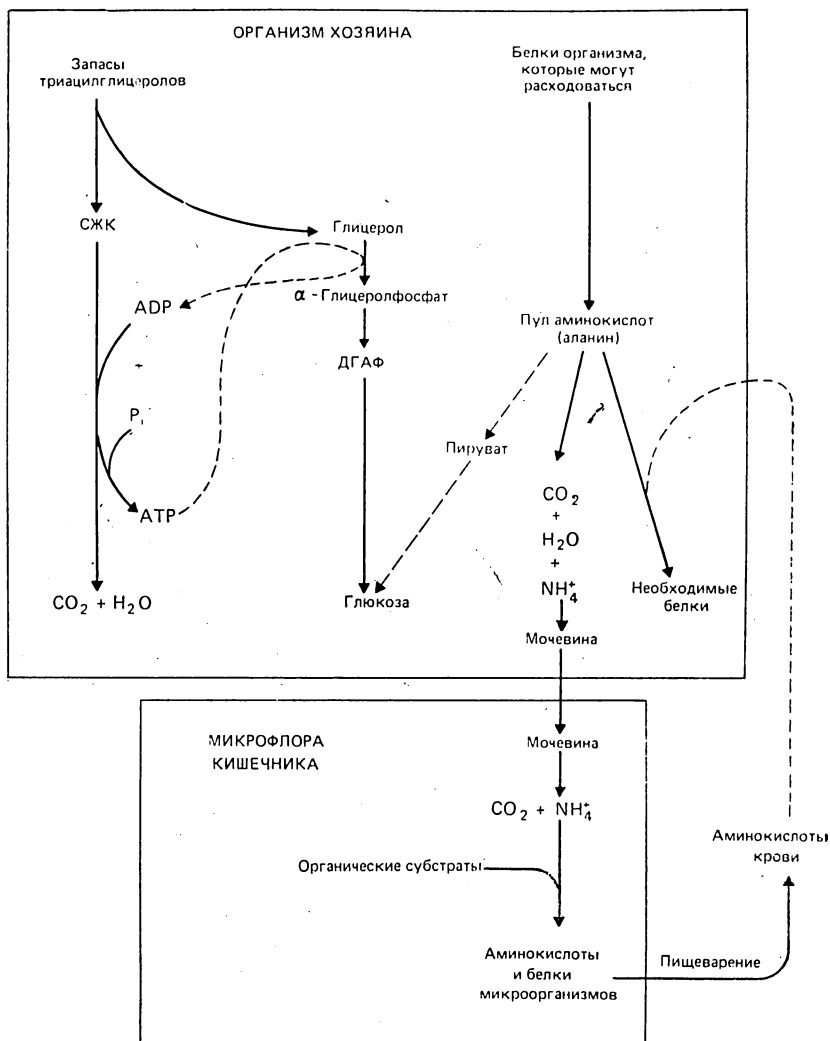


Рис. 7-8. Схема метаболизма медведя в период спячки. (По Nelson, 1980.)

(вредные продукты обмена, такие как мочевина и кетоновые тела, не накапливаются). Последний вопрос, который мы хотим рассмотреть, состоит в том, насколько хорошо такая метаболическая схема могла бы работать в экстремальном случае — если вся необходимая мозгу глюкоза образуется из глицерола. Если мы предположим, что используемый жир представляет собой триацилглицерол, содержащий 16-С-насыщенные жирные кисло-

ты, то полный гидролиз будет приводить к образованию примерно 387 моль АТФ на 1 моль триацилглицерола. Если весь глицерол, образующийся из этого триацилглицерола, будет превращаться в глюкозу (такой процесс требует лишь двух молей АТФ на моль образующейся глюкозы; оба моля нужны для работы глицеролкиназы и, конечно, легко могут быть получены при окислении жирных кислот), то эта глюкоза может использоваться для образования в мозгу АТФ из расчета 36 моль АТФ на 1 моль глюкозы. Это означает, что если мозг будет использовать как «топливо» исключительно глюкозу, получаемую из резервных триацилглицеролов, то он сможет поддерживать метаболизм, составляющий около 4,5% метаболизма всего тела при использовании им жиров. Достаточно ли этого? К сожалению, мы не можем уверенно дать положительный ответ, но, судя по данным для человека, это, вероятно, так. У человека в покое мозг потребляет около 20% поступающего в организм кислорода, но относительная масса и интенсивность метаболизма различных частей мозга сильно разнятся (Mink et al., 1981), и в настоящее время выявлена значительная гетерогенность уровней метаболизма в разных частях нашего мозга в зависимости от их активности (Phelps et al., 1981). У медведя объем мозга относительно меньше, и во время спячки он находится в коматозном состоянии. Значит, можно предполагать, что энергетические потребности мозга у медведя составляют меньшую долю от общего метаболизма, чем у бодрствующего человека.

### Контроль подавления метаболизма при спячке

Вопрос о механизмах, с помощью которых достигается сильное снижение интенсивности обмена, остается спорным. Выдвигаемые теории можно разделить на две группы: в одних предполагается подавление химическими факторами (такими, как рН или гормоны), а согласно другим, снижение метаболизма целиком обусловлено его прямой зависимостью от температуры тела (эффект  $Q_{10}$ ).

Важную роль, по-видимому, играют механизмы обоих типов, хотя в недавней работе на суслике *Citellus lateralis* (Snapp, Heller, 1981) было показано, что у этого вида замедление обмена веществ при спячке можно почти полностью объяснить эффектом  $Q_{10}$ . Сравнивая потребление кислорода животными в состоянии спячки (при температуре тела около 8°C) и животными, спящими обычным сном при нормальной температуре тела, Снэпп и Хеллер нашли, что замедление метаболизма при спячке соответствует коэффициенту  $Q_{10}$  около 2,5. Это типичное для метаболических процессов значение  $Q_{10}$ , и, следовательно, нет



необходимости привлекать для объяснения какие-либо дополнительные факторы, по крайней мере у данного вида.

Хотя эффекта  $Q_{10}$ , по-видимому, достаточно для понижения интенсивности метаболизма при спячке, однако для изменения относительной роли различных биохимических путей при переходе к спячке могут понадобиться дополнительные регуляторные факторы. Необходимо, например, подавить теплопродукцию, связанную с дрожью, и метаболизм бурой жировой ткани. Кроме того, поскольку при спячке основным «топливом» служат жиры, должен быть снижен катаболизм углеводов. Для решения таких регуляторных задач могут быть очень важны сдвиги рН. Мэлан (Malan, 1978) высказал мысль, что наблюдаемое при спячке относительное закисление жидкостей тела (крови, тканевой жидкости мышц и мозга, но не печени и сердца), вызываемое накоплением  $\text{CO}_2$ , может играть важную роль в подавлении метаболизма. Действительно, рН жидкостей тела у животных в состоянии спячки в среднем примерно на 0,3 единицы ниже, чем у активных эктотермных животных при той же температуре тела. Известно, что такая степень закисления достаточна для того, чтобы сильно замедлить метаболизм во многих биологических системах, в том числе в неактивированных яйцеклетках, в спорах бактерий и в цистах (обзор: Nuccitelli, Heiple, 1982). Как согласуется гипотеза Мэлана с общей схемой регуляции метаболизма при зимней спячке?

Ацидоз у животных в состоянии спячки может приводить к подавлению некоторых специфических типов метаболической активности. Низкие значения рН ингибируют активность бурой жировой ткани (Malan, 1978). Воздействие низких рН и низкой температуры на фосфофруктокиназу ведет к диссоциации активной тетрамерной формы фермента на неактивные димеры (Hand, Somero, 1982, 1983a). Ингибирование фосфофруктокиназы блокирует термогенез, связанный с дрожью, и уменьшает расходование запасов гликогена в мышцах. Во время спячки эти запасы должны сохраняться, чтобы обеспечить энергию для согревания посредством дрожи при пробуждении и для передвижения после перехода из спячки в нормальное состояние. Таким образом, если *общее* снижение метаболизма в спячке может быть обусловлено прямым влиянием температуры на ферменты, ответственные за потребление кислорода, то специфическое торможение отдельных процессов (потребления  $\text{O}_2$  бурой жировой тканью, термогенной дрожи, мышечного гликолиза), необходимое во время спячки, может осуществляться через посредство рН.

Один из важных аспектов регуляции рН — это быстрота изменения рН жидкостей тела при переходе в спячку и пробуждении. У зимнеящих млекопитающих вроде суслика изменения

концентраций  $\text{CO}_2$  в крови могут происходить довольно быстро в результате изменения вентиляции легких. В работе Снэппа и Хеллера четко показано, что дыхательный коэффициент (отношение образования  $\text{CO}_2$  к потреблению кислорода) при впадении в спячку очень низок, а на начальных стадиях пробуждения — чрезвычайно высок. Эти изменения Д. К. не обусловлены изменением субстрата, используемого в качестве «топлива», а отражают связывание (при впадении в спячку) и освобождение (при пробуждении) больших количеств  $\text{CO}_2$  кровью. Изменения рН жидкостей тела, происходящие за время от нескольких минут до одного-двух часов, могут поэтому приводить к довольно быстрой перестройке процессов, чувствительных к рН, таких как гликолиз в мышцах и окислительный метаболизм в бурой жировой ткани. С этой точки зрения интересно то, что реассоциация димеров фосфофруктокиназы в функциональные тетрамеры *in vivo* тоже происходит довольно быстро — для полной реактивации фермента требуется около часа (Hand, Somero, 1983a, см. также гл. 11).

В регуляции метаболизма во время спячки могут принимать участие и химические сигналы иной природы, отличные от рН. Например, из мозговой ткани находящихся в спячке животных экстрагируется гипометаболический пептид (Swan, Schatte, 1977). В управлении метаболической активностью, возможно, участвуют и короткие пептиды вроде эндорфинов: высказано предположение (Margules, 1979), что регуляция использования пищевых запасов может быть основана на антагонизме между бета-эндорфином и гипотетическим «эндолоксоном». Первый гормон способствует сбережению энергетических запасов, а второй — их расходованию. Равновесие между этими двумя антагонистами могло бы определять уставки («заданные значения») таких физиологических показателей, как вес тела, температура тела и частота дыхания. Однако в настоящее время еще не известно, какова роль подобных механизмов в управлении обменом веществ на различных этапах жизни зимне спящих животных.

## Адаптации, связанные с развитием, у млекопитающих

В процессе развития организмов используются почти все основные стратегии биохимической адаптации, рассмотренные в главе 1. Каждый, кому приходилось наблюдать за ростом и развитием животных или даже собственных детей от рождения до зрелого возраста, не мог не поражаться этим биохимическим адаптациям. Эти изменения начинаются с оплодотворения яйцеклетки или с деления зиготы и обычно происходят постепенно. Иногда, однако, в процессе развития совершаются резкие качественные перестройки. У млекопитающих трудно представить себе событие, более резко меняющее образ жизни и отношения с окружающей средой, чем акт рождения. С разрывом пуповины при родах новорожденный сразу и навсегда лишается постоянного источника пищи, кислорода и тепла, а также убежища и вынужден теперь сразу переходить к совершенно новому образу жизни. Такие внезапные переходы бывают, конечно, не только у млекопитающих; развитие насекомых часто включает не менее резкие перемены в образе жизни и отношениях с внешней средой (например, при переходе от личиночной стадии к куколке и от куколочки к имаго источники пищи, среда и жизненные стратегии могут меняться не в меньшей степени, чем они различаются у совершенно разных животных). Однако по понятным причинам биохимические проблемы, возникающие при таких резких перестройках в процессе развития, и механизмы, используемые при решении этих проблем, лучше всего изучать на млекопитающих (включая человека), поэтому мы сосредоточим свое внимание именно на этой группе, ограничиваясь главным образом метаболическими аспектами ситуации.

Поскольку развитие и созревание — процессы непрерывные и постепенные, условия жизни и потребности меняются также постепенно, однако у млекопитающих можно выделить несколько стадий развития, четко отличающихся друг от друга способами получения питательных веществ (Hahn, 1982).

*Стадия 1.* Зигота получает питательные вещества непосредственно из окружающей ткани, кровоснабжение через плаценту еще недостаточно развито.

*Стадия 2.* Плацента и система кровообращения уже хорошо развиты, система питания плода установилась, и все питательные вещества плод получает из крови; таким же образом удаляется большая часть отходов метаболизма.

*Стадия 3.* В раннем постнатальном периоде — периоде вскармливания — новорожденный питается молоком матери.

*Стадия 4.* Животное вступает в переходный период, когда оно еще продолжает подкармливаться молоком матери, но все больше и больше употребляет и другую пищу.

*Стадия 5.* Животное полностью перешло к самостоятельному питанию.

Эти процессы и этапы можно схематически представить в виде простой временной последовательности (рис. 8-1). Эта схема полезна, так как подчеркивает два фундаментальных вопроса. Во-первых, каково воздействие плода и новорожденного на мать и с помощью каких механизмов она адаптируется к этому воздействию? Во-вторых, с какими проблемами сталкивается организм на пренатальной и ранней постнатальной стадиях жизни? В основном в этой главе мы рассмотрим второй вопрос, однако время от времени будем также обращаться к первому.

Хотя известно, что изменения в материнском организме происходят уже на очень ранних стадиях развития плода, однако ни реальные метаболические потребности на самом раннем этапе (стадия 1), ни точные пути их удовлетворения как следует не изучены. Поэтому стадию 1 мы далее обсуждать не будем, хотя сейчас ее уже интенсивно исследуют. Напротив, в период, когда плацента и ее сосудистые системы — материнская и фетальная — уже хорошо развиты (стадия 2), система мать — плод более доступна для изучения, и здесь существует гораздо более точное представление о метаболических процессах. Как мы увидим, ключевым участком на этой стадии является во всех отношениях плацента, и именно с нее мы и начнем наш анализ.

### Стратегическое положение и роль плаценты

Прежде всего важно подчеркнуть, что плацента сама по себе служит у млекопитающих приспособлением, облегчающим внутриутробное развитие. Это не просто пассивный орган для прикрепления плода, а орган, играющий динамичную роль во взаимодействии метаболизма и физиологических процессов

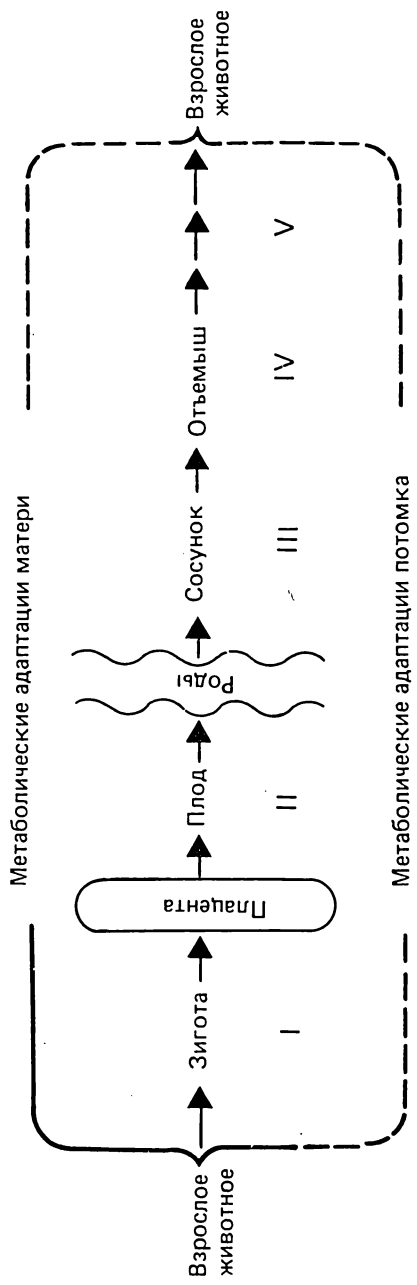


Рис. 8-1. Схема основных стадий развития млекопитающего.

двух организмов — матери и плода. Ключевые функции плаценты:

1) передача питательных веществ из кровеносной системы матери в систему плода;

2) выведение метаболических отходов плода в кровь матери;

3) модификация или приспособление (при посредстве гормонов) метаболизма матери к изменяющимся потребностям плода на разных стадиях беременности.

Иными словами, хотя строение плаценты у разных видов существенно различно, она всегда служит инструментом взаимодействия между матерью и плодом. В этой книге мы не сможем полностью рассмотреть все аспекты таких взаимодействий, но покажем их характер и дадим некоторое представление об их природе и значении на примере функции плацентарного лактогена (ПЛ). У всех до сих пор изученных видов этот гормон выделяется в кровеносную систему матери во второй половине беременности. Режим поступления гормона в кровь у разных видов различен, однако во всех случаях, в том числе и у человека, плацентарный лактоген на последней стадии беременности осуществляет три функции (рис. 8-2):

1) побуждает желтое тело яичника выделять прогестерон во второй половине беременности (при этом создается петля положительной обратной связи, приводящая к сохранению плаценты до тех пор, пока она нужна);

2) стимулирует рост молочных желез перед лактацией (форма преадаптации материнского метаболизма);

3) увеличивает ресурсы глюкозы, аминокислот и минеральных солей для плода, понижая чувствительность организма матери к ее собственному инсулину и таким образом облегчая переход этих метаболитов из ее тканей в кровь.

С биохимической точки зрения тканями-мишенями для плацентарного лактогена служат, конечно, материнские ткани, но с общебиологической точки зрения ткани-мишени — это также и ткани плода, поскольку конечным результатом действия гормона является удовлетворение нужд плода. Именно таким образом плацента в принципе служит инструментом воздействия плода на организм матери, и опять-таки через плаценту осуществляется и влияние матери на плод — в основном путем передачи питательных веществ из крови матери в кровь плода.

### Источники углерода и энергии для плода

Общепризнано, что главным источником энергии для эмбриона и плода млекопитающего служит глюкоза, поступающая из крови матери. Концентрация глюкозы в плазме материнской

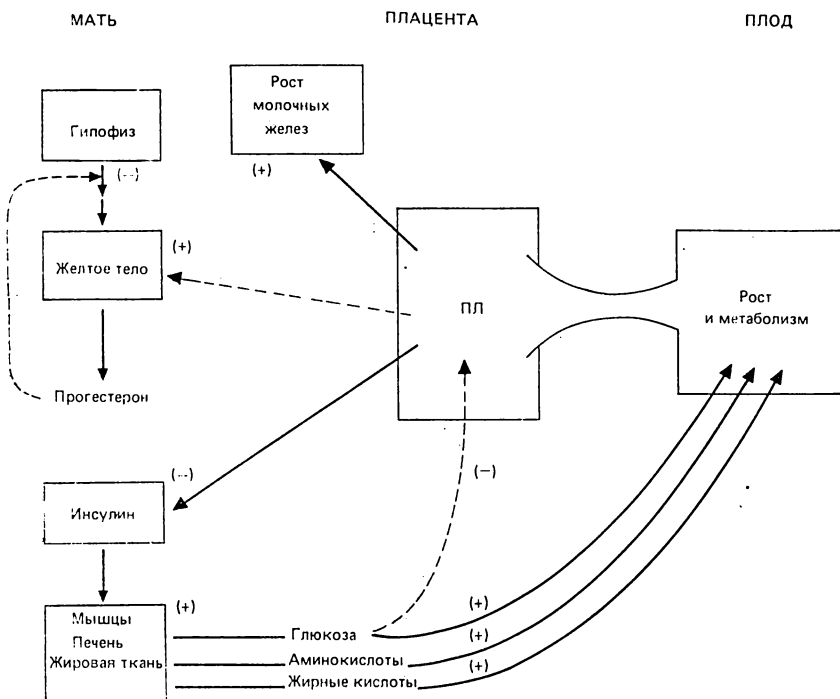


Рис. 8-2. Метаболические и физиологические функции плацентарного лактогена (ПЛ) у человека. Минус (в скобках) означает ингибирующее действие, плюс — стимулирующее действие. (По Милго, 1980, с изменениями.)

крови всегда значительно выше, чем в артериальной крови плода, поступающей в плаценту; таким образом, глюкоза всегда переходит от матери «вниз» по концентрационному градиенту в кровь плода (рис. 8-3, 8-4). Потребности матери в глюкозе во время беременности велики, и для их удовлетворения нужны специальные механизмы. В качестве примера можно указать, что у овцы на последних двух неделях беременности утечка глюкозы из материнской крови через плаценту составляет 0,3 ммоль в минуту. Эта высокая скорость выведения глюкозы составляет половину общей скорости оборота глюкозы в организме матери (рис. 8-4). Неудивительно, что суягные овцы, несмотря на ряд приспособлений к такой добавочной физиологической нагрузке, гораздо больше подвержены гипогликемии и кетозу, чем небеременные животные.

С другой стороны, удивительна пропорция, в которой глюкоза, поступающая из материнского организма, делится между плацентой и плодом. В рассмотренном выше случае плацента

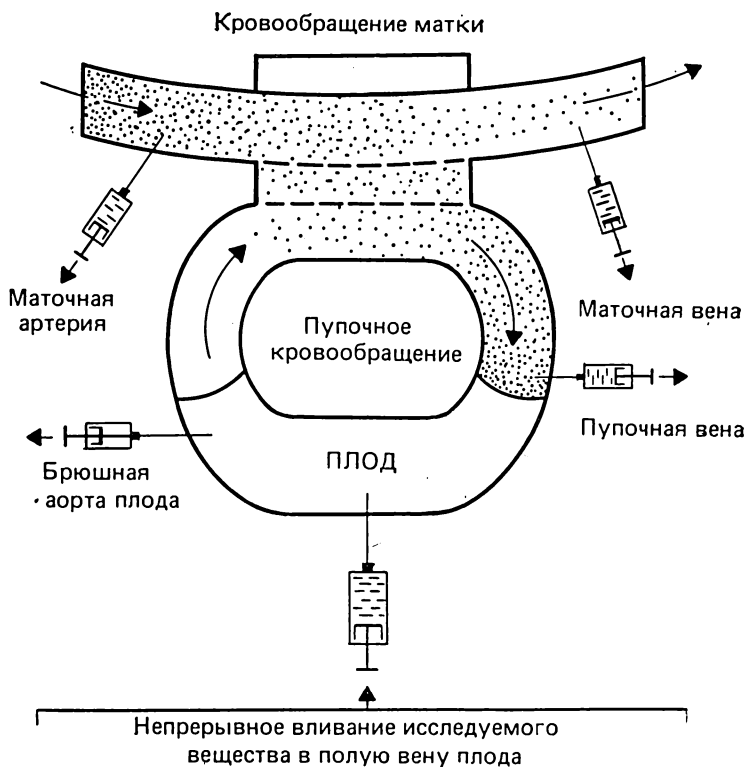


Рис. 8-3. Схема методологии, используемой при изучении внутриутробного метаболизма. На схеме показаны места, откуда берут пробы для определения концентраций метаболитов и куда производят инъекции при кинетических исследованиях. (Meschia et al., 1980.)

весом 1 кг питает плод весом 4,5 кг. Недавно были получены данные, неожиданно показавшие, что *на долю плода приходится лишь одна треть глюкозы, поступающей из крови матери в матку*. Остальное достается плаценте. Значит, плацента — орган, активно потребляющий глюкозу, но какова дальнейшая метаболическая судьба этой глюкозы?

По крайней мере у овец, а вероятно, и у других видов (Meschia et al., 1980) два важнейших конечных продукта катаболизма глюкозы в плаценте — это лактат и  $\text{CO}_2$ . Следовательно, глюкоза в плаценте в основном либо сбраживается до молочной кислоты (по пути анаэробного гликолиза), либо окисляется в цикле Кребса. Оценки для плода овцы указывают на то, что на образование лактата в результате плацентарного



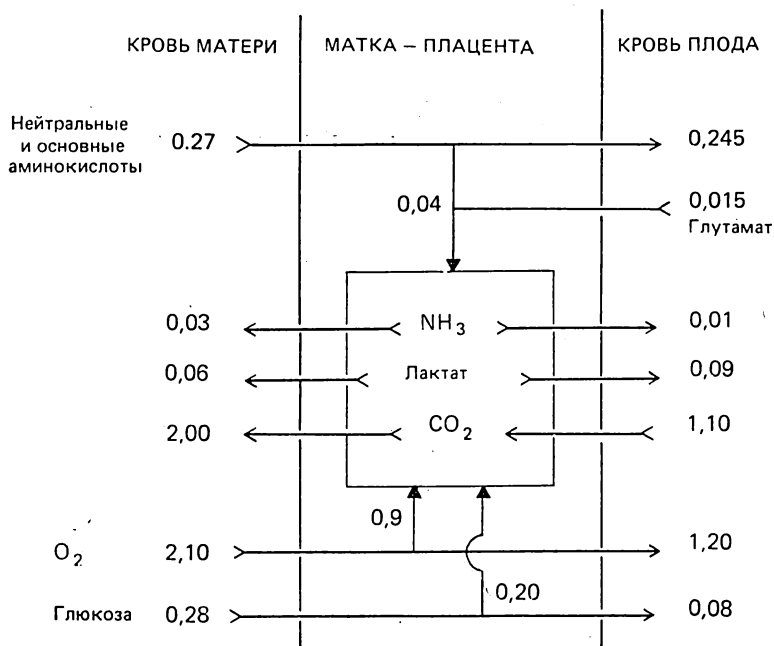


Рис. 8-4. Схема основных потоков субстратов через матку и плаценту овцы в последние две недели беременности. Потоки аминокислот выражены в миллиэквивалентах азота в 1 мин, все другие потоки — в миллимолях в 1 мин для плода весом 4 кг. (По Meschia et al., 1980.)

гликолиза расходуется около 40% глюкозы, поступающей из крови матери. При этом остается достаточно глюкозы для того, чтобы на ее окисление затрачивалось около 90% потребляемого плацентой кислорода. Образующийся лактат поступает либо обратно в кровеносную систему матери, либо в кровь плода. Вместе взятые, эти данные означают, что в результате деятельности плаценты энергетические потребности плода обеспечиваются не одним, а двумя главными субстратами — глюкозой и лактатом. Интересно, что два фермента, инициирующие катаболизм этих субстратов у плода, сами по себе подвергаются коренной перестройке в процессе развития.

### Изозимы гексокиназы в процессе развития организма

Первый этап метаболизма глюкозы во всех тканях состоит в ее превращении в глюкозо-6-фосфат. Эту реакцию катализируют гексокиназы. Было показано, что у большинства млекопитающих (и даже позвоночных вообще) может быть по не-

сколько изозимных форм гексокиназы (Katzen, Soderman, 1975). Изозимы А, В и С представляют собой так называемые формы с низкой  $K_M$ , тогда как гексокиназа D — это вариант с высокой  $K_M$ , который часто называют также глюкокиназой. Полуколичественные данные об изменениях этих изозимов в ходе онтогенеза впервые были получены около 15 лет назад, а количественные — значительно позднее. При этом было, например, показано, что в печени плода крысы преобладает изозим А, и максимум его активности отмечается незадолго до рождения. Активность изозима В растет, достигая максимума через несколько дней после рождения. Изозим С, почти отсутствующий до рождения, достигает пика активности на второй неделе жизни, а затем по прошествии примерно десяти дней его количество резко падает. Изозим D — глюкокиназа с высокой  $K_M$  — практически отсутствует до рождения и не появляется в течение первых двух недель жизни.

Нетрудно объяснить, почему плод использует лишь изозимы с низкой  $K_M$ : на этой стадии развития концентрация глюкозы в крови редко претерпевает резкие колебания и в крови воротной вены никогда не достигает высоких уровней, характерных для взрослых млекопитающих (кишечник у плода бездействует, и глюкоза не попадает в организм через рот). Однако причина смены форм А, В и С неясна, поскольку все они в кинетическом отношении гораздо более сходны между собой, чем каждый из них с глюкокиназой. Одно из возможных объяснений связано с их локализацией в клетке. Существует много данных в пользу того, что активность гексокиназы *in vivo* частично контролируется путем регуляции равновесия между ее свободной и связанной формами (Wilson, 1980). Несколько различаются не только кинетические свойства гексокиназ, но и их способность к связыванию, и именно эти особенности, возможно, определяют, на какой стадии онтогенеза та или иная форма фермента наиболее предпочтительна.

### Изозимы лактатдегидрогеназы в процессе развития

Эмбрионы всех млекопитающих проходят стадию развития, когда митохондрий мало и они незрелые. В связи с этим, а также, возможно, из-за относительно низкого содержания  $O_2$  в окружающей среде велика роль анаэробного гликолиза. У мышей, о которых существуют подробные данные, во всех эмбриональных тканях на ранних стадиях развития основной формой лактатдегидрогеназы (ЛДГ) является ЛДГ-5. В процессе эмбрионального развития это положение несколько меняется, однако примечательно, как долго оно сохраняется: окончательное распределение изозимов ЛДГ устанавливается лишь

через некоторое время после рождения (см. ниже). Поскольку форма ЛДГ-5 кинетически лучше всего приспособлена для пироватредуктазной функции в анаэробном гликолизе, ее широкая распространенность в тканях эмбриона и плода очень хорошо согласуется с общеизвестной толерантностью плода и новорожденного к аноксии. Однако это еще не все; наиболее важная основа этой толерантности — доступность эндогенного

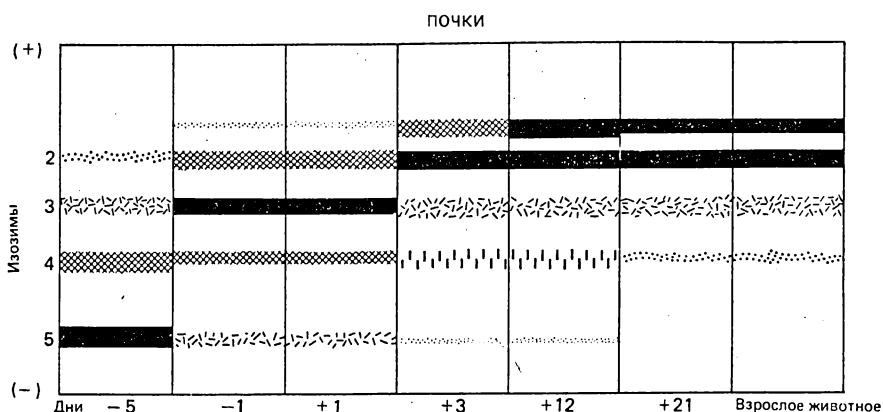


Рис. 8-5. Схема изменений изотимического спектра лактатдегидрогеназы в почках мыши в процессе развития. (По Markert, 1963, с изменениями.)

субстрата. Во многих, а может быть, и во всех тканях плода в процессе развития постепенно создаются запасы гликогена, обычно достигающие максимальных размеров к концу беременности или к родам. Время, в течение которого организм может обходиться без кислорода, определяется, по-видимому, запасами гликогена в сердце и постоянным притоком глюкозы с кровью. Как мы уже видели, это сочетание (*достаточная обеспеченность субстратом, эффективное кровообращение и кинетически адекватный ферментный аппарат*) используется, и притом весьма успешно, также и в других случаях недостатка кислорода. Например, сердце плода морской свинки в условиях аноксии способно поддерживать энергетический метаболизм на уровне почти 50% от нормы, тогда как в сердце взрослого животного максимальная интенсивность анаэробного гликолиза может обеспечить оборот АТФ лишь на уровне 15% от нормы (Rolph, Jones, 1981).

Постепенное уменьшение зависимости плода от анаэробного гликолиза изящно иллюстрирует меняющаяся картина изотимов ЛДГ в ходе созревания ферментного аппарата. В процессе развития происходит мало-помалу вытеснение одних изоти-

мов другими, так что ферментативная активность постепенно смещается к тому концу спектра, где находится ЛДГ-1. Степень происходящих изменений очень различна в разных тканях. В сердце, например, в период развития ферментативная активность постепенно смещается от ЛДГ-5 к ЛДГ-1. В сердце взрослого животного почти всю активность обеспечивают изоимы ЛДГ-1 и ЛДГ-2, а изоима ЛДГ-5 практически не остается. В других тканях происходят изменения промежуточного масштаба от эмбрионального преобладания ЛДГ-5 в сторону увеличения количества ЛДГ-1, характерного для тканей взрослого животного (рис. 8-5).

### **Значение изменений спектра изоимов ЛДГ в процессе развития: выбор между двумя субстратами**

Рассматривая смысл описанных выше изменений в картине изоимов ЛДГ, происходящих в процессе онтогенеза, важно помнить, что кинетические свойства «сердечных» изоимов как в отношении прямой реакции, так и в отношении обратной лучше подходят для работы в аэробных метаболических условиях. Когда данные об изоимах и о метаболизме рассматриваются совместно, вырисовывается интересная картина: плод по мере созревания становится все более и более способным использовать лактат в качестве субстрата для окисления (так как фермент ЛДГ-1 хорошо приспособлен для лактатоксидазной функции), и вместе с тем по мере приближения к концу беременности все возрастает поступление лактата в кровь плода. У взрослых животных, как известно, молочная кислота может служить превосходным субстратом для окислительного метаболизма во многих тканях (сердце, мышечная ткань, почки и др.), для большинства из которых характерно обилие субъединиц ЛДГ сердечного типа; поэтому такие изменения в процессе развития плода не кажутся удивительными. Однако в чем состоит выигрыш (если он имеется) от наблюдаемого изменения спектра изоимов ЛДГ при, казалось бы, вполне достаточных ресурсах глюкозы? Можно думать, что существуют три очень веские причины развития у плода способности окислять лактат. Во-первых, это дает возможность сохранять содержащуюся в лактате энергию, а не возвращать ее назад в организм матери. Во-вторых, в некоторых тканях взрослого животного (например, в сердце) за счет окисления лактата можно поддерживать более высокую интенсивность метаболизма, чем при окислении глюкозы. Это преимущество может быть существенным для некоторых тканей плода в позднем периоде беременности. Но помимо этих очевидных причин полезности высокой лактатоксидазной функции гораздо важнее

то, что она позволяет плоду самому освобождаться от молочной кислоты (эндогенной или поступающей извне) без необходимости транспортировать ее в кровеносную систему матери или допускать необычные отклонения рН крови и внутриклеточной жидкости. Какая-то комбинация этих причин, возможно, приводит к тому, что в конце беременности глюкоза, поступающая из крови матери, перестает быть единственным источником энергии для плода: энергично используется также и лактат, получаемый от плаценты. Такой «двухсубстратный» рацион способен удовлетворить почти все энергетические потребности плода, так что остается лишь вопрос о других потенциальных субстратах. Какова роль свободных жирных кислот и свободных аминокислот, значение которых для метаболизма взрослых особей общеизвестно? Рассмотрим эти группы субстратов последовательно.

### Окисление жирных кислот в период развития

Поскольку рацион плода содержит много углеводов, не удивительно, что скорость окисления жирных кислот мала и в некоторых случаях приближается к нулю. У крысы, например, существует несколько факторов, ограничивающих использование плодом жирных кислот (Hahn, 1982): 1) в клетках плода довольно мало митохондрий, что само по себе снижает окислительную способность тканей; 2) невелико также содержание карнитина в тканях; 3) каталитический потенциал карнитин-трансфераз тоже низок, и 4) низка скорость перехода жирных кислот из материнской кровеносной системы в кровоток плода. Однако ситуация с плодом крысы, возможно, представляет собой крайний случай. Транспортировка жирных кислот через плаценту у человека, обезьян и морской свинки происходит много быстрее, чем у крысы. В этих случаях, когда новорожденный появляется на свет уже в относительно зрелом состоянии, изменение в сторону метаболической организации взрослого типа заходит к моменту родов дальше, чем у крысы.

В периферических тканях главными конечными продуктами окисления жирных кислот являются  $\text{CO}_2$  и вода; в печени ими могут быть кетоновые тела. Интересно, что скорость образования эндогенных кетоновых тел в зародышах млекопитающих обычно низка. В гомогенате печени плода крысы, например, может образовываться около 2 мкмоль кетоновых тел на 1 г в час (при 20 мкмоль в аналогичном препарате из печени взрослого животного).

Хотя накопление кетоновых тел происходит медленно, скорость их метаболизма может достигать довольно высоких значений. В отличие от жирных кислот, переносимых у большин-

ства (если не у всех) млекопитающих через плаценту сравнительно медленно, кетоновые тела, по-видимому, переходят от матери к плоду намного легче. (У овец, у которых этот процесс происходить не может, место кетоновых тел, как полагают, занимает ацетат.) При голодании матери или если мать больна диабетом, концентрация кетоновых тел в крови поднимается много выше, чем у небеременных особей; в результате больше их поступает и в кровь плода, и они, по-видимому, быстро используются либо как субстраты для окислительного метаболизма, либо как предшественники в синтезе фосфолипидов и в других процессах, связанных с ростом. При таких условиях, когда источники глюкозы, вероятно, ограничены, очевидны функциональные преимущества этих возможностей метаболизма: кетоновые тела, поступающие из крови матери, либо частично заменяют глюкозу в качестве субстрата (тем самым сберегая ее для тканей и процессов, в которых она особенно необходима), либо полностью заменяют ее в критической ситуации — при гипогликемии у матери. Не исключено, что возможности использования кетоновых тел коррелируют с образом жизни матери, в частности с вероятностью голодания матери во время беременности как характерной видовой особенностью (см., например, гл. 8, раздел о спячке медведей).

### Метаболизм аминокислот в период внутриутробного развития

Хотя главным источником энергии при внутриутробном развитии вполне могут быть углеводы, поскольку они необходимы для роста, однако наиболее активно поглощаются плодом из крови матери аминокислоты. Перенос аминокислот при этом происходит против концентрационного градиента, так как концентрация свободных аминокислот в крови плода обычно значительно выше, чем в крови матери. Детальный механизм активного переноса аминокислот через плаценту еще не полностью изучен, но общие особенности транспорта различных групп аминокислот и роль плаценты в этом процессе уже проясняются. Результаты исследований (см. рис. 8-4) показывают, что у овцы на последнем месяце беременности *нейтральные и основные аминокислоты поступают в плаценту из кровеносной системы матери; с другой стороны, небольшие количества глутамата и мочевины в качестве отходов азотистого обмена поступают в плаценту из крови плода*. Оценки распределения аминокислот как метаболических субстратов между плацентой и плодом показывают, что аминокислоты (в отличие от глюкозы — см. выше) в основном используются тканями плода.

После того как аминокислоты поступили в плод, их метаболизм может идти в трех главных направлениях: 1) включе-

ние в новые белки, синтезируемые в процессе роста плода; 2) дезаминирование, предшествующее глюконеогенезу; 3) дезаминирование с последующим полным окислением. Из этих трех путей количественно, конечно, преобладает первый, что неудивительно, поскольку рост — это наиболее важный гомеостатический механизм плода. Измерения содержания аммиака четко показывают, что лишь немногим больше 10% азота, поступившего в плод в аминной форме, возвращаются в кровоток матери и плода в виде аммиака (Meschia et al., 1980). Скорость образования мочевины и ее выделения тоже невелика. С этой картиной согласуется и то, что в печени плода активность ферментов цикла мочевины невысока, хотя они там имеются. Особый интерес представляет активность карбамилфосфат-синтетазы (КФС), поскольку этот фермент встречается в двух изоформных формах: КФС-I катализирует образование карбамилфосфата для цикла мочевины, а КФС-II — для синтеза пиримидинов. Активность первого фермента в печени плода незначительна, а второго — весьма высока в соответствии с высокими требованиями, предъявляемыми в это время к механизмам биосинтеза.

### Глюконеогенез в период внутриутробного развития

Учитывая, что аминокислот — предшественников для глюконеогенеза — в крови плода вполне достаточно, интересно отметить, что глюконеогенез в печени плода идет весьма вяло. Причина состоит в том, что у млекопитающих, за исключением жвачных, активность соответствующих ферментов в печени плода очень низка (были исследованы пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксикиназа, фруктозобисфосфатаза и глюкозо-6-фосфатаза). С точки зрения питания это вполне понятно, так как плод обычно получает глюкозу извне как основной источник энергии для организма. Однако в необычных условиях стресса плод может быть вынужден использовать собственную глюкозу, и поэтому важно знать, в какой степени плод может приспособиться к недостатку глюкозы. Оказалось — в очень небольшой степени!

После четырех дней голодания матери концентрация глюкозы в крови плода понижается почти вдвое (так как падает концентрация глюкозы в материнской крови). Однако плод при этом не мобилизует запасы гликогена в печени! Хотя плод и способен увеличивать скорость глюконеогенеза, это происходит еще в меньшей степени, чем у новорожденного. По крайней мере отчасти это связано с ферментным аппаратом: при голодании плода активность ФЕП-карбоксикиназы увеличивается лишь в 5 раз, тогда как у новорожденного она может возра-

тать стократно! Точно так же голодание ведет лишь к умеренному снижению уровня инсулина в крови плода — с одновременным повышением уровня глюкагона. Эти изменения, вызывающие у новорожденных и взрослых животных активацию глюконеогенеза, происходят в нужном направлении, но у плода они недостаточны и малы по сравнению с происходящими при аналогичном стрессе на более поздних этапах развития (Hahn, 1982). Эти исследования показывают, насколько плод беспомощен по сравнению с новорожденными и взрослыми, способными регулировать скорость глюконеогенеза в условиях голодания. С другой же стороны, этим подчеркивается важность использования плодом совсем иной адаптивной стратегии: вместо того чтобы компенсировать недостаток глюкозы путем глюконеогенеза, *плод сберегает глюкозу, переключаясь на другие субстраты (кетонные тела), доставка которых из крови матери соответственно увеличивается*. Используя в условиях такого стресса кетонные тела, плод получает сразу две выгоды: во-первых, сводится до минимума потребность в глюкозе для окислительного метаболизма; во-вторых, поскольку кетонные тела, так же как и глюкоза, могут быть использованы в синтезе липидов, это дает возможность откладывать жировые запасы в период, когда мать голодает. И в самом деле, липогенез у плода — процесс очень важный, так как требуется создать резервы, достаточные для организма в ранний постнатальный период, когда он может оказаться без пищи и, кроме того, нуждаться в значительных затратах энергии на термогенез. Поэтому важно рассмотреть процесс образования жировых запасов в нормальных условиях.

### Липогенез в период внутриутробного развития

Теоретически для плода существует два возможных способа синтеза липидов: либо использовать жирные кислоты, непосредственно получаемые из крови матери, либо синтезировать липиды из эндогенных метаболитов-предшественников. Из этих двух способов первый количественно менее существен. Даже если жирные кислоты могут переходить и действительно переходят из крови матери в кровь плода, то все равно скорость этого процесса недостаточна для того, чтобы полностью обеспечить необходимое накопление липидов (хотя получаемые таким образом жирные кислоты могут быть использованы как при создании жировых депо, так и при синтезе фосфолипидов и мембран). Ограничение транспорта означает, что поступление в плод жира извне невелико, и в результате фактически *плод оказывается на рационе, содержащем много углеводов, много белков (аминокислот) и мало жира*. У взрослых живот-



ных при таком рационе увеличивается скорость липогенеза; так же обстоит дело и у плода. Поэтому активность главных ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот (фермента, расщепляющего лимонную кислоту, ацетил-СоА-карбоксилазы и синтетазы жирных кислот) в двух тщательно исследованных тканях крысы — печени и буром жире, — выше у плода, чем у новорожденного животного. Относительные доли глюкозы и молочной кислоты (двух поступающих в плод углеводных субстратов), используемые для окисления и для липогенеза, неизвестны. Однако, для того чтобы создать жировые запасы, достаточные для поддержания жизни в первые наиболее трудные часы (а иногда и дни) после рождения, на второй процесс должна расходоваться значительная доля обоих предшественников.

### Адаптация материнского организма к беременности

Поскольку рост и развитие плода зависят от поступления углерода и источников энергии из кровеносной системы матери, неудивительно, что адаптивные механизмы матери в период беременности в основном направлены на то, чтобы обеспечить плод достаточным количеством  $O_2$  и питательных веществ. Это достигается в результате тщательно согласованного набора метаболических приспособлений, приуроченных к различным стадиям беременности в соответствии с нуждами плода (Rosso, Сгапоу, 1982). На ранних стадиях (в так называемый материнский период, когда предъявляемые плодом требования еще не очень велики) организм матери готовится к грядущим потребностям плода. Этот период можно назвать анаболической фазой беременности, так как для него характерны увеличение массы тела, значительное увеличение объема крови и накопление белковых и жировых запасов. На накопление жира указывают, во-первых, усиленное питание матери и, во-вторых, возросший синтез жиров из глюкозы в периферической жировой ткани. Последний процесс стимулируется характерной для этого периода высокой концентрацией инсулина в крови. В это же время происходит рост молочных желез, хотя понадобятся они позже.

В катаболическую фазу организм матери вступает к середине или к последней трети беременности, когда потребности плода в питательных веществах и кислороде достигают максимума и в связи с этим концентрация глюкозы в крови матери постепенно убывает. Материнский организм может использовать ряд различных способов адаптации. Плод выкачивает из матери все больше и больше углеводов, и распределение глюкозы между различными органами и тканями должно меняться

таким образом, чтобы все бо́льшая доля доставалась мозгу. Другие ткани и органы (сердце, мышцы, печень) могут быть вынуждены частично переключиться на другие субстраты, в особенности на жиры (либо эндогенные, из собственной жировой ткани, либо получаемые с пищей). Некоторые органы, например сердце, способны использовать лактат, периодически поступающий в кровь матери от плода.

Хотя многие детали этих метаболических адаптаций материнского организма еще недостаточно исследованы, хорошо известно (особенно в отношении человека), что концентрация глюкозы в крови на протяжении беременности убывает, причем заметнее всего — в катаболической фазе (Rosso, Sgamoу, 1982). Поскольку обратное тормозящее действие глюкозы на глюконеогенез ослаблено и концентрации глюкокортикоидов высоки, создаются условия для усиленного новообразования глюкозы (из экзогенных и эндогенных предшественников), которые должны способствовать гомеостазу по глюкозе в материнском организме. Однако глюконеогенез оказывается все же недостаточным, и регуляция постепенно перестраивается на все более и более низкий уровень глюкозы в крови. Таким образом, на этой стадии беременности зависимость материнского организма от глюкозы должна быть сведена к минимуму, чему способствует и уменьшение чувствительности клеток к инсулину. В этом состоит одна из важных причин мобилизации жиров путем гидролиза триацилглицеролов в жировой ткани и повышения концентрации жирных кислот в крови (у беременных женщин — почти вдвое). Содержание триацилглицеролов в крови в это время тоже возрастает, возможно в результате уменьшения их оттока в жировую ткань (из-за снижения активности липопротеинлипазы — связанного с мембраной фермента, способствующего поглощению триацилглицеролов жировыми клетками). Это сочетание обстоятельств улучшает снабжение жирными кислотами как материнского организма, так и плода. Усиленный катаболизм жиров у матери, особенно при голодании, приводит также к увеличению количеств кетоновых тел, которые, как мы уже видели, могут использоваться как ее собственными тканями, так и плодом. И наконец, на этой стадии к потреблению белков и аминокислот с пищей добавляется еще мобилизация эндогенных белков матери, чтобы обеспечить лучшее снабжение плода аминокислотами вплоть до его появления на свет.

### Ограничения, связанные с размерами тела

Несмотря на многочисленные межвидовые различия (в отношении продолжительности беременности, числа детенышей в помете, степени развития к моменту рождения и т. д.), су-

существует несколько любопытных ограничений, связанных с размерами тела и касающихся некоторых относительных характеристик матери и плода (Rahn, 1982). Одно из них — вероятно, самое очевидное — состоит в том, что вес плода или помета в целом при рождении пропорционален интенсивности метаболизма матери; это означает, что *относительный энергетический вклад матери в формирование плода не зависит от размеров тела взрослого животного (и составляет около 20% основного обмена)*. Поскольку интенсивность метаболизма очень сильно зависит от массы тела, у мелких (10-граммовых) млекопитающих масса новорожденного потомства может достигать 30% массы тела взрослого животного, тогда как масса новорожденного китенка составляет всего лишь 1,5% массы его 100-тонной матери (Rahn, 1982).

Второе, биохимически более загадочное, ограничение связано с соотношением между метаболизмом плода и размерами тела. Поскольку размеры тела плода и матери сильно различаются, можно было бы ожидать, что у плода *удельная интенсивность метаболизма* (на единицу массы) будет значительно выше, чем у матери. *На самом же деле у них эта величина одинакова!* Это фактически означает, что есть какая-то помеха для полной реализации каталитического потенциала окислительных ферментов плода. Этот неожиданный эффект независимости от размеров, наблюдаемый также у птиц, означает, что и у птиц, и у млекопитающих потомство вынуждено развиваться при относительно низкой интенсивности метаболизма: у птиц она не превышает уровня, ограниченного прохождением  $O_2$  через скорлупу яйца, тогда как у млекопитающих плод и плацента в принципе могла бы получать и большее количество кислорода без ущерба для организма матери.

Возникает интересный вопрос: что же сдерживает метаболизм плода? Одно из высказанных предположений (Rahn, 1982; Kleiber, 1965) состоит в том, что лимитирующим фактором все-таки служит кислород. Возможно, что и этот фактор играет свою роль, но он не может быть единственным, поскольку в конце беременности окислительные потенциалы тканей плода уже почти полностью развиты; значит, если бы все дело было в нехватке  $O_2$ , то следовало бы ожидать сильно выраженного эффекта Пастера. Однако значительного возрастания интенсивности гликолиза обычно не наблюдается. Хотя  $O_2$ -зависимые ткани, такие как сердце и мозг, у плода обладают более высокой способностью к анаэробному метаболизму, чем у матери, однако используется эта способность лишь в самых крайних случаях. В нормальных же условиях к концу беременности эти органы функционируют в основном (а может быть, и всецело) за счет окислительного метаболизма. Если бы, например,

у беременной крысы перед родами восемь эмбрионов потребляли столько же кислорода, сколько однодневные крысята, то интенсивность метаболизма у нее в 47 раз превышала бы уровень основного обмена, чего, конечно, не бывает (Kleiber, 1965). Поэтому, вероятно, существует какой-то внутренний регуляторный механизм, удерживающий интенсивность метаболизма плода на относительно низком уровне; в противном случае поток кислорода через плаценту к плоду был бы намного больше, чем это наблюдается в действительности. Каков бы ни был механизм такой регуляции, ясно, что он выключается очень скоро после рождения, и тогда быстро реализуется истинный каталитический потенциал окислительного ферментного аппарата — интенсивность метаболизма новорожденного достигает уровня, соответствующего его размерам.

### Метаболические адаптации, связанные с рождением

В момент рождения возникают три острые проблемы, с которыми немедленно должен справиться новорожденный: 1) прекращение непрерывного притока весьма специфических источников углерода и энергии; 2) физический и температурный стресс, приводящий к повышению концентрации катехоламинов и тиреоидных гормонов в циркулирующей крови; 3) различные степени гипоксии. Поскольку на поздних стадиях беременности во многих тканях плода имеются запасы гликогена, способ решения проблемы гипоксии вполне понятен. Если роды протекают вполне нормально, гликоген подвергается аэробному расщеплению. Однако почти всегда при родах возникает гипоксия — иногда умеренная, иногда тяжелая (у плода концентрация лактата в крови может стать в 7—8 раз больше, чем у матери). Как хорошо показано на многих видах, высокая гликогенолитическая способность плода в конце беременности (особенно его сердца) делает плод перед родами весьма устойчивым к гипоксии и аноксии. Он может использовать те же механизмы, которые действуют у взрослых позвоночных, приспособленных к недостатку кислорода.

Плод хорошо подготовлен к температурному стрессу, наступающему сразу после родов. Обычно в конце утробной жизни и сразу после рождения количество бурой (термогенной) жировой ткани относительно гораздо больше, чем у взрослых особей. Повышенная концентрация катехоламинов, типичная для этого периода, включает термогенез, создающий первую линию обороны против холода.

Таким образом, вторая и третья из перечисленных выше проблем довольно просты и их решение в настоящее время вполне понятно. Первая проблема — прекращение притока пи-

тательных веществ из материнского организма — метаболически намного сложнее. Она включает по крайней мере две составные части: период голодания сразу после родов, который может быть разной продолжительности, и затем период адаптации при переходе с «пищи», богатой углеводами и бедной жирами, на жирное, но бедное углеводами материнское молоко. Весьма интересно, что новорожденный оказывается хорошо подготовлен даже к этим более сложным последствиям появления на свет.

### Источники энергии в первые часы жизни

Можно ожидать, что первым и наиболее очевидным следствием прекращения притока питательных веществ от матери должно быть снижение концентрации глюкозы в крови сразу после родов, и оно действительно наблюдается. Глюкоза — это первый источник энергии, используемый после разрыва связи с материнским организмом. Так как кровь составляет лишь 7% всей массы животного, этот источник энергии крайне мал и на него можно рассчитывать лишь в первые минуты после рождения. Около двадцати лет назад Хан и Колдовский (Hahn, Koldovsky, 1966) правильно заключили из этого, что очень скоро главным источником энергии для новорожденного должны стать жировые запасы. Почему это так, можно показать простыми расчетами.

Интенсивность метаболизма новорожденного крысенка составляет примерно 0,1 кал на 5,5 г массы тела в час. Если бы углеводы были единственным источником энергии, то за первый час жизни новорожденный израсходовал бы две трети всего запаса гликогена, а через два часа без подкормки углеводов в организме не осталось бы вовсе!

Другим важным источником энергии в период до первого кормления материнским молоком могла бы стать глюкоза, образующаяся из лактата или свободных аминокислот, особенно из аланина. В некотором количестве она действительно образуется, однако ни время начала этого процесса, ни его интенсивность не может удовлетворить ранних потребностей в энергии. На первом часу после рождения образование глюкозы из лактата уже начинается (в конце утробной жизни концентрация лактата в крови плода обычно в 3—4 раза выше, чем у взрослого животного, а во время родов она поднимается еще больше), однако максимальной скорости этот процесс достигает лишь через шесть часов. Таким образом, в первые час-два после родов от него мало пользы, и это составляет одну часть проблемы. Другая часть связана с ограниченным каталитическим потенциалом ФЕП-карбоксикиназы, которая, как известно,

служит регуляторным пунктом данного метаболического пути. В первый час постнатальной жизни вряд ли происходят какие-либо изменения в ФЕП-карбоксикиназе печени. Ее каталитическая способность начинает расти примерно через два часа после родов, достигая максимума 6—10 часов спустя. Такой ход событий означает, что в это время ограниченную роль играет не только синтез глюкозы из лактата, но и глюконеогенез на основе аланина, поскольку эти процессы также включают этап, катализируемый ФЕП-карбоксикиназой. Вклад аланина в энергетический метаболизм, базирующийся на глюкозе, очень мал еще и потому, что самого аланина в первые часы после рождения мало (уже в самый первый час концентрация аланина и других аминокислот резко падает).

Все эти соображения, хотя они и основаны на косвенных данных, означают, что в первые часы постнатальной жизни глюконеогенез представляет собой ненадежный и недостаточный источник энергии, и это подтверждают прямые измерения как скорости превращения лактата в глюкозу, так и скорости оборота глюкозы. Они показывают, что низкая скорость глюконеогенеза, характерная для плода перед родами, поднимается до потенциально возможного уровня около  $0,2 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$  (т. е. около 0,04 кал на 5,5 г массы новорожденного крысенок в час) не раньше чем спустя шесть часов после рождения. Хотя при этой максимальной скорости образование глюкозы становится потенциально значительным вкладом в энергетический обмен, оно все же далеко не достаточно (может покрыть в лучшем случае треть потребности). Ясно, что в первые один-два часа после рождения глюконеогенез еще менее эффективен.

Следовательно, единственным альтернативным источником энергии в период от рождения до начала кормления материнским молоком остаются жиры. Липолиз, начинающийся в результате активации гормоночувствительных липаз катехоламинами, приводит к образованию глицерола и свободных жирных кислот. Оба субстрата вносят вклад в энергетический метаболизм, однако количественно оценить их сравнительную роль трудно, так как нелегко измерить скорость расщепления триацилглицеролов в жировой ткани сразу после рождения. Существуют, однако, довольно убедительные косвенные данные. Вскоре после рождения концентрации как глицерола, так и свободных жирных кислот в крови резко возрастают. Если бы глицерол и жирные кислоты расщеплялись с одинаковыми скоростями, то это увеличение концентраций должно было бы находиться в стехиометрическом отношении 1:3. В действительности такого соотношения нет — концентрация глицерола увеличивается в 5 раз, а свободных жирных кислот — только

в 1,5 раза. Поскольку окисление жирных кислот дает много больше энергии по сравнению с глицеролом, эти данные указывают на их гораздо более интенсивный катаболизм в этот период.

Наконец, как мы уже упоминали, конечным продуктом обмена жирных кислот в печени являются кетоновые тела, в первый час после рождения их концентрация снижается, а затем снова резко возрастает. В условиях недостатка глюкозы кетоновые тела в это время могут в различных тканях заменять глюкозу и таким образом сберечь ограниченные запасы глюкозы для тканей, нуждающихся именно в ней.

На качественном уровне характер метаболизма в первые часы после рождения у большинства изученных до сих пор видов такой же, как у крысы. Подводя итоги, можно сказать, что важнейшие метаболические адаптации, связанные с моментом перехода к постнатальной жизни, включают 1) *снижение концентраций глюкозы и аминокислот в крови* и 2) *активацию липолиза и глюконеогенеза*. Эти адаптации, регулируемые инсулином, глюкагоном, катехоламинами, глюкокортикоидами и гормонами щитовидной железы, проявляются в *быстром повышении концентраций свободных жирных кислот, глицерола и кетоновых тел в крови*. Таким образом, в первые часы после рождения главным источником энергии служат *внутренние жировые запасы*, и эти метаболические адаптации фактически продолжают работать и после начала кормления материнским молоком.

### Метаболические адаптации в период питания материнским молоком

После связанного с родами стресса, оказавшись в совершенно новой среде без пищи, новорожденный начинает, наконец, питаться и должен приспособливаться к молочному рациону с высоким содержанием жира. Существенно при этом, что жиры уже служили основным источником энергии перед началом родов и сразу после них в период голодания, так что структура метаболизма должна была соответственно перестроиться; разница состоит в том, что раньше жиры поступали из внутренних запасов плода, а теперь поступают с молоком матери.

Существует интересное различие между видами, у которых новорожденные появляются на свет в относительно зрелом состоянии с большими запасами жира, и теми, у которых они рождаются сравнительно незрелыми и соответственно обладают небольшими жировыми резервами. Например, у человека плод при рождении содержит 16% жира, тогда как у крысы — все-

го лишь 2%. Хотя сразу после родов и новорожденный ребенок, и крысенок живут за счет жировых запасов, однако у человеческого младенца этот период может быть довольно продолжительным, тогда как крысенок очень скоро должен переходить на жир, содержащийся в молоке матери.

Со степенью зрелости рождаемого детеныша коррелирует и содержание жира в молоке: его тем меньше, чем более развитым появляется на свет детеныш. Исключение составляют случаи, когда у новорожденных существуют особые видоспецифические потребности. У видов, у которых новорожденные, даже будучи достаточно зрелыми, вынуждены тратить очень много энергии для поддержания температуры тела, процент жира в материнском молоке высок, так как жир по-прежнему остается основным источником энергии (это относится к тюленям и другим морским млекопитающим, лосям, северным оленям и вообще арктическим животным).

Хотя (см. Hahn, Koldovsky, 1966) в период кормления материнским молоком жир служит главным источником энергии (большая часть белков молока идет на рост детеныша), остается еще проблема «топлива» для жизненно важных тканей с высокими энергетическими потребностями, таких как мозг, обычно неспособных использовать жирные кислоты. Эта проблема решается с помощью трех доступных новорожденному потенциальных источников энергии: 1) глюкозы, образующейся из лактозы молока, 2) глюкозы, синтезируемой *de novo*, и 3) кетонных тел. Так же как и в ранний период после родов, во время питания молоком матери доступность жиров приводит к высокому содержанию в крови кетонных тел, которые могут служить источником энергии для различных тканей, в том числе и мозга, особенно в случае недостатка глюкозы. Крысенок-сосунок при нехватке глюкозы использует содержащуюся в молоке лактозу (которая в печени под действием  $\beta$ -галактозидазы расщепляется на глюкозу и галактозу) и глюконеогенез. Вообще глюкоза может синтезироваться из аланина и из лактата, однако способность использовать аланин еще не вполне развита — вероятно, из-за низкой активности аланинаминотрансферазы в печени: например, у трехдневного крысенка эта способность в 6 раз меньше, чем у девятидневного. Поэтому считают, что в период вскармливания основным предшественником для глюконеогенеза служит, вероятно, лактат, по крайней мере у крысы. Лактат, образующийся из гликогена периферических тканей, может использоваться для глюконеогенеза в печени, так как декарбоксилирование пирувата в митохондриях (при участии пируватдегидрогеназы) происходит медленно, тогда как активность пируваткарбоксилазы сразу после родов быстро возрастает и к началу вскармливания до-



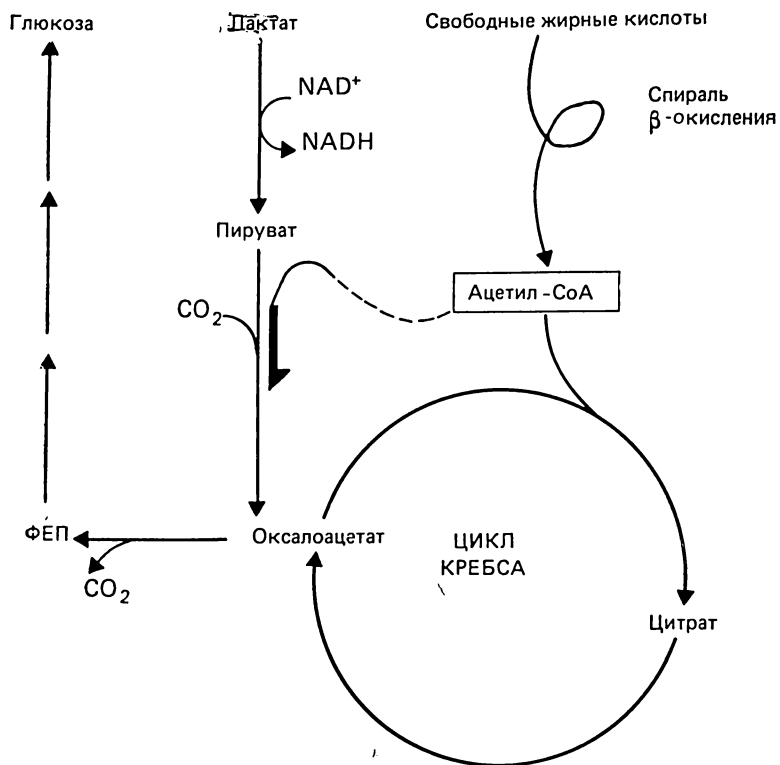


Рис. 8-6. Схема метаболизма печени у крысенка в период вскармливания материнским молоком.

стигает весьма высокого уровня. Как полагают, при таких условиях жирные кислоты доставляют ацетил-CoA для цикла Кребса, а лактат (при участии лактатдегидрогеназы и пируват-карбоксилазы) обеспечивает оксалоацетатом и цикл Кребса, и глюконеогенез (рис. 8-6).

Хотя некоторая доля аланина (и, вероятно, других глюкогенных аминокислот) может использоваться для глюконеогенеза, ясно, что аланин и другие аминокислоты, содержащиеся в молоке (в свободном виде или в его белке), идут главным образом на синтез белков (т. е. рост). Это объясняет, почему у сосунков активность ферментов цикла мочевины и аланин-аминотрансферазы низка и достигает уровня, характерного для взрослых животных, лишь после отъема от матери. Попытки непосредственно оценить, какая доля аланина подвергается дезаминированию (с дальнейшим образованием глюкозы или

CO<sub>2</sub>), а какая идет на синтез белков, показывают, что у десятидневного крысенка в мочевины и аммиак переходит лишь 30% азота аланина, тогда как у взрослой крысы эта величина достигает 75%. На основании такого рода данных был сделан вывод (Snell, 1980; Hahn, 1982, и др.), что в период вскармливания большая часть аланина и других аминокислот, всасывающихся в кишечнике, используется для синтеза белков. Это неудивительно, так как сосунки растут очень быстро.

### Метаболические адаптации у матери в период вскармливания

Лактация — это эволюционно очень древний процесс, возникший около 200 млн. лет назад и столь характерный для млекопитающих (Mammalia), что именно молочные железы (mammae) послужили основой для наименования этого класса. В филогенезе лактация возникла раньше плацентарной беременности (ранние млекопитающие были яйцекладущими, как и современные однопроходные); неудивительно, что в процессе эволюции выработались различные видоспецифические адаптации, которые могут касаться *состава молока, механизмов кормления и, наконец, структуры самих молочных желез — в соответствии с нуждами того или иного вида*. Крайним примером может служить процесс лактации у самки кита, выкармливающей под водой единственного, но весьма крупного детеныша, нуждающегося в большом количестве энергии. При этом кормящая мать должна сберегать воду своего организма из-за высокой солености морской воды. Компромиссное решение этих противоречивых задач (Rosso, Cramoy, 1982) включает образование высококонцентрированного молока, содержащего 50% и больше жира, и очень мощный рефлекс активного выведения этого молока. В результате китенок быстро «накачивается» сливками, вода материнского организма расходуется экономно, энергетические потребности китенка удовлетворяются, и весь процесс легко может происходить за время возможного пребывания под водой!

Эти изящные адаптации у китов и других морских млекопитающих необычны лишь высокой степенью специализации, а вообще у всех млекопитающих мы находим соответствие между механизмом лактации и потребностями потомства. Насколько известно, у всех млекопитающих стандартной частью механизма лактации является рефлекс, связанный с действием пролактина, который выделяется пропорционально стимуляции со стороны детеныша. Другими словами, чем чаще, дольше и энергичнее сосет детеныш, тем больше выделяется молока. И наконец, у всех млекопитающих два главных питательных

компонента молока — это жиры и углеводы (хотя есть в нем и много других веществ, в том числе казеин, аминокислоты, витамины, ионы и даже антитела для защиты от инфекции). Рассмотрим теперь основные особенности метаболизма молочных желез, обеспечивающие образование этих двух главных источников углерода и энергии.

### Приспособление молочных желез к липогенезу во время лактации

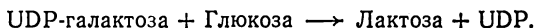
В печени и жировой ткани нежвачных млекопитающих обычный путь липогенеза начинается с глюкозы и включает ее катаболизм через пируват до ацетил-СоА, который конденсируется с оксалоацетатом и дает цитрат. Затем цитрат переходит из митохондрий в цитозоль и расщепляется на ацетил-СоА и оксалоацетат. Оксалоацетат превращается в малат, который может служить субстратом для яблочного фермента, генерирующего восстановительную силу (в форме NADPH), что обеспечивает включение ацетил-СоА в жир. Это так называемый путь расщепления цитрата, его главная особенность — использование цитрата для переноса двухуглеродных единиц из митохондрий в цитозоль, где они могут служить субстратами для ацетил-СоА-карбоксилазы, что составляет первый этап синтеза жирных кислот. По-видимому, этот путь липогенеза весьма подвержен адаптивным изменениям (Hochachka, 1973). Например, в печени, жировой ткани и молочных железах жвачных активность фермента, расщепляющего цитрат, и яблочного фермента необычайно низка, и полагают, что рассмотренный путь здесь не функционирует. Вместо этого жвачные используют содержащийся в корме ацетат непосредственно как источник внемитохондриального ацетил-СоА для образования жирных кислот, а сопряженную с NADPH изоцитратдегидрогеназу — как источник водорода для этого процесса. В противоположность этому *плод* у жвачных, обеспеченный непрерывным притоком глюкозы из организма матери, обладает обычным для млекопитающих набором ферментов, необходимых для пути, связанного с расщеплением цитрата.

В молочных железах крысы и других млекопитающих вскоре после начала лактации резко повышается активность фермента, расщепляющего цитрат, а после прекращения вскармливания она быстро падает (обычно примерно за сутки). Поскольку фермент, расщепляющий цитрат, регулируется аллостерически и, как известно, служит важным пунктом регуляции липогенеза в печени, такого рода данные позволяют предполагать, что в молочных железах липогенез тоже (по крайней мере отчасти) регулируется уровнем активности фер-

мента, расщепляющего цитрат. В отличие от печени и жировой ткани в молочных железах восстановительная сила для синтеза жирных кислот создается, видимо, в основном в глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции при участии специфического изозима, индуцируемого в период лактации. Активность этой специфической формы Г-6-Ф-дегидрогеназы в это время может увеличиваться почти в 20 раз, что само по себе говорит о необычайной интенсивности метаболизма в лактирующих молочных железах.

### Адаптация молочных желез для синтеза лактозы

Столь же интересна ферментная адаптация молочных желез для синтеза в надлежащее время лактозы. Дисахарид лактоза, так же как и казеин, образуется только в молочных железах в результате реакции, катализируемой лактозосинтетазой:



Перенос галактозы на глюкозу происходит при участии двух белков, обозначаемых А и В. В-белок отождествлен с одним из хорошо известных белков молока, а именно  $\alpha$ -лактальбумином, и сам по себе, насколько известно, ферментативной активностью не обладает. А-белок (А-фермент), по-видимому, связан с микросомами и представляет собой галактозилтрансферазу, катализирующую реакцию



В присутствии В-белка А-фермент способен использовать глюкозу в качестве акцептора для галактозильной части UDP-галактозы. По сути дела, В-белок переключает А-фермент с образования N-ацетиллактозамина на синтез лактозы, изменяя специфичность к субстрату (предпочтительным субстратом становится глюкоза) и увеличивая сродство к нему (уменьшая  $K_m$  для глюкозы).

В эксплантатах молочной железы путем надлежащей обработки инсулином, глюкокортикоидом и пролактином можно вызвать одновременный максимальный синтез обоих (А и В) компонентов лактозосинтетазы. Однако *in vivo* дело обстоит иначе. Благодаря последовательно регулируемой секреции тех же гормонов активность А-фермента начинает быстро увеличиваться примерно с середины беременности и достигает максимума незадолго до родов. Активность В-белка заметно возрастает вскоре после родов, так что максимальный синтез лактозы не может быть достигнут до тех пор, пока он не будет нужен, т. е. до начала интенсивной лактации (подробнее см. Nachschach, 1973).

Наконец, следует заметить, что изменения метаболических процессов в молочных железах тесно связаны с изменениями ультраструктуры альвеолярных клеток железы и с другими специфическими биосинтезами, происходящими в это время (например, с биосинтезом казеина). Такая координация событий сохраняется до конца лактации.

### Метаболические адаптации к переходу на самостоятельное питание у детенышей

В развитии млекопитающих существует промежуток времени, когда детеныш уже начал питаться самостоятельно, но еще продолжает сосать материнское молоко (период отъема). У крыс это период примерно между 16-м и 30-м днями. У тех видов, у которых новорожденные появляются на свет в сравнительно зрелом состоянии, этот период определить точно труднее. У человека, например, он может начинаться вскоре после рождения и продолжаться до трехлетнего возраста и дольше в зависимости от традиций и социально-экономических условий. По этой причине метаболические адаптации носят более постепенный характер и их труднее однозначно перечислить. Тем не менее они весьма фундаментальны, так как на этой стадии уже реализуются (хотя и не полностью) качественные особенности метаболизма взрослого животного. Вероятно, лучше всего этот переход изучен у лабораторных крыс.

Стандартный рацион для лабораторных крыс («Purina Chow» или другой сходный по составу) содержит по сравнению с крысиным молоком больше углеводов и меньше жиров, так что в период отъема крысята потребляют постепенно все меньше жиров и все больше углеводов. Фактически эта закономерность характерна для многих млекопитающих. Она находит отражение в замедлении глюконеогенеза (*из-за снижения активности ключевых ферментов соответствующего пути*) и в ускорении синтеза липидов (*вследствие повышения активности ключевых ферментов, катализирующих этот процесс*). Таким образом, в некоторых отношениях обмен глюкозы и липидов возвращается к пренатальному типу (рис. 8-7). Однако это не относится к метаболизму аминокислот и белков.

Как мы видели, до начала периода отъема запас свободных аминокислот расходовался в основном на синтез белков, и лишь малая доля аминного азота переходила в мочевины или аммиак. Во время отъема положение в корне меняется, так как каталитические функции аланин-аминотрансферазы, яблочного фермента и ферментов цикла мочевины в печени постепенно усиливаются (табл. 8-1). Другими словами, с переходом на самостоятельное питание обмен аминокислот ус-

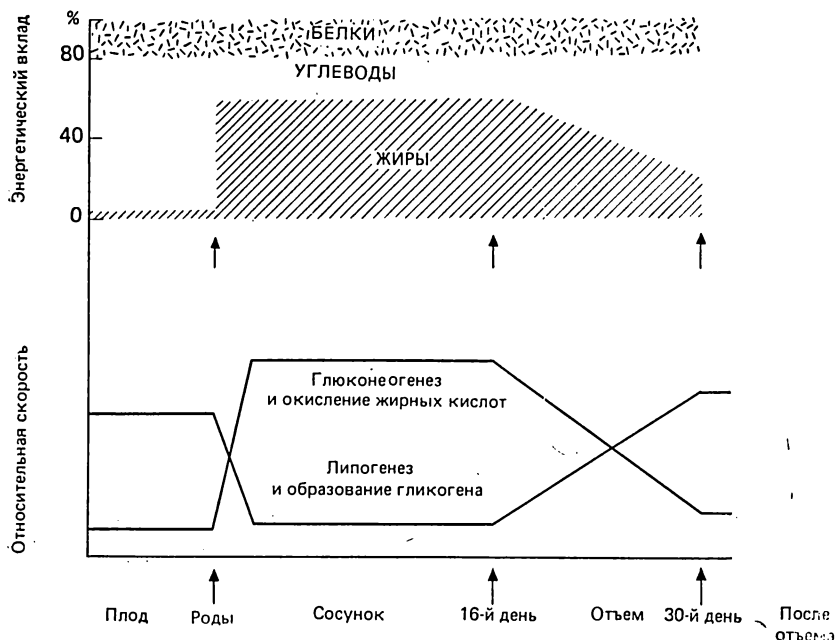


Рис. 8-7. Изменения состава питательных веществ, получаемых крысенком на разных стадиях развития, и их связь с изменениями структуры метаболизма. (По Nahn, 1982, с изменениями.)

ложняется. Организм еще растет, поэтому значительная часть аминокислот используется для синтеза белков. Однако с этим процессом начинают эффективно конкурировать и другие пути — дезаминирование аминокислот с различными последующими превращениями (окислительные пути, глюконеогенез, липогенез и другие цепи реакций, такие как цикл пуриновых нуклеотидов, цикл мочевины и др.). Иными словами, на этой стадии развития происходит становление метаболизма, характерного для взрослой особи, хотя соответствующие активности многих ферментов достигаются в гораздо более позднем возрасте.

### Обзор основных особенностей метаболизма на разных стадиях развития

Пришло время кратко резюмировать основные изменения в питании и метаболизме, происходящие обычно в процессе развития. Они касаются главным образом относительной роли жиров и углеводов как источников энергии. В период внутриутробной жизни основным источником энергии служат углеводы (глюкоза и лактат) и организм получает много углеводов

Таблица 8-1. Активность ферментов печени у утробного плода, сосунка и отъемыша (данные для крысы). (По Нанп, 1982, с изменениями)

Фермент	Активность		
	у плода	у сосунка	у отъемыша
Фосфоенолпируват-карбоксикиназа Пируваткарбоксилаза Фруктозобисфосфатаза Глюкозо-6-фосфатаза Карнитинтрансферазы Ферменты метаболизма кетонов	Низкая или отсутствует	Высокая	Убывающая
Пируваткиназа Ацетил-СоА-карбоксилаза Синтетаза жирных кислот Фермент, расщепляющий цитрат Ацетил-СоА-синтетаза β-Метил, β-гидроксиглутарил-СоА-редуктаза	Высокая	Низкая	Высокая
Аланинтрансминаза (цитоплазматическая) Ферменты цикла мочевины	Отсутствует	Низкая, возрастающая	Высокая
Яблочный фермент	Отсутствует	Отсутствует, затем возрастает	

и мало жиров. После рождения в течение некоторого времени (довольно короткого, хотя и различного у разных видов) организм не получает пищи вовсе. Затем при переходе на питание материнским молоком пищевой рацион резко изменяется: он содержит много жиров, но мало углеводов. Такое положение сохраняется до того, как детеныш начинает переходить на самостоятельное питание и в его рационе снова постепенно увеличивается доля углеводов.

Весьма важно то, что почти на всем протяжении рассмотренных стадий вплоть до начала перехода к самостоятельному питанию, а иногда и до конца этого этапа развивающийся организм не имеет выбора между разными видами пищи — он буквально «ест, что дают». Это сильно ограничивает круг адаптаций, возможных для организма. Именно поэтому многие, а может быть и все, изменения в метаболизме углеводов и жиров, происходящие в процессе развития, являются прямыми и незамедлительными следствиями изменений в составе получаемых питательных веществ (рис. 8-7).

Несколько иначе обстоит дело с обменом аминокислот. Одна из причин состоит в том, что доступность аминокислот — свободных или содержащихся в белках пищи — остается довольно постоянной, по крайней мере до прекращения питания материнским молоком. Хотя приток аминокислот в организм можно считать относительно стабильным, их дальнейшая судьба зависит от стадии развития. По крайней мере до начала перехода на самостоятельное питание большая часть аминокислот идет на синтез белков в процессе роста и дифференцировки. Затем картина сильно меняется, так как различные новые нужды и формы активности организма требуют теперь усложнения аминокислотного обмена. Гораздо меньшая доля общего пула аминокислот идет на биосинтез белков и рост, а много большая направляется по путям катаболизма, на анаплеротические реакции и на другие биосинтетические функции.

### Ферментные основы адаптаций в процессе развития

В предыдущих разделах мы кратко рассмотрели многочисленные метаболические адаптации, обеспечивающие выживание на разных стадиях развития. Как происходят переходы от одних метаболических адаптаций к другим и каким образом они регулируются? Как и в отношении других аспектов этой обширной и все еще активно развивающейся области исследований, мы можем наметить только самое общее подразделение. Соответствующие механизмы распадаются на две главные категории: 1) генетически запрограммированные и 2) регулируемые условиями внешней среды. Однако соотношение между ними далеко не всегда ясно.

Рассмотрим, например, ход развития крысы. Хотя крысята рождаются очень незрелыми — голые, слепые, с закрытыми слуховыми ходами, — они тем не менее во многих отношениях подготовлены к появлению на свет. Активность особенно нужных в будущем ферментов печени, мозга, сердца и, возможно, многих других тканей обычно начинает увеличиваться за два-три дня до рождения. Происходят ли эти изменения просто в соответствии с «генетическим планом» или их вызывают внешние стимулы? Оказывается, действуют оба фактора. В эксперименте, например, можно сократить или удлинить период беременности — при этом соответственно изменится и ход развития плода. Таким образом, скорость развития по крайней мере на некоторых его стадиях отчасти зависит от внешних факторов. Другие стадии, по-видимому, в основном запрограммированы генетически.

Генетические и внешние факторы не следует чрезмерно противопоставлять друг другу. Каковы бы ни были первичные пусковые сигналы, общепризнано, что важнейшую роль в осу-



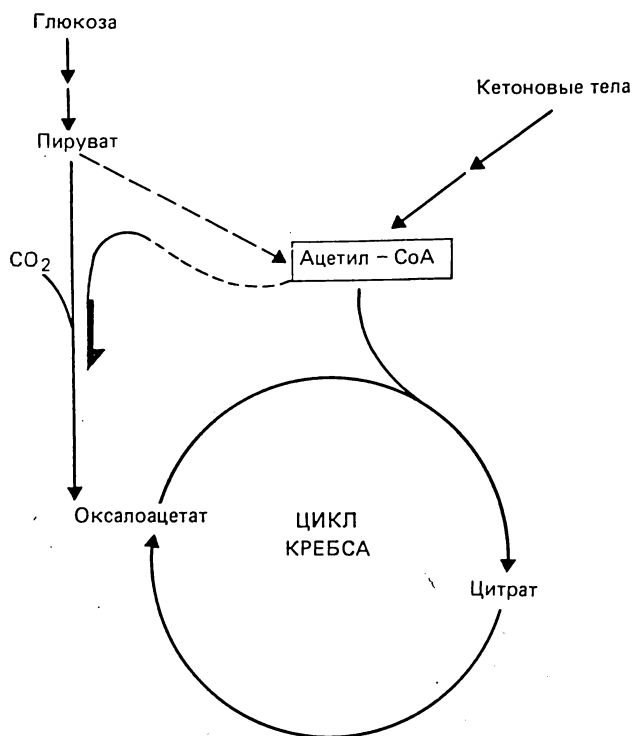


Рис. 8-8. Анаплеротическая роль глюкозы в метаболизме мозга у крысы на ранних стадиях развития.

ществлении адаптаций могут играть гормоны и в меньшей степени метаболиты. Это можно хорошо проиллюстрировать на примере родов. Как уже упоминалось, роды — это для плода событие, сопровождающееся сильным стрессом, который вызывает выделение катехоламинов. Эти гормоны в свою очередь активируют аденилатциклазу печени и жировой ткани, что влечет за собой расщепление гликогена в печени, доставляющее глюкозу — источник энергии в период, когда плод перестает получать питание от матери, и освобождение жирных кислот как «топлива» для термогенеза. Катехоламины стимулируют также секрецию глюкагона поджелудочной железой и тормозят секрецию инсулина. В то же время понижение концентрации глюкозы в крови после рождения само по себе может вызывать гормональные сдвиги, например повышение уровня глюкагона и глюкокортикоидов в крови, что способствует гомеостазу по глюкозе. Для того чтобы такие гормональные

сдвиги были эффективны, необходимо, конечно, образование (более раннее или одновременное?) специфических рецепторов для гормонов. Эта проблема в последние годы привлекает повышенное внимание.

Независимо от природы инициирующих сигналов основной механизм их воздействия на обмен веществ состоит в качественном или количественном изменении ферментного аппарата в данной ткани на данной стадии развития. Примером может служить мозг крысы, который, как мы видели, обладает необычно высокой способностью использовать глюкозу и кетоновые тела на ранних стадиях развития. Это достигается путем точно запрограммированной индукции ферментов, управляющих рядом критических этапов метаболизма. Например, пируватдегидрогеназа образуется примерно неделю спустя после индукции таких ферментов цикла Кребса, как цитратсинтаза, а также после индукции пируваткарбоксилазы и  $\beta$ -гидроксибутират-дегидрогеназы. В результате метаболизм глюкозы в еще не созревшем мозгу крысы играет в основном анаплеротическую роль — восполняет расход интермедиатов цикла Кребса на биосинтезы. С другой стороны, кетоновые тела поставляют двухуглеродные фрагменты (в форме ацетил- $\text{CoA}$ ) в цикл Кребса (рис. 8-8). В экстремальной ситуации такое снабжение цикла Кребса промежуточными веществами может стать единственной функцией глюкозы, а вся потребность мозга в энергии будет удовлетворяться за счет кетоновых тел. Таким сложным, но изящным способом использование глюкозы сводится до минимума в период, когда ее часто может не хватать.

Точно так же в каждом органе, в каждой ткани происходит своя специфическая адаптация. В некоторых случаях для решения проблем, возникающих в процессе развития, достаточно просто изменить количества определенных ферментов. В других тканях требуется не только регуляция каталитического потенциала ферментов в каких-то пунктах метаболических путей, но и смена преобладающих изозимов. Однако во всех случаях адаптации, связанной с процессом развития, принципиально важен «временной график» таких событий или процессов, как образование гормональных рецепторов, секреция гормонов, индукция ферментов и, наконец, даже само действие ферментов и мобилизация субстратов. При таком хорошо регулируемом программировании собственного метаболизма развивающийся потомок (плод и позднее детеныш) очень эффективно и согласованно взаимодействует с организмом матери. Вместе взятые, мать и потомок образуют весьма сбалансированную гомеостатическую систему, цель которой — успешное продолжение рода.

# Дыхательные белки

## Введение

В предыдущих главах было показано, что общая «метаболическая архитектура» того или иного организма существенно зависит от снабжения тканей кислородом из окружающей среды. При достаточном количестве кислорода в клетках могут осуществляться эффективные аэробные процессы, тогда как в периоды кислородного голодания организму приходится обращаться к менее выгодным способам синтеза АТФ. На всех уровнях биологической организации отбор способствовал выработке приспособлений, позволяющих обеспечить непрерывное снабжение клеток кислородом. Способ поглощения кислорода определял величину поверхности, необходимую для эффективного газообмена; потребность в транспорте газов определяла объем циркулирующей крови; некоторые рыбы при изменении содержания кислорода в воде могут переходить от водного дыхания к воздушному. Разнообразные модификации в системе транспорта кислорода выявляются и на молекулярном уровне, в частности при изучении так называемых «дыхательных белков» — главных переносчиков  $O_2$  у животных. Хотя какое-то количество кислорода может транспортироваться в растворенном состоянии, у большинства животных его переносят специальные дыхательные белки (одного или нескольких типов). Главным предметом обсуждения в этой главе будет адаптация дыхательных белков к различным условиям среды, к интенсивности метаболизма у данного вида животных и к той или иной стадии развития особи.

Детальное рассмотрение дыхательных белков полезно для понимания главных стратегий молекулярной адаптации по нескольким причинам. Во-первых, взаимоотношения структуры и функции раскрыты у этих белков лучше, чем у каких-либо других. Как мы увидим, многие функциональные различия, например различия между вариантами гемоглобина у позвоночных, можно однозначно связать с заменами отдельных аминокислот. Во-вторых, при рассмотрении дыхательных белков можно особенно наглядно продемонстрировать те типы биохимических

мических адаптаций, которые мы считаем основными. В частности, на примере форм гемоглобина, различающихся по сродству к кислороду и по регуляторным свойствам, можно показать, каким образом качественно различные варианты белков позволяют организмам адаптироваться к тем или иным условиям жизни. Вместе с тем изменения концентраций дыхательных белков показывают, как важна во многих случаях и эта стратегия макромолекулярной адаптации. И наконец, многие адаптации в системах гемоглобинов у позвоночных связаны с изменением микросреды, в которой функционируют эти белки. В-третьих, изучая дыхательные белки, мы получим особенно ясное представление о процессах конвергентной эволюции на уровне функций макромолекул. Сравнивая адаптации, играющие ключевую роль в переносе  $O_2$  дыхательными белками, мы убедимся, что, несмотря на все разнообразие этих белков, некоторые фундаментальные особенности выявляются у них снова и снова (табл. 9-1).

### Основные функции дыхательных белков: анalogии с работой ферментов

Адаптация систем дыхательных белков имеет много общего с адаптацией ферментов к функционированию в разных физико-химических условиях и при разной интенсивности метаболизма. И ферменты, и дыхательные белки должны работать с определенной *эффективностью*. Для ферментов это означает достаточную скорость превращения субстрата в продукт, а дыхательным белкам нужно обладать достаточной кислородной емкостью, чтобы в нужном количестве доставлять  $O_2$  тканям. Как ферменты, так и дыхательные белки должны проявлять сродство к определенным лигандам. Ферменты должны связывать надлежащие количества субстратов и кофакторов, а дыхательные белки — кислород, извлекая его из окружающей среды и освобождая там, где он необходим. Взаимодействие фермента с лигандом характеризуют кажущейся константой Михаэлиса ( $K_M$ ), т. е. концентрацией лиганда, при которой скорость реакции достигает половины максимальной. Аналогичный параметр,  $P_{50}$ , используют для характеристики свойств дыхательных белков. Величина  $P_{50}$  равна концентрации кислорода, при которой дыхательные белки насыщаются им наполовину (рис. 9-1). Активность ферментов и дыхательных белков должна зависеть от потребности в их функции; иными словами, те и другие должны быть чувствительны к регуляторным сигналам. Ферментные системы в ответ на эти сигналы изменяют скорость катализируемых ими реакций, а дыхательные белки — свое сродство к кислороду и в некоторых случаях кисло-

Таблица 9-1. Основные структурные и функциональные особенности белков — переносчиков кислорода

	Гемоглобины		Гемоцианины	Гемозритрины
	позвоночных	беспозвоночных		
Распространенность	У большинства видов	В отдельных типах	У моллюсков, членистоногих	У сипункулид, плеченогих, приапид, кольчатых червей
Структурные особенности				
Участки связывания O <sub>2</sub>	1 гем : O <sub>2</sub>	1 гем : O <sub>2</sub>	2Cu : O <sub>2</sub>	2Fe : O <sub>2</sub>
Цвет оксигенированной формы	Красный	Красный	Голубой	Пурпурно-розовый
Цвет дезоксигенированной формы	Пурпурно-красный	Пурпурно-красный	Бесцветный	Бледно-желтый
Молекулярная масса субъединицы	17 500	12 000—400 000	70 000—75 000 (членистоногие), 350 000 (моллюски),	12 800—14 400
Число субъединиц	1 (миоглобин) 4 (Hb крови)	Варьирует в широких пределах, до 180	6—48 (членистоногие), 20 (моллюски)	3—8
Локализация: внутриклеточная (вну) или внеклеточная (вне)	вну	вну, вне	вне	вну
Функциональные характеристики				
Кооперативность (константа Хилла, n)	1 (миоглобин), до 3, Hb	До 5	До 6 (членистоногие); до 5 (моллюски)	1 (миогемозритрины); до 1,5 (в со-судах)
Эффект Бора — положительный (+) или отрицательный (—)	0 (миоглобин), + или — (Hb)	+	+ или —	+ или —
Модуляторы	Анионы: органические и неорганические (пример: 2,3-бисфосфоглицерат)	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , ATP (у <i>Glycera</i> )	Неорганические ионы, например Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> ; лактат	?

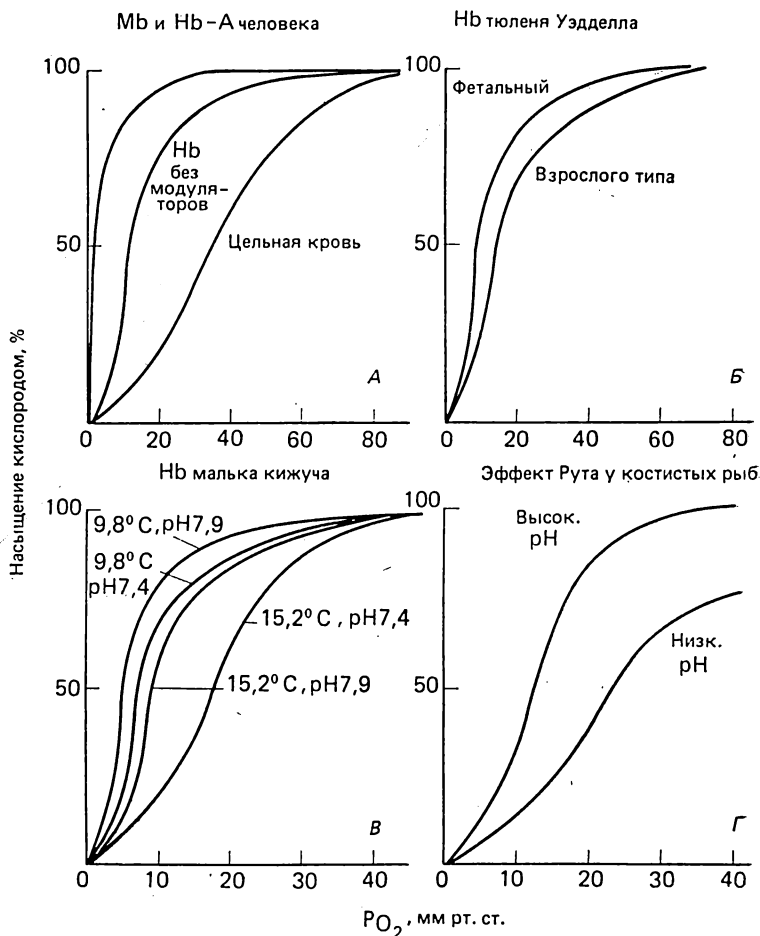


Рис. 9-1. Кривые связывания кислорода гемоглобинами позвоночных.

А. Миоглобин (Mb) и Hb-A человека (интактный Hb крови и Hb, «отмытый» от модулятора). Обратите внимание на низкое значение  $P_{50}$  (концентрация кислорода, соответствующая 50%-ному насыщению белка) для Mb и снижение  $P_{50}$  при отмывании Hb-A от модуляторов (2,3-ДФГ — главный модулятор, удаляемый в процессе диализа).

Б. Фетальный Hb тюленя Уэдделла и Hb взрослого типа (по данным Lenfant et al., 1969). Величина  $P_{50}$  для фетального Hb ниже.

В. Hb малька кижуча при разных температурах и pH (по данным Giles, Randall, 1980). Величина  $P_{50}$  возрастает, если при постоянной температуре снижается pH (эффект Бора) или при постоянном pH повышается температура (что указывает на возрастание энтальпии при оксигенации, т. е. связывание  $O_2$  представляет собой экзотермический процесс). (Giles, Randall, 1980. Copyright 1980, Pergamon Press, Ltd.)

Г. Hb костистых рыб, у которых плавательный пузырь заполняется путем

родную емкость. И наконец, для дыхательных белков, так же как и для многих регуляторных ферментов, состоящих из отдельных субъединиц, характерна кооперативность при связывании лигандов (рис. 9-1). Благодаря этой кооперативности даже малые изменения концентрации кислорода приводят к значительным сдвигам в насыщении им дыхательного белка, т. е. к поглощению или отдаче  $O_2$ . Этого не происходит, если дыхательный белок не проявляет кооперативности (рис. 9-1). Кооперативность связывания дыхательных белков с кислородом может быть охарактеризована так называемой константой Хилла<sup>1</sup> (обозначаемой  $n$ ). Для гемоглобинов позвоночных величина  $n$  варьирует в пределах от 1 для мономерного мышечного гемоглобина (миоглобина, Mb) примерно до 2—3 для типичного гемоглобина взрослой особи (Hb-A), который в отличие от миоглобина представляет собой тетрамер.

Таким образом, ферменты и дыхательные белки обладают рядом общих свойств: *они способны связывать специфические лиганды, проявляя определенную емкость и сродство к ним, и изменять свои характеристики в ответ на регуляторные сигналы.* Рассмотрим подробнее эти важнейшие свойства дыхательных белков и их адаптивные изменения, благодаря которым обеспечивается эффективное снабжение клеток кислородом в самых различных внешних и внутренних (физиологических) условиях.

### Функция гемоглобинов позвоночных и ее регуляция

Гемоглобины позвоночных изучены лучше других дыхательных белков. Структура и функции разнообразных гемоглобинов (табл. 9-1) проанализированы столь тщательно, что многие их важнейшие свойства (например, способность к связыванию

---

<sup>1</sup> Как отмечалось в главе 3, показатель кооперативности связывания лиганда — константу Хилла — принято сейчас обозначать символом  $n$ , а число связывающих лиганд участков в молекуле белка (фермента или дыхательного белка) —  $n$ . Однако в большинстве работ по связыванию кислорода дыхательными белками константу Хилла обозначают символом  $n$ , и мы не будем нарушать эту традицию. Нужно при этом еще раз подчеркнуть, что константа Хилла (обозначать ли ее  $n$  или  $n$ ) представляет собой эмпирическую оценку кооперативности связывания, и ее не следует отождествлять с числом мест связывания в данной молекуле.

---

секреции кислорода. При уменьшении рН кислородная емкость Hb снижается (эффект Рута, подробнее см. в тексте).

Обратите внимание, что гемоглобины различаются по величине присущего им сродства к кислороду ( $P_{50}$ ) в зависимости от того, дышит ли животное в воздушной или в водной среде: это обусловлено различной концентрацией кислорода в воде и в воздухе.

кислорода и регуляция этой способности) могут быть объяснены на уровне первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры. Читателю, которого интересует история этих исследований, можно рекомендовать превосходный очерк Эдсолла (Edsall, 1980).

У позвоночных молекулярная масса одной субъединицы гемоглобина составляет около 17 000 (см. табл. 9-1). Миоглобин представляет собой мономер, тогда как гемоглобины циркулирующей крови (в эритроцитах) — почти всегда тетрамеры. Тетрамерное строение и, вероятно, наличие субъединиц двух типов ( $\alpha$  и  $\beta$  в Hb-A) является необходимой структурной предпосылкой кооперативного связывания кислорода. Подобно регуляторным ферментам, тетрамерные гемоглобины обычно способны как к гомотропному, так и к гетеротропному взаимодействию с лигандами (см. гл. 3). Для большинства тетрамерных гемоглобинов позвоночных характерно положительное гомотропное взаимодействие с молекулами кислорода. При этом в результате связывания с гемоглобином первой молекулы  $O_2$  его четвертичная структура изменяется таким образом, что облегчается связывание последующих молекул  $O_2$  (Perutz, 1970). Такое видоизменение структуры Hb часто называют переходом T $\rightarrow$ R (от слов tight — напряженное и relaxed — релаксированное состояние).

У гемоглобинов позвоночных выявлены также разнообразные гетеротропные взаимодействия (см. табл. 9-1 и рис. 9-1). Важнейшую роль в регуляции функции большинства дыхательных белков играют протоны. Увеличение их активности (уменьшение pH) ведет к эффекту Бора (снижению сродства гемоглобина к  $O_2$ , рис. 9-1, В) и эффекту Рута (уменьшению кислородной емкости гемоглобина, рис. 9-1, Г). Важными модуляторами функции гемоглобина служат также органические фосфаты, например 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ). Присоединяясь к тетрамерному гемоглобину в молярном отношении 1 : 1, они существенно снижают его сродство к  $O_2$ . В тех случаях, когда функции гемоглобина модулируются одновременно и органическими фосфатами, и протонами, эти модуляторы действуют обычно как синергисты. Поскольку дезоксигемоглобин обладает большим сродством к 2,3-БФГ (у рыб вместо 2,3-БФГ к АТР и GTP, а у птиц и рептилий — к инозитолгексафосфату), снижение величины pH благоприятствует связыванию органических фосфатов. Поэтому закисление артериальной крови, поступающей в активно дышащую ткань, метаболическими кислотами и  $CO_2$  способствует высвобождению кислорода (эффект Бора) и связыванию органофосфатных модуляторов. Тем самым создаются благоприятные условия для поддержания гемоглобина в дезоксигенированном состоянии.



### Связывание протонов и модуляция гемоглобина

Сегодня нам вполне понятны структурная основа эффекта Бора и механизмы взаимодействия гемоглобина с 2,3-БФГ. В связывании 2,3-БФГ участвует несколько аминокислотных остатков (Агпоне, 1972), в том числе группа положительно заряженных остатков около центра тетрамерной молекулы Hb, а также концевые аминокислотные группы  $\beta$ -цепей. Протонирование концевых аминокислотных групп благоприятствует связыванию 2,3-БФГ, так что это регуляторное взаимодействие зависит от pH. Однако изменение свободной энергии, происходящее при связывании 2,3-БФГ, в большей мере определяется взаимодействием его с кластером положительно заряженных аминокислотных остатков: между ними и отрицательно заряженными группами 2,3-БФГ образуются солевые мостики, стабилизирующие комплекс. Строение молекулы 2,3-БФГ хорошо соответствует расположению положительных зарядов в дезоксигемоглобине, но в случае оксигемоглобина степень этой комплементарности уменьшается, так как связывание  $O_2$  ведет к изменению конформации белковой молекулы.

Эффект Бора (см. рис. 9-1, В) тоже обусловлен обратимыми изменениями конформации гемоглобина и степенью ее протонирования. Для возникновения эффекта Бора необходимы С-концевые остатки гистидина в  $\beta$ -цепях и N-концевые остатки валина в  $\alpha$ -цепях; вместе с тем показано, что этому эффекту способствуют и другие гистидиновые остатки обеих  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей (Охе, Кајита, 1980). По данным рентгеноструктурного анализа при связывании  $O_2$  изменяется пространственная ориентация N- и С-концевых остатков, и это изменение стерической конфигурации ведет к снижению их рК. Таким образом, *при связывании кислорода от «групп Бора» отщепляются протоны (оксигемоглобин — более сильная кислота, чем дезоксигемоглобин), а при отдаче кислорода, наоборот, протоны присоединяются к «группам Бора»*. Детали этих перестроек, приводящих к изменению рК остатков гистидина, были выяснены методом рентгеноструктурного анализа (Perutz, 1970; Охе, Кајита, 1980). Оказалось, что остатки гистидина, ответственные в дезоксигемоглобине за эффект Бора, не контактируют непосредственно с растворителем (водой), а образуют солевые мостики с другими аминокислотами. Эти взаимодействия стабилизируют протонированную форму имидазольного кольца, обеспечивая высокие значения рК. Оксигенация гемоглобина разрушает эти мостики, и аминокислотные остатки, участвующие в эффекте Бора, становятся доступны для молекул воды. При этом рК имидазольных групп значительно снижается. Например, рК С-концевого гистидина  $\beta$ -цепи (остатка 146) при окси-

генации/дезоксигенации сдвигается на 1,1 единицы рН (Ohe, Kajita, 1980).

Рассмотрев в общих чертах важнейшие функциональные и структурные особенности гемоглобинов позвоночных, перейдем теперь к различным дыхательным белкам, у которых кислородная емкость, сродство к  $O_2$  и регуляторные характеристики адаптированы для транспорта кислорода в разнообразных условиях внешней среды и при разных физиологических состояниях организма. Мы построим обсуждение таким образом, чтобы выявить приспособительную роль следующих механизмов: 1) образования новых вариантов дыхательных белков (в ходе эволюции или в онтогенезе), 2) изменения концентраций этих белков и 3) изменения концентраций модуляторов в соответствии с потребностями организма в кислороде.

### Адаптация гемоглобинов позвоночных: варианты Hb

*Множественные гемоглобины лососевых и чукучановых рыб.* В крови многих позвоночных, особенно эктотермных, присутствует несколько форм гемоглобина. Анализ функциональных и структурных различий между ними ясно показывает роль этого полиморфизма в адаптации организма к условиям среды и к различным физиологическим состояниям. Существенное «разделение труда» между различными вариантами гемоглобина можно проиллюстрировать на примере гемоглобинов рыб, особенно лососей (например, форели) и чукучановых. Лучше всего это явление изучено у форели *Salmo irideus*, обладающей четырьмя формами гемоглобина (Brunori, 1975).

Классификация гемоглобинов форели, обозначаемых как Hb I—IV, основана на их относительной электрофоретической подвижности. Мы ограничимся сравнением Hb-I и Hb-IV, которые сильно различаются по своим функциональным свойствам и могут служить хорошим примером «разделения труда» между разными вариантами гемоглобина. Основные особенности Hb-I и Hb-IV представлены в табл. 9-2. Главное, что отличает эти гемоглобины друг от друга, — это неспособность Hb-I к гетеротропному взаимодействию с лигандами, в то время как у Hb-IV известен целый ряд таких взаимодействий. Hb-I не проявляет эффектов Бора и Рута и не реагирует на органические фосфаты; к тому же связывание этим белком кислорода не зависит от температуры. Свойства Hb-IV, напротив, существенно зависят от величины рН и присутствия органических фосфатов, а на связывание  $O_2$  этой формой заметно влияет температура.

Каково функциональное значение этих двух вариантов гемоглобина, существующих одновременно в одном эритроците?

Таблица 9-2. Свойства «типичных» и «дублирующих» гемоглобинов (в том числе Hb-I и Hb-IV форели). (Вгупогі, 1975)

Функциональные свойства	Hb-I форели	Hb-IV форели
Кооперативность при связывании кислорода	Есть	Есть
Эффект Бора	Нет	Есть
Отношение к АТФ	Нечувствителен	Чувствителен
Теплота оксигенации	Очень низкая	Средняя
Эффект Рута	Нет	Есть

## Аминокислотные последовательности С- и N-концевых участков

Гемоглобин	N-концевой участок	C-концевой участок
<b>α-Цепь</b>		
Hb человека	Val-Leu-Ser-Pro-Ala-	-Ser-Lys-Tyr-Arg
Hb-IV форели	Val(?)	-Lys-Tyr-Arg
Hb-I форели	Ацетил-Ser-Leu-Ser-Ala-Lys-	-Lys-Tyr-Arg
Hb <i>Catastomus</i>	Ацетил-Ser-Leu-Ser-Asp-Lys-	-Gln-Lys-Tyr-Arg
<b>β-Цепь</b>		
Hb человека	Val-His-Leu-Thr-Pro-	-His-Lys-Tyr-His (146)
Hb-I форели	Val(?)	-Ser-Arg-Tyr-Phe
Hb-IV форели	Val-Asp-X-Thr-Asp-	-Arg-Gly-Tyr-His
Hb <i>Catastomus</i>		
(анод)	Val-Glu-Try-Thr-Asp-	-Arg-Gly-Try-His
(катод)	Val-Glu-Try-Ser-Ser-	-Phe

Можем ли мы понять, какие преимущества дает организму наличие Hb-I, который как будто бы не обладает ни одним из качеств, важных, как мы видели, для регуляции процессов связывания и отдачи кислорода? У Hb-IV роль этих регуляторных свойств очевидна. Благодаря выраженному эффекту Бора кислород эффективно высвобождается в дышащих тканях, где этому способствует локальное закисление. Для Hb-IV характерен также очень сильный эффект Рута — насыщение кислородом этой формы Hb в интервале pH около 6,5 не достигает 100% даже при парциальном давлении O<sub>2</sub>, равном 1 атм (Вгупогі, 1975); это, по-видимому, особенно важно для переноса кислорода в плавательный пузырь. Одновременное уменьшение сродства Hb-IV к кислороду и его кислородной емкости, обусловленное снижением pH крови в сосудах плавательного пузыря, способствует освобождению кислорода и переходу его в полость пузыря. Мы видим, таким образом, что Hb-IV форели

хорошо приспособлен для функционирования в организме быстро плавающей рыбы, которой для регуляции плавучести нужен плавательный пузырь, наполненный газом.

Какова же роль Hb-I, который вместе с функционально сходным Hb-II может составлять 35% всего гемоглобина *S. irideus* (Brunori, 1975)? Гемоглобины типа Hb-I у рыб можно рассматривать в значительной мере как «дублирующие» или «аварийные», которые обеспечивают непрерывное снабжение тканей кислородом в тех случаях, когда гемоглобины типа Hb-IV начинают утрачивать свою эффективность. Такие условия создаются, например, при быстром плавании. Энергичная работа белой мускулатуры за счет анаэробного гликолиза приводит к образованию больших количеств лактата и, как следствие, к резкому снижению pH крови (см. гл. 4). При этом в жабрах существенно затрудняется связывание кислорода с гемоглобином типа Hb-IV, которому свойствен выраженный эффект Бора. Не будь у рыбы гемоглобина вроде Hb-I, нечувствительного к изменениям pH, ей угрожала бы асфиксия. И хотя такие случаи вероятны лишь в короткие периоды интенсивного движения, они могли бы стать гибельными без «аварийной» системы транспорта  $O_2$ . Поскольку Hb-I обладает большим сродством к кислороду, чем Hb-IV (табл. 9-2), он будет больше насыщаться кислородом в жабрах, а выраженная кооперативность связывания и отдачи  $O_2$ , свойственная Hb-I (как и Hb-IV), обеспечит освобождение  $O_2$  в дышащих тканях.

Неспособность Hb-I реагировать на органические фосфаты (АТР или GTP) тоже может иметь адаптивное значение. Брунори (Brunori, 1975) высказал предположение, что нечувствительность Hb-I форели к АТР очень важна для отдачи кислорода тканям. Действительно, представим себе, что случилось бы, если бы Hb-I был столь же чувствителен к АТР, как Hb-IV. В крови, поступающей в ткань с низким pH, кислород быстро высвобождался бы из комплекса с Hb-IV вследствие эффектов Бора и Рута. Но этот дезоксигенированный Hb-IV тотчас связывал бы значительную часть эритроцитарного АТР (этому благоприятствует низкая величина pH и сам факт отщепления кислорода от Hb). При этом Hb-IV отбирал бы АТР у Hb-I, увеличивая тем самым его сродство к кислороду и затрудняя поступление кислорода в ткани. Это повышение сродства к кислороду было бы, разумеется, невыгодным в условиях, требующих отдачи  $O_2$  тканям. Таким образом, нечувствительность Hb-I форели к АТР можно рассматривать как важную адаптивную особенность, обеспечивающую непрерывность поступления кислорода в ткани при низкой величине pH, т. е. в условиях, благоприятствующих связыванию АТР с Hb-IV вследствие эффектов Бора и Рута.

И наконец, Hb-I обладает еще одним полезным свойством: связывание им кислорода не зависит от температуры. У экотермных животных такие гемоглобины могут в какой-то мере компенсировать влияние колебаний температуры тела на систему доставки кислорода тканям. Рассмотренный выше Hb-I форели в этом отношении отнюдь не уникален. Аналогичные свойства проявляют и гемоглобины таких «теплокровных» рыб, как тунцы и некоторые акулы (Rossi-Fanelli, Antonini, 1960; Andersen et al., 1973). Независимость связывания и отдачи кислорода от температуры имеет для этих рыб большое значение, так как предотвращает нарушение этих процессов при переходе крови из жабр (где температура такая же, как у окружающей воды) во внутренние ткани (температура которых примерно на 15° выше). Одновременно создаются условия для надежной регуляции отдачи кислорода обычными факторами (например, протонами или органическими фосфатами). Если бы гемоглобины этих рыб были так же чувствительны к колебаниям температуры, как гемоглобины большинства других животных (например, у Hb-A  $Q_{10}$  для величины  $P_{50}$  составляет почти 2), то по мере согревания холодной крови значительные количества кислорода высвобождались бы, не доходя до особенно нуждающихся в  $O_2$  внутренних тканей. Особенно серьезные трудности возникли бы в связи с работой противоточных теплообменников, имеющихся у этих рыб: в случае обычной чувствительности гемоглобина к температуре здесь были бы неизбежны потери артериального кислорода за счет его перехода в венозную кровь.

Наряду с рассмотренными выше известны и другие гемоглобины рыб, которые в отличие от «типичных» гемоглобинов нечувствительны к рН и органическим фосфатам. Гемоглобины, аналогичные Hb-I форели, есть у многих очень активных рыб. Например, у *Catostomus clarkii*, обитающего в быстрых ручьях, имеется вариант гемоглобина, не проявляющий эффекта Бора (Powers, 1972). Однако такого варианта нет у представителей другого подрода (*Pantosteus*), населяющих тихие пруды. Таким образом, появление «аварийных» гемоглобинов у высокоактивных рыб может служить хорошим примером конвергентной эволюции на молекулярном уровне. Это относится и к структуре, и к функции таких белков.

Мы уже обсуждали вопрос об аминокислотных остатках, определяющих зависимость функции гемоглобина от рН. Имеющиеся данные позволяют предсказать, какого рода замены аминокислот скорее всего приведут к потере способности реагировать на изменения рН; можно ожидать, что важную роль будет играть замена концевых остатков гистидина и валина. Именно эти остатки заменены в Hb-I форели и «аварийном» ге-

моглобине *C. clarkii* (см. табл. 9-2). Валин в этих гемоглобинах замещен на ацетилированный серин, так что в молекуле нет концевой аминогруппы, способной связывать протоны и ответственной, как известно, за эффект Бора и связывание органических фосфатов. В Hb-I, кроме того, С-концевой остаток гистидина (146)  $\beta$ -цепи заменен остатком фенилаланина, т. е. устранен и второй источник эффекта Бора. Вместе с тем исчезает и главная причина зависимости связывания  $O_2$  от температуры (изменение энтальпии при отщеплении протона от имидазольной группы составляет примерно 6—7 ккал/моль). Особые функциональные свойства таких гемоглобинов, как Hb-I форели, могут отчасти определяться и заменой ряда других аминокислот, однако следует подчеркнуть, что функция заметно изменяется уже при замене рассмотренных выше концевых аминокислот в  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях, при которой *изменение первичной структуры составляет меньше 1%*.

*Смена гемоглобинов в процессе развития кижуча (Oncorhynchus kisutch).* Множественность гемоглобинов характерна не только для взрослых рыб, сталкивающихся иногда с трудностями в снабжении тканей кислородом, но и для многих организмов, которые в разные периоды жизненного цикла находятся на совершенно различном кислородном «пайке». Большинству читателей известны так называемые фетальные (эмбриональные) гемоглобины, обнаруженные у человека и у других эндотермных и эктотермных видов, получающих на эмбриональной стадии значительно меньше кислорода, чем во взрослом состоянии. Свойства типичного фетального гемоглобина в сравнении с гемоглобином взрослого типа представлены на рис. 9-1, Б. Как правило, фетальный гемоглобин обладает большим сродством к кислороду, благодаря чему он может успешно конкурировать за  $O_2$  с гемоглобином материнской крови. Подобно тому как миоглобин способен извлекать кислород из оксигемоглобина циркулирующей крови, фетальные гемоглобины, лучше связывающие кислород, могут забирать его из крови матери и переносить в кровеносную систему плода.

Различия между гемоглобинами, специфичными для определенных стадий развития кижуча, кое в чем сходные с различиями между классическими гемоглобинами млекопитающих, отражают изменение условий жизни молоди и взрослых рыб (Giles, Randall, 1980). В табл. 9-3 суммированы главные функциональные различия гемоглобинов малька и взрослой особи *O. kisutch*. Гемоглобины малька отличаются необычайно высоким сродством к кислороду (подобно другим гемоглобинам фетального типа), большой теплотой оксигенации и сильно выраженным эффектом Бора. Свойства гемоглобинов взрослого кижуча, напротив, мало зависят от температуры и рН, для них

характерно более высокое значение  $P_{50}$ . Каковы же функциональные преимущества этих вариантов гемоглобина?

Температура среды, окружающей взрослого кижуча и других подобных ему рыб на протяжении миграции, как правило, варьирует в широких пределах; организм рыбы должен к тому же «справляться» со значительными изменениями pH крови и тканей в связи с большими мышечными нагрузками при преодолении быстрого течения реки. Поэтому относительную независимость свойств гемоглобинов этих рыб от температуры и pH можно считать ценной адаптацией (Giles, Randall, 1980),

Таблица 9-3. Функциональные свойства гемоглобинов взрослого кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) и его малька. (Giles, Randall, 1980)

Функциональная характеристика	Нб малька	Нб взрослой особи
Эффект Бора	Очень сильно выражен	Проявляется
Величина $P_{50}$	Очень низкая	Типичная для взрослых лососевых
Модулирующее действие АТФ	Не исследовано	Очень слабое
Теплота оксигенации	Очень высокая	Умеренная

которая обеспечивает, как и у форели, их функционирование в широком диапазоне физиологических условий. Особенности гемоглобина малька (более выраженный эффект Бора, повышенное сродство к кислороду, большая зависимость связывания  $O_2$  от температуры) тоже имеют адаптивное значение — обеспечивают транспорт кислорода в условиях большей, чем у взрослого организма, скорости его потребления (на единицу массы тела), которая у малька в несколько раз выше, чем у взрослой рыбы. Между тем относительное количество крови в организме малька и взрослой рыбы примерно одинаково. Снабжение тканей кислородом можно было бы улучшить, ускорив работу сердца, однако это вряд ли было бы оптимальным решением (хотя бы из-за энергетических затрат). Поэтому предположение о том, что именно особенности гемоглобина мальков обеспечивают лучшее снабжение их тканей кислородом (Giles, Randall, 1980), кажется оправданным и заслуживает изучения. Гемоглобин малька, обладая высоким сродством к кислороду, полностью насыщается им в жабрах; в тканях с интенсивным дыханием он эффективно отдает кислород благодаря выраженному эффекту Бора. Сравнительное изучение

различных по величине млекопитающих выявило сильную отрицательную корреляцию между эффектом Бора (изменением  $P_{50}$  при сдвиге pH на единицу) и размерами животного (Riggs, 1960). У мелких животных, у которых относительная интенсивность метаболизма очень высока, эффект Бора обычно выражен намного сильнее; мелкие и крупные млекопитающие по этому признаку различались более чем в два раза (рис. 9-2).

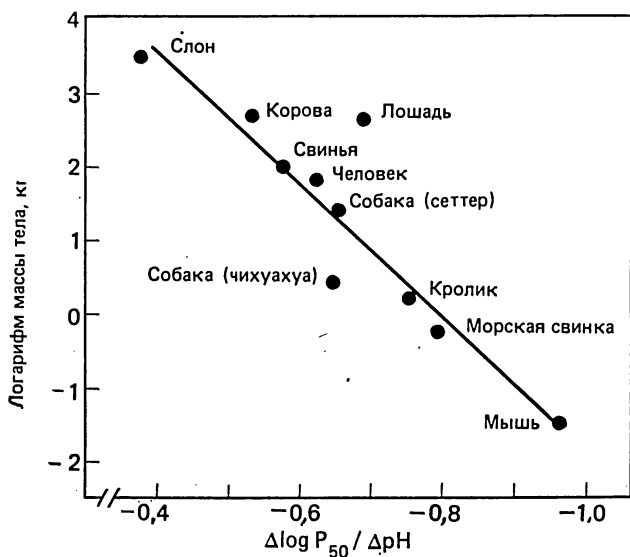


Рис. 9-2. Взаимосвязь между выраженностью эффекта Бора у гемоглобинов различных млекопитающих и размерами тела. (Riggs, 1960, с изменениями; с некоторыми видоизменениями по Journal of General Physiology [1960], 43, 737—752. Воспроизводится с разрешения Rockefeller University Press.)

*Обратный эффект Бора на примере гемоглобина Amphiuma means.* До сих пор мы обсуждали «положительный» эффект Бора — уменьшение сродства гемоглобина к  $O_2$  при уменьшении величины pH в пределах физиологических величин. Однако при очень низких pH (<6) многие гемоглобины проявляют обратный эффект Бора: закисление среды приводит к возрастанию их сродства к  $O_2$ . Хотя в большинстве случаев физиологическое значение обратного эффекта Бора невелико, известны гемоглобины (и гемоцианины, см. ниже), у которых увеличение сродства к кислороду при очень низких pH может быть важным адаптивным свойством. К их числу относится гемоглобин примитивного земноводного *Amphiuma means* (C. Bonaventura et al., 1977). Единственная выявленная у амфиумов форма гемо-



глобина в отсутствие модуляторов (органических фосфатов) проявляет выраженный обратный эффект Бора (рис. 9-3). Отклонение свойств этого гемоглобина от «нормы» связывают с особыми условиями жизни, создающимися при понижении уровня воды в водоеме. В такие периоды животное зарывается в ил, где находится в состоянии оцепенения. Предполагают (Bonaventura et al., 1977), что рН крови и содержание в ней

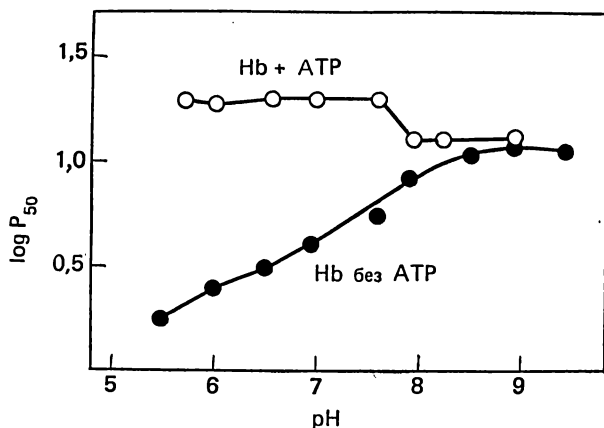


Рис. 9-3. Изменение  $P_{50}$  гемоглобина примитивной саламандры *Amphiuma means* в зависимости от pH (С. Bonaventura et al.). Обратите внимание, что после удаления аллостерического модулятора (АТФ) проявляется отрицательный эффект Бора:  $P_{50}$  уменьшается при снижении pH. (С. Bonaventura et al., Nature [1977], 265, 474—476. Copyright 1977, Macmillan Journals Limited.)

органических фосфатов в таких условиях должны быть относительно низкими: анаэробный метаболизм будет приводить к ацидозу и к снижению синтеза фосфата-модулятора — АТФ, который образуется в эритроцитах амфиумы в процессе окислительного фосфорилирования. Низкое значение pH и соответственно низкая концентрация АТФ в эритроцитах должны повышать способность гемоглобина к связыванию кислорода, что будет полезным в условиях недостатка  $O_2$  в толще ила.

Еще не вполне ясно, какие изменения первичной структуры у гемоглобина амфиумы ответственны за обратный эффект Бора. Одно из главных отличий его молекулы от гемоглобинов с положительным эффектом Бора — то, что в его  $\beta$ -цепи отсутствует С-концевой гистидин ( $\beta$ -146). Как уже говорилось, этот остаток играет важную роль в положительном эффекте Бора. Детальное изучение кинетики связывания и отдачи кислорода при разных значениях pH показало, что в этом отноше-

нии гемоглобин амфиумы существенно отличается от большинства других Hb (Bonaventura et al., 1977). Типичный гемоглобин с положительным эффектом Бора при подкислении среды медленнее связывает кислород и быстрее отдает его, тогда как гемоглобину амфиумы свойственна обратная зависимость.

Рассмотренные примеры адаптивных изменений гемоглобина [о других случаях см. The American Zoologist, vol. 20(1), Johansen, Weber, 1976; Bonaventura J. et al., 1977] показывают, сколь разнообразны свойства этих белков, функционирующих при различном напряжении кислорода в окружающей среде и различных физиологических состояниях организма, будь то покой или повышенная активность. Существует, однако, множество других адаптаций системы кислородного транспорта, связанных не с образованием новых вариантов гемоглобина, а с изменением его концентрации или микроокружения его молекул внутри эритроцитов. Рассмотрим некоторые примеры, относящиеся к последним видам адаптации; как мы увидим, они играют важную роль и в эволюции гемоглобинов, и в относительно быстрых процессах акклимации организма к изменению напряжения кислорода в окружающей среде.

### Адаптивная модуляция свойств гемоглобинов

*Система транспорта кислорода у Fundulus: адаптивные изменения ферментов повышают эффективность работы гемоглобина.* Адаптация гемоглобина, достигаемая путем изменений концентрации модулятора (АТР), лучше всего изучена у рыбки *Fundulus heteroclitus* (Greaney, Powers, 1978; Powers et al., 1979). Исследователи интересовались не только адаптацией этих рыб к кратковременной гипоксии, но и генетически детерминированными различиями систем транспорта кислорода в популяциях этого вида, обитающих на разных широтах. При акклимации *F. heteroclitus* к условиям гипоксии происходит два изменения, касающихся эритроцитов (рис. 9-4): возрастает их общее количество, что ведет к увеличению кислородной емкости крови, и одновременно снижается концентрация АТР, а в результате — и величина  $P_{50}$ . Рассмотрение этих эффектов, обнаруженных также и у других водных животных при акклимации к низкому напряжению кислорода в окружающей среде (обзор: Johansen, Weber, 1976), показывает, что адаптивные изменения системы транспорта  $O_2$  могут не сопровождаться синтезом новых вариантов Hb — изменяются лишь концентрации модулятора и гемоглобина.

При изучении популяций *F. heteroclitus*, обитающих на разных широтах (т. е. при разных температурах) была выявлена важная генетическая компонента в адаптации к различному

содержанию  $O_2$  в среде. Широтная адаптация достигается путем синтеза различных форм белков, но популяции различаются не по гемоглобину, а по изотиму лактатдегидрогеназы, содержащемуся в эритроцитах (ЛДГ-В,  $H_4$ -ЛДГ) (Powers et al., 1979). В эритроцитах *Fundulus* содержится лишь один тип

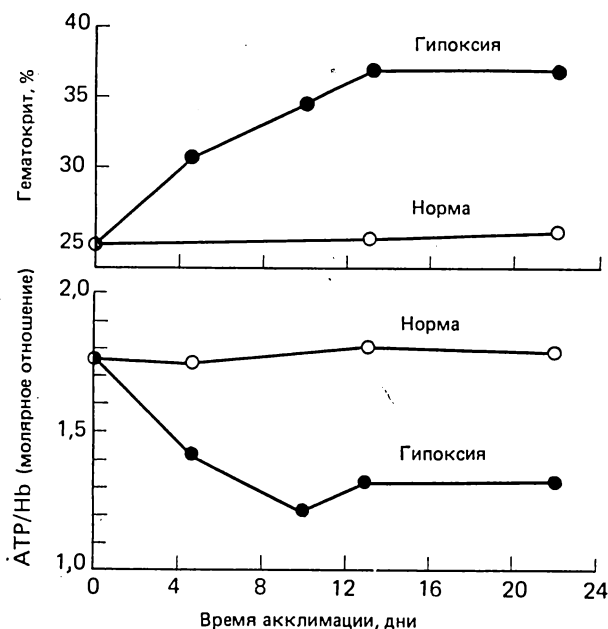


Рис. 9-4. Изменения свойств крови у рыбы *Fundulus heteroclitus* при акклимации к гипоксии (по Greaney, Powers, 1978). *Вверху*: изменение гематокрита. *Внизу*: изменение отношения концентрации аллостерического модулятора (АТР) к концентрации гемоглобина. Обратите внимание на то, что при акклимации к гипоксии изменяется как количество Нб в циркулирующей крови (гематокрит), так и относительное количество АТР, приходящееся на одну молекулу Нб.

ЛДГ — «сердечный» (В), причем выявлены два его варианта, различающиеся по электрофоретической подвижности и по кинетике (Place, Powers, 1979): аллозим «а» чаще встречается в южных популяциях, адаптированных к теплу, а аллозим «b» — в северных. Такое распределение частот соответствующих генов, по-видимому, должно обеспечивать надлежащие концентрации АТР в эритроцитах (рис. 9-5). Так, в эритроцитах гомозиготных особей *bb* концентрация АТР выше, чем у гомозигот *aa*, а гетерозиготы *ab* занимают промежуточное положение. Величина  $P_{50}$  заметно различается в этих трех группах и кор-

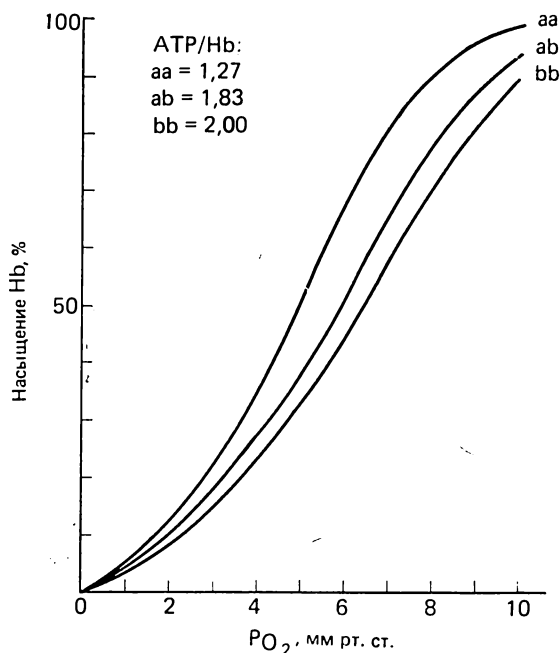


Рис. 9-5. Кривые насыщения кислородом цельной крови особей *Fundulus heteroclitus* с разными генотипами по лактатдегидрогеназе (ЛДГ) (по данным Powers et al., 1979). Генотип *aa* чаще встречается в низких широтах, где вода теплее; у его обладателей меньше отношение АТР : Hb и, следовательно, больше сродство Hb к кислороду (меньшая величина  $P_{50}$ ) по сравнению с обладателями генотипов *ab* и *bb*. (По Powers et al., Nature [1979], 277, 240—241. Copyright 1979, Macmillan Journals Limited.)

релирует с концентрацией АТР (рис. 9-5). Важно подчеркнуть, что отмеченные различия в  $P_{50}$  наблюдаются именно на интактной крови, в которой гемоглобин не «очищен» от модулятора. Поскольку во всех популяциях гемоглобин одного типа, наблюдаемые различия в  $P_{50}$  могут быть обусловлены только влиянием модулятора.

Пока не ясно, какова причинная связь между генотипом по лактатдегидрогеназе и концентрацией АТР. Известно, однако, что скорость превращения субстрата в реакции, катализируемой ЛДГ, при генотипе *bb* гораздо выше, чем в при генотипе *aa*, и этим различием могла бы определяться скорость синтеза АТР в эритроцитах, содержащих различные аллозимы (Plase, Powers, 1979), по крайней мере в случае инкубации эритроцитов при одинаковой температуре. В этой гипотезе предполагается, что значительный вклад в энергетический метаболизм эрит-

роцитов *Fundulus* вносит окисление лактата. Лактат, образующийся в работающих мышцах, мог бы поглощаться эритроцитами и служить здесь источником энергии для синтеза АТР. Водород, отщепленный от лактата при его превращении в пируват, мог бы поступать в митохондриальную систему окислительного фосфорилирования, а пируват — либо сжигаться в цикле трикарбоновых кислот (хотя активность этого цикла в эритроцитах *Fundulus* порою очень низка; Greaney, Powers, 1977), либо возвращаться в кровь (а затем в мышцы или другие ткани, нуждающиеся в акцепторе водорода). Но каков бы ни был конкретный механизм действия ЛДГ в эритроцитах *Fundulus*, весьма возможно, что адаптивные изменения скорости реакции, катализируемой ЛДГ, поддерживают концентрацию АТР в эритроцитах на уровне, оптимальном для функционирования гемоглобина. Таким образом, различные аллозимы ЛДГ в северных и южных популяциях можно рассматривать как адаптивные по отношению к температуре (компенсирующие влияние температуры на скорость реакции, см. гл. 11), и в то же время они адаптивны и в отношении содержания кислорода в воде, растворимость которого на разных широтах тоже определяется температурой.

*Модуляция функции гемоглобина у угря.* Обычный европейский угорь *Anguilla anguilla*, так же как и *Fundulus*, обитает в местах, где возможны периоды гипоксии. Исследования показали (Wood, Johansen, 1972, 1973, 1974), что при акклимации к гипоксии у угря, как и у *Fundulus*, система транспорта кислорода кровью адаптируется путем изменения гематокрита и концентраций органических фосфатов. У особей, акклимированных к гипоксии, кислородная емкость крови увеличена примерно на 50%, а величина  $P_{50}$  снижена с 16,6 до 10,6 мм рт. ст. Изменение  $P_{50}$  отчасти обусловлено уменьшением относительного (в расчете на 1 молекулу Hb) содержания органических фосфатов в эритроцитах; аналогичный эффект наблюдается и у *Fundulus* (рис. 9-4 и 9-5). Наряду с этим изменяется также концентрация водородных ионов в эритроците (Wood, Johansen, 1972—1974): для поддержания зарядового равновесия она должна уменьшаться, когда содержание в клетке АТР и ГТР снижается (напомним, что плазматическая мембрана непроницаема для этих молекул). Увеличение pH ведет к повышению сродства гемоглобина к  $O_2$ . Как полагают (Johansen, Weber, 1976), такой опосредованный механизм действия органических фосфатов более важен для регуляции сродства Hb к кислороду, чем само по себе изменение концентраций АТР и ГТР.

*Постнатальные изменения концентраций модуляторов.* В связи с различиями в доступности кислорода для эмбриона

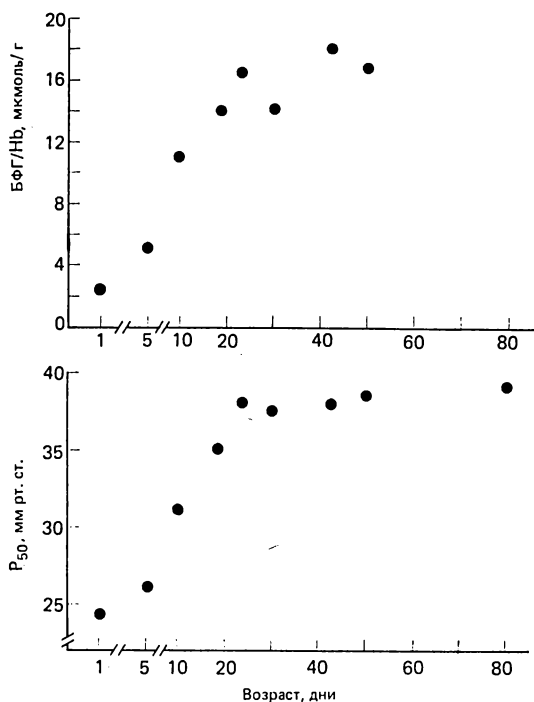


Рис. 9-6. Отношение между концентрацией 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-БФГ) в крови и способностью Нб связывать кислород ( $P_{50}$ ) на разных этапах постнатального развития крысы (по данным Dhindsa et al., 1981). (Воспроизводится с разрешения Dhindsa et al. Copyright 1981, Pergamon Press Ltd.)

и для взрослого организма на этих стадиях нередко функционируют различные формы гемоглобина — «фетальный» гемоглобин и гемоглобин взрослого типа (см. рис. 9-1, Б); первый из них, как правило, отличается более высоким сродством к кислороду. Однако аналогичные различия в оксигенации интактной крови на разных стадиях онтогенеза могут обеспечиваться и изменениями концентраций модуляторов. Эта альтернативная стратегия играет важную роль у некоторых животных.

На рис. 9-6 показаны изменения концентрации 2,3-БФГ и величины  $P_{50}$  крови в начале постнатальной жизни крысы (Dhindsa et al., 1981). Параллельно с увеличением концентрации 2,3-БФГ возрастает и  $P_{50}$ . Концентрация 2,3-БФГ увеличивается с 2,53  $\mu\text{моль/г}$  Нб у новорожденного крысенка до 13,93  $\mu\text{моль/г}$  Нб у взрослого животного. Одновременно  $P_{50}$  изменяется с 24,6 до 38,7 мм рт. ст. В данном случае, как

и в ряде других примеров адаптации систем транспорта  $O_2$ , один и тот же результат — приспособление к условиям среды — достигается разными способами: путем изменения концентрации модуляторов или же путем смены вариантов гемоглобина.

### Адаптация дыхательных белков у беспозвоночных

Наше внимание в этой главе было сосредоточено в основном на тетрамерных гемоглобинах позвоночных, так как они изучены гораздо лучше, чем дыхательные белки беспозвоночных животных — гемоглобины, гемоцианины и гемоэритрины (см. табл. 9-1). К счастью, исследование этих белков в последнее время тоже существенно продвинулось вперед, и хотя многие важные вопросы еще не получили разрешения (краткий перечень «главных нерешенных вопросов», относящихся к дыхательным белкам, приведен в работе Bonaventura, Wood, 1980), здесь мы находим те же основные виды адаптации, что и у позвоночных.

Главный вывод из сравнительного изучения дыхательных белков самых разнообразных животных состоит, вероятно, в том, что эти белки, столь различные по своей эволюционной истории, молекулярной массе и содержащимся в них металлам, очень сходны между собой по способам адаптации. Дыхательные белки всех классов обладают надлежащими регуляторными свойствами, сродством к кислороду и кислородной емкостью. Подобно гемоглобину и миоглобину позвоночных, гемоэритрины некоторых беспозвоночных представлены рядом вариантов с различным сродством к кислороду, специфически адаптированных к работе в том или ином компартменте тела животного. У сипункулиды *Themiste zosteriolum* сродство к кислороду сосудистого гемоэритрина ниже, чем целомического (Manwell, 1960). Оксигенация крови происходит в щупальцах животного, где сосудистый гемоэритрин присоединяет кислород, а затем целомический гемоэритрин легко извлекает этот кислород из крови.

Межвидовые различия дыхательных белков беспозвоночных по величине их сродства к кислороду отражают различия парциального давления  $O_2$  в соответствующих местообитаниях. Например, сосудистые гемоглобины полихет (эритрокруорины) различаются по величине  $P_{50}$  в зависимости от того, обитает ли вид в условиях гипоксии или в хорошо аэрируемой среде. Например, у *Marphysa sanguinea*, живущих в норках с относительно неподвижной водой, величина  $P_{50}$  эритрокруорина значительно ниже, чем у *Diopatra cupres*, трубки которых интенсивно вентилируются (Weber et al., 1978).

Еще одно общее свойство многих дыхательных белков раз-

ных типов — это наличие как обычного, так и обратного эффекта Бора. И хотя не все представители того или иного класса этих белков проявляют такой эффект, регуляция их сродства к кислороду путем изменения активности протонов встречается во всех классах достаточно часто. Известны случаи конвергентной эволюции таких белков. Например, гемоцианин мечехвоста *Limulus polyphemus* проявляет обратный эффект Бора подобно гемоглобину *Amphiuma* (см. рис. 9-3) (Bonaventura, Bonaventura, 1980). И то и другое животное способно переживать длительные периоды гипоксии, зарывшись в ил; по-видимому, они «нашли» одно и то же решение проблемы снабжения организма кислородом в этих условиях.

Влияние акклимации на дыхательные белки разных классов тоже может быть сходным. Например, при температурной акклимации у рака *Pacifastacus leniusculus* (Rutledge, 1981) происходят, по-видимому, адаптивные изменения функции гемоцианина: у особей, акклимированных к теплой воде (25°C), сродство гемоцианинов к кислороду выше, чем у акклимированных к холоду (10°C). Такое различие в сродстве дыхательных белков к кислороду должно компенсировать меньшую концентрацию  $O_2$  в теплой воде. Молекулярные основы механизма, обуславливающего сдвиг  $P_{50}$  при акклимации, неизвестны; возможно, что здесь играет роль изменение свойств дыхательных белков под влиянием модуляторов или смена вариантов гемоцианина.

Одно из различий между гемоглобинами позвоночных и дыхательными белками беспозвоночных, по-видимому, касается роли низкомолекулярных органических модуляторов, влияющих на их сродство к кислороду. Остается неясным, в какой мере связывание  $O_2$  гемоцианином и гемоэритрином зависит от органических фосфатов, таких как АТР, ГТР и 2,3-БФГ. Однако свойства этих белков нередко сильно изменяются в присутствии неорганических ионов (особенно двухвалентных, таких как  $Ca^{2+}$ ), которые влияют на их сродство к кислороду, участвуя в агрегации субъединиц этих белков (Bonaventura et al., 1977). Таким образом, если функция гемоглобинов позвоночных лишь отчасти определяется равновесием между тетрамерной и димерной формами, то для гемоцианинов обратимая полимеризация субъединиц, по-видимому, является особо важным способом регуляции газообменных функций.

### Общие итоги изучения дыхательных белков

На примере механизмов, обеспечивающих транспорт газов в весьма разнообразных условиях, можно четко проиллюстрировать все основные стратегии адаптации, обсуждаемые в этой



книге. Многие из этих механизмов, как известно, связаны с изменением структуры дыхательных белков, и следует сказать, что не так много белков, для которых была бы столь же четко прослежена связь между структурой и функцией. Мы уже отмечали, что даже сравнительно небольших изменений в первичной структуре может быть достаточно, чтобы радикально изменить функциональные свойства дыхательных белков, например гемоглобинов позвоночных. Лишь малая доля аминокислотных остатков участвует в создании эффекта Бора и во взаимодействии дыхательного белка с органическими фосфатами. Поэтому большая часть аминокислотных замен не скажется на функции белка (они «нейтральны» с точки зрения отбора), тогда как замена остатков, ответственных за регуляторные свойства белковой молекулы, находится под сильным селективным давлением. Тот факт, что замена всего лишь нескольких аминокислот может существенно влиять на регуляторную функцию дыхательного белка, позволяет предполагать высокую степень пластичности процессов его адаптации и эволюции. Таким образом, механизм адаптивного изменения систем дыхательных белков может быть относительно простым и сводиться всего лишь к замене одной или нескольких аминокислот. Это подчеркивают Перутц и др. (Perutz et al., 1981), обсуждая необычные аллостерические свойства гемоглобина крокодилов. Функции этого белка не модулируются ни органическими фосфатами, ни присоединением  $\text{CO}_2$  с образованием карбамата, но сильно изменяются под влиянием бикарбоната-иона ( $\text{HCO}_3^-$ ). Как показали Перутц и его сотрудники, эти особенности можно объяснить заменой всего лишь пяти аминокислот, для которой требуется замена только семи нуклеотидов; и хотя гемоглобин крокодила отличается от человеческого примерно сотней аминокислот, соответствующие замены в большинстве своем оказываются консервативными и вряд ли влияют на присоединение  $\text{O}_2$  и его регуляцию. Анализ связи между структурой и функцией на столь высоком уровне разрешения может быть весьма полезным при обсуждении вопроса об относительном числе «нейтральных» и «селективно важных» замен аминокислот в белках. На основании такого анализа можно хотя бы качественно оценить масштабы перестройки белка, необходимой для адаптивного изменения его функциональных свойств.

Данные о гемоглобинах позвоночных проливают свет и на жизненно важную роль изменений той среды, в которой функционируют макромолекулы. Как выяснилось, во многих случаях, когда доступность кислорода для организма варьирует в широких пределах, адаптация функции гемоглобинов достигается путем изменения концентраций модуляторов — органиче-

ских фосфатов. Хотя метаболические схемы регуляции содержания органических фосфатов в клетке у разных видов различны и ни в одном случае до конца не выяснены, есть веские основания думать, что эволюция дыхательных белков и эволюция путей синтеза органических фосфатов — это две стороны единого процесса. Например, рассмотренная выше связь между фенотипом по лактатдегидрогеназе и концентрацией АТФ в эритроцитах *Fundulus heteroclitus* позволяет предполагать, что полиморфизм ферментов играет ведущую роль в тонком регулировании функции дыхательных белков. При попытках понять значение полиморфизма ферментов следует придерживаться важного эвристического принципа — рассматривать проблему достаточно широко. Полиморфизм того или иного фермента может, строго говоря, не быть адаптивным с точки зрения общего метаболизма клетки (например, в плане компенсации влияния температуры среды), но составлять часть иерархической системы, в которой изменения ряда метаболических реакций направлены на поддержание определенной функции, например транспорта газов. В связи со спором между «нейтралистами» и «селекционистами» нужно сказать, что вопрос о роли полиморфизма ферментов следует обсуждать в более широком контексте, чем это делалось прежде.

Какие выводы об адаптации и эволюции «белков вообще» можно сделать на основании рассмотренных данных о дыхательных белках? Действительно ли численное отношение между «нейтральными» и «селективно важными» вариациями, установленное для одних белков, относится и к другим белкам? Не следует ли высокий уровень полиморфизма дыхательных белков объяснять их специфическими функциями? Мы можем попытаться ответить на эти вопросы, рассмотрев одно из важнейших различий между ферментами и дыхательными белками.

В этой книге мы неоднократно подчеркивали относительное постоянство внутриклеточных концентраций субстратов в разных тканях, в клетках разного типа и у разных животных. Например, в покое различия между концентрациями пирувата в скелетных мышцах рыб, земноводных, рептилий и млекопитающих (см. табл. 11-5) не превышают трехкратных. Точно так же значения соответствующих кажущихся констант Михаэлиса у различных животных довольно близки. Малая изменчивость обоих параметров (тесно связанных между собой) определяется, конечно, тем, что для эффективной регуляции метаболизма необходимо поддерживать концентрации субстратов ниже уровня насыщения.

В тех ситуациях, когда адаптивные изменения дыхательных белков наиболее очевидны, для этих белков характерны иные,

чем для ферментов, взаимоотношения между концентрацией «субстрата» (кислорода) и функционированием белка. Концентрация кислорода в различных местообитаниях варьирует в широких пределах, а у некоторых животных она неодинакова и в разных компартментах тела. Подобно тому как величина  $K_m$  фермента согласована с концентрацией субстрата, способность дыхательных белков связывать кислород должна быть такой, чтобы облегчать его присоединение и отдачу в надлежащих условиях. Однако различия в доступности кислорода для разных животных (а часто и на разных стадиях развития данного вида) достаточно велики, и очевидно, что дыхательные белки не могут иметь во всех случаях одинаковое сродство к кислороду. В связи с этим следует ожидать образования адаптивных форм дыхательных белков, различающихся по величине  $P_{50}$ . Этот тип адаптации наглядно прослеживается при сравнении фетальных гемоглобинов с гемоглобинами взрослого типа и различных вариантов гемоэритрина сипункулиды *Themiste zostericolum* (Manwell, 1960). Потребность во множественных формах дыхательных белков зависит от того, в какой мере варьирует доступность кислорода. Отбор таких форм белков следует отличать от отбора вариантов, различающихся по регуляторным свойствам. Как у ферментов, так и у дыхательных белков способность реагировать на аллостерические модуляторы изменяется в процессе эволюции независимо от адаптивных изменений, приводящих к оптимальной зависимости между концентрацией субстрата (или кислорода) и сродством к нему белка.

Адаптивные различия в регуляторных свойствах гемоглобинов в основном зависят от немногих аминокислотных остатков, большая же часть замен аминокислот, по-видимому, не будет влиять на транспорт кислорода. В связи с этим можно высказать некоторые предположения об эволюции «белков вообще». Сравнительный анализ первичной структуры многих белков двух и более видов животных показал, что в молекулах ферментов одни участки весьма консервативны, тогда как другие очень изменчивы. Различия в активных центрах (каталитических и регуляторных), как правило, редки, но, когда они есть, обычно имеются и функциональные различия. Вопрос об участках, определяющих взаимодействие отдельных субъединиц олигомерного белка, остается пока открытым и нуждается в дальнейшем изучении. До сих пор ни о дыхательных белках, ни о ферментах нет достаточного количества сравнительных данных, которые позволили бы ясно представить себе, в чем состоит адаптация зон контакта между субъединицами белков, функционирующих, например, при разных температурах и давлениях. В главах, посвященных адаптации к этим двум физи-

ческим переменным, отмечается, что параметры полимеризации мышечного актина соответствуют тем физическим условиям, с которыми сталкивается данный вид (см. гл. 11 и 12). Различия в энергетике полимеризации могли бы быть связаны со строением контактирующих участков субъединиц и(или) с неодинаковой структурной стабильностью этих субъединиц, зависящей от многих аминокислотных остатков в самых разных частях молекулы. В связи с этим возникает вопрос: различаются ли дыхательные белки, приспособленные к разным физическим условиям, по энергетике полимеризации? Если да, то где находятся аминокислотные остатки, ответственные за эти различия, — только в зонах контакта субъединиц или же во многих участках молекулы? Ответив на этот и другие поставленные выше вопросы, мы сможем лучше понять соотношение между «нейтральными» и «селективно важными» заменами аминокислот. Кажется возможным и даже вероятным, что некоторые замены, функциональное значение которых пока не выявлено, в действительности могут играть важную роль в формировании хотя и небольших, но существенных для адаптации различий во взаимодействии белковых субъединиц.

В заключение следует сказать, что более детальное изучение связи между структурой дыхательных белков и их функцией, весьма возможно, приведет к большому прогрессу в понимании «конструкции» белковых молекул. Замены/ аминокислот, лежащие в основе различий в регуляторных свойствах дыхательных белков, в их кислородной емкости и во взаимодействии их субъединиц, уже дают представление о механизмах взаимосвязи структуры и функции белков. Понимание этой взаимосвязи в свою очередь важно для разрешения многих принципиальных вопросов биохимической адаптации, особенно вопроса о роли полиморфизма белков в этом процессе.

# Адаптации, связанные с водными растворами: эволюционные и регуляторные аспекты

## Введение

Рассматривая состав внеклеточных и внутриклеточных жидкостей организма и способы регуляции этого состава, мы сталкиваемся с фактом первостепенной важности: биологический раствор в химическом отношении всегда отличается от окружающей среды. Из этого факта в свою очередь вытекает ряд чрезвычайно важных следствий, подробно обсуждаемых ниже. Прежде всего биологические растворы и окружающая среда не находятся между собой в равновесии, а это означает, что могут потребоваться значительные затраты энергии, чтобы предотвращать физиологически невыгодные изменения состава внеклеточных и внутриклеточных жидкостей. Многие организмы имеют тенденцию терять или поглощать воду, и им приходится непрерывно поддерживать концентрационные градиенты растворенных в воде веществ, например ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , между собственным телом и внешней средой.

Тот факт, что биологические растворы по своему составу отличаются от морской и пресной воды, указывает на еще одно чрезвычайно важное обстоятельство: накопление в них растворенных веществ определяется не концентрацией тех или иных веществ во внешней среде, а какими-то иными факторами. Как мы покажем в этой главе, растворенные в воде вещества могут резко различаться по своей пригодности — если можно так выразиться, «адапatabельности» — для их использования в биологических системах. Мы увидим, что качественный и количественный состав биологических растворов сложился в ходе эволюции: под влиянием отбора формировалось такое микроокружение для макромолекул (в частности, ферментов), в котором структурные и функциональные свойства этих молекул проявлялись бы оптимальным образом. Изучению молекулярной эволюции на этом уровне — эволюции биологических растворов — до сих пор уделялось поразительно мало внимания. После публикации классического труда Л. Хендерсона «Пригодность среды», в котором обсуждалась «биологическая пригодность» воды и ряда химических элементов, эволюци-

онную биологию интересовали в основном явления более высокого уровня. Наш анализ эволюции биологических растворов будет попыткой восполнить недостаток внимания к той/водной среде, где реализуется большинство биологических функций.

Для того чтобы разобраться в основных свойствах биологических растворов, особенно внутриклеточных жидкостей, целесообразно будет начать с обсуждения трех вопросов:

1. Какого рода вещества и в каких концентрациях содержатся во внеклеточных и внутриклеточных жидкостях?
2. Каковы критерии, определяющие пригодность тех или иных веществ или их комбинаций для включения в состав биологических растворов?
3. Каковы важнейшие регуляторные механизмы избирательной аккумуляции и удержания «подходящих» веществ в биологических растворах?

Наш подход к этим вопросам будет существенно отличаться от традиционного рассмотрения их в руководствах по сравнительной физиологии: мы уделим больше всего внимания второму вопросу и гораздо меньше — остальным, так как состав биологических растворов и механизмы его регуляции подробно рассмотрены в ряде недавно опубликованных книг (Gilles, ed., 1979; Maloiy, ed., 1979). Мы надеемся, что особо углубленный анализ второго из поставленных выше вопросов поможет читателю по-новому взглянуть на биохимию рассматриваемых процессов и лучше разобраться в жизненно важных взаимодействиях между макромолекулами, водой и растворенными в ней низкомолекулярными веществами. Поняв существо этих взаимодействий, свойственных, вероятно, всем живым системам, читатель сумеет оценить возможные достоинства гипотезы, неоднократно высказанной на страницах этой книги. Суть ее состоит в том, что надлежащая регуляция качественного и количественного состава биологических растворов позволяет частично переложить задачи адаптации с макромолекул на низкомолекулярные вещества. Как мы увидим, такое распределение ролей могло бы существенно повлиять на скорость эволюционных процессов, например, при заселении новых местообитаний, значительно отличающихся от прежних по осмотической концентрации.

### **Основные стратегии адаптации к изменению осмотического давления**

Приступая к обсуждению свойств биологических растворов, их эволюции и регуляции, важно прежде всего осознать, что внеклеточные и внутриклеточные жидкости могут отличаться от окружающей среды в количественном и качественном отно-

шении. Если суммарная концентрация водорастворимых веществ в жидкостях тела и в окружающей среде одинакова, то организм находится в осмотическом равновесии со средой, т. е. организм и среда *изоосмотичны*. Если же концентрация растворенных веществ в организме ниже, чем в среде, говорят, что организм *гипоосмотичен*, а если выше, то *гиперосмотичен*. В табл. 10-1 приведены концентрации (и качественный состав) осмотически активных веществ во внутриклеточных жидкостях некоторых прокариот, зеленых растений и животных. Видно, что эти концентрации варьируют в широких пределах. Даже у морских животных встречаются самые различные осмотические отношения со средой: морские беспозвоночные, например, *изоосмотичны*, морские хрящевые рыбы (акулы и скаты) *изоосмотичны* или слегка *гиперосмотичны*, морские костистые рыбы *гипоосмотичны*. Ясно, что проблема осморегуляции не имеет единого оптимального решения. Имеются, однако, и важные черты сходства между морскими животными — и даже всеми животными вообще, большинством растений и бактерий — по качественному составу внутриклеточных жидкостей; и этот важный факт, к которому мы вернемся несколько позже, не должен заслонять от нас количественные различия.

### Качественный состав биологических растворов: основные соображения

Для того чтобы составить всестороннее представление о принципах, лежащих в основе эволюции биологических растворов, нужно сначала ознакомиться со всем «ассортиментом» осмотически активных веществ (осмолитов), которые накапливаются в жидкостях тела. Разнообразие осмолитов, встречающихся у животных, растений и бактерий, поразительно, и может создаться впечатление, что каждый организм эволюционировал по-своему, совершенно не считаясь с принципами, которые вывели в своих теориях физиологи и биохимики. Тем не менее некоторые общие закономерности все же могут быть прослежены. На них мы и остановимся в первую очередь, и лишь затем перейдем к более сложным вещам, в особенности касающимся органических осмолитов (аминокислот, мочевины, метиламинов и углеводов).

Базисным компонентом всех биологических растворов, конечно, является вода. Хендерсон (Henderson, 1913) и позднее Уолд (Wald, 1964) подробно рассмотрели те свойства воды, которые определяют ее пригодность в качестве биологического растворителя (высокая теплоемкость, способность растворять самые разнообразные вещества, низкая плотность льда, величина  $pK$  и др.). Как мы увидим позже, еще одно важное пре-

Таблица 10-1. Внутриклеточные концентрации осмолитов у организмов, различающихся по характеру накапливаемых водорастворимых веществ. (По данным из обзора Уапсеу et al., 1982)

Организмы	Общее содержание осмолитов, ммоль/кг воды		Содержание неорганических ионов, ммоль/кг воды		Содержание органических осмолитов, ммоль/кг воды					
	Клетка	Окружающая среда	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Аминокислоты	Бетанин	Триметиламин-N-оксид	Саркозин	Мочевина	Полнолы (моляльная концентрация)
Осмотические конформеры										
Растения										
Одноклеточные водоросли		4,25 M NaCl								4,4
<i>Dunaliella viridis</i>		2,55 M NaCl								2,4
Многоклеточные виды		0,2 M NaCl			350					
<i>Triglochin maritima</i>		Пресная вода			40	*				
<i>Hordeum vulgare</i>										
Животные (мышечная ткань)										
Беспозвоночные										
<i>Balanus pabilus</i> (морской желудь)	1005	Морская вода	45	169	503	82				
<i>Ertocheir sinensis</i> (краб)	588	Пресная вода	55	71	158	18	47			
	1118	Морская вода	144	146	341	14	75			



<i>Parastichopus</i> sp. (пгложные)	1246	»	71	217	221	208			
<i>Sepia officinalis</i> (моллюск)	1377	»	31	189	483	108	86		
Позвоночные		»	96	140	291		87	2	
<i>Muxine glutinosa</i> (миксина)		Морская вода	30	90			290	422	
<i>Latimeria</i> (целакант)		»	18	130		100	180	333	
<i>Squalus acanthias</i> (колючая акула)		»	7	201			255	604	
<i>Dasyatis americana</i> (скат)		50%-ная морская вода	30	171			186	377	
<i>Raja erinacea</i> (скат)		Морская вода	10	162	214		64	398	
		50%-ная морская вода	4	134	144		36	264	
Зубактерии		1 M NaCl		625					
<i>Klebsiella aerogenes</i>									
Архебактерии		3,4 M NaCl	400—800	4500					
<i>Halobacterium salinarium</i>		5,1 M NaCl	400—800	7500					
Осмотические регуляторы									
Животные: костистые рыбы		Пресная вода	10	157	44		20		
<i>Pleuronectes flesus</i>		Морская вода	15	158	71		30		

\* Точная концентрация в цитозоле неизвестна, так как часть объема клетки занимает вакуоль.

имущество воды — то, что некоторые растворенные вещества влияют на ее свойства и на взаимодействие с ней макромолекул. Поэтому вода будет часто привлекать наше внимание на протяжении всей этой главы.

Вторая особенность едва ли не всех биологических растворов — характерная величина  $pH$ , близкая к нейтральной точке ( $pN$ ) и к  $pK$  имидазольных групп гистидина. Значение этого трудно переоценить. В дальнейшем мы подробно рассмотрим, чем определяется необходимость именно такой величины  $pH$ , и еще раз вернемся к этому вопросу в главе, посвященной действию температуры; здесь же достаточно подчеркнуть, что поддержание  $pH$  в определенных узких границах свойственно всем до сих пор исследованным организмам.

Третья весьма распространенная (но не всеобщая) особенность биологических растворов состоит в том, что во *внутриклеточных* жидкостях поддерживается довольно высокое отношение  $[K^+] : [Na^+]$  (табл. 10-1). Например, у животных внутриклеточные жидкости и кровь заметно различаются по концентрации  $K^+$  и  $Na^+$ . Даже у галофильных бактерий (*Halobacterium halobium* и др.) — организмов с наиболее высокой осмотической концентрацией внутренней среды — ионов  $K^+$  внутри клетки значительно больше, чем  $Na^+$ , и больше, чем в таком же объеме наружной среды. Преимущества такого распределения ионов будут рассмотрены позже.

Довольно распространенная четвертая особенность биологических растворов связана с третьей. Представленные в табл. 10-1 данные, по крайней мере те, которые относятся к животным, показывают, что суммарная внутриклеточная концентрация неорганических ионов относительно постоянна — ее значения близки даже у видов, заметно различающихся по общей осмотической концентрации. Иначе говоря, различия в осмотической концентрации биологических жидкостей отдельных организмов зависят в основном от содержания в них *органических* веществ. Это обобщение подводит нас к вопросу о природе органических растворенных веществ, и в особенности о тех химических и физических факторах, которые определяют их пригодность как осмолитов, накапливаемых в больших количествах во внутриклеточных жидкостях.

### Обзор стратегий накопления органических осмолитов

Мы можем а priori указать ряд факторов, от которых могла бы зависеть пригодность тех или иных органических молекул для поддержания осмотического равновесия между клеткой и средой. Во-первых, эти соединения должны быть доста-

точно «дешевы» и легко доступны. Наиболее экономичными осмолитами были бы отходы метаболизма, такие как, например, мочевина, концентрация которой у морских хрящевых рыб и целаканта *Latimeria halumnae* достигает 400—500 мМ. Однако многие организмы используют в качестве осмолитов свободные аминокислоты и глицерол, которые, безусловно, обходятся «дороже» и к тому же находят другое применение (аминокислоты используются для синтеза белка, глицерол — в энергетическом метаболизме). Очевидно, доступность не является единственным критерием. И действительно, используя одни лишь легко доступные неорганические ионы из окружающей среды, организм не может адаптироваться к осмотическим условиям; по-видимому, малые затраты энергии на накопление тех или иных веществ не являются важным фактором, определяющим состав биологических жидкостей.

Вторым фактором, определяющим пригодность тех или иных соединений как осмолитов, могла бы быть их эффективность, например скорость, с которой при их использовании может изменяться осмотическое давление. Естественно предположить, что быстрое включение и выключение синтеза или катаболизма органических молекул позволяет достигать осмотического равновесия раньше, чем произойдет заметная гидратация или дегидратация внутриклеточного содержимого. Позже мы приведем ясные примеры, иллюстрирующие быстроту осмотической адаптации путем изменения активности ферментов, регулирующих биосинтез осмолитов (в частности, глицерола или изофлоридозида).

Однако выбор органических веществ на роль осмолитов определяется в основном не эффективностью регуляции их содержания в клетке. Мы полагаем, что этот фактор, так же как и метаболическая «дешевизна», имеет лишь второстепенное значение. Главный же принцип, определяющий состав биологических растворов у бактерий, растений и животных, можно сформулировать следующим образом: *растворенные вещества формируют для макромолекул такое микроокружение, в котором структурные и функциональные свойства этих макромолекул будут оптимальны для катализа, регуляции метаболизма, передачи информации или совершения механической работы и в котором будет существовать чувствительное равновесие между стабильностью и нестабильностью их конформации.* Именно этот принцип — оптимальность микроокружения — играет главную роль при отборе органических осмолитов. И лишь после того, как было принято первоначальное «решение» о подборе тех или иных веществ, вырабатывались те способы их быстрого и легкого накопления, которые мы находим у многих организмов.

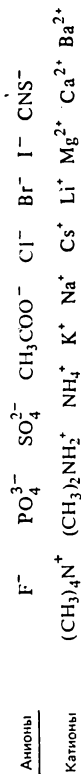
Мы рассмотрим разнообразные органические осмолиты, интересуюсь прежде всего тем, как они влияют (и могут ли вообще влиять) на структуру и функцию макромолекул, и покажем, что существуют два различных подхода к созданию для этих макромолекул благоприятной микросреды. Первый подход состоит в том, что клетка накапливает органические осмолиты, практически не влияющие на функции макромолекул. Их роль в осморегуляции весьма существенна, однако их присутствие никак не сказывается на функциях макромолекул, для которых они остаются как бы «невидимыми». Браун и Симпсон (Brown, Simpson, 1972) назвали эти вещества «совместимыми». *Стратегия совместимых осмолитов* состоит в том, что осмотическое равновесие с внешними жидкостями (кровью или окружающей организм водой) обеспечивается путем создания в клетке надлежащих концентраций веществ, не влияющих на функции макромолекул, в частности ферментов (это могут быть, например, свободные аминокислоты или глицерол). В дальнейшем мы рассмотрим химические основы такой «совместимости» и покажем, что лишь некоторые органические соединения могут быть отнесены к совместимым осмолитам.

Второй подход к созданию благоприятного микроокружения для макромолекул осуществлен у морских хрящевых рыб и целаканта (см. табл. 10-1). Для них характерно присутствие во внутриклеточной жидкости веществ, каждое из которых в отдельности может сильно нарушать структуру и функцию макромолекул, однако их концентрации в клетке таковы, что нежелательные эффекты компенсируют друг друга. Эту стратегию можно назвать *стратегией осмолитов-антагонистов* (counteracting solute strategy). Речь идет в основном о нейтрализации действия мочевины, которая обычно дестабилизирует структуру и подавляет функцию макромолекулы: мочеvine противодействуют вещества из группы метиламинов (рис. 10-1), которые, наоборот, стабилизируют структуру белков и активируют ферменты. В связи с этим неудивительно, что накопление одной только мочевины ведет к угнетению метаболизма; позже мы рассмотрим примеры таких систем.

### Стратегия совместимых осмолитов

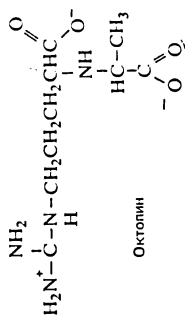
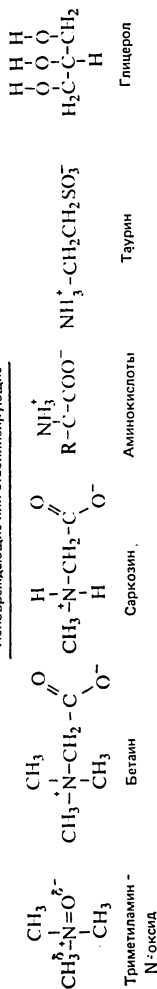
Использование органических осмолитов, не влияющих или почти не влияющих на функции макромолекул, дает организму ряд важных преимуществ. Во-первых, осморегуляция не нарушает метаболические процессы даже при больших изменениях концентрации совместимых веществ. На активности ферментов не сказываются ни высокий уровень этих веществ, ни его колебания. Второе важнейшее преимущество этой стратегии свя-

СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ  
(осаждающие)      ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ  
(растворяющие)



Влияние типичных растворимых компонентов внутритриктоной жидкости на структуру и функцию белка

Неповреждающие или стабилизирующие



Повреждающие

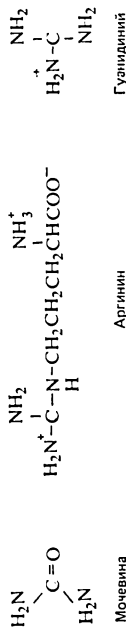


Рис. 10-1. Ряд Гофмейстера — ряд нейтральных солей, расположенных в порядке усиления (слева направо) их способности дестабилизировать структуру макромолекул. Выражения «растворение» (salting-in) и «высаливание» (salting-out) означают способность этих солей соответственно усиливать и снижать растворимость структурных компонентов макромолекул, например аминокислотных остатков (см. von Hippel, Schleich, 1969).

В нижней части рисунка представлены структурные формулы органических соединений, часто встречающихся в биологических растворах. Обратите внимание на структурное сходство стабилизирующих метламинов (ТМАО, бетаин и саркозин) с ионами метиламмония из ряда Гофмейстера, которые тоже оказывают сильное стабилизирующее действие на структуру макромолекул.

зано с относительной ролью низкомолекулярных осмолитов и макромолекул в эволюционном приспособлении к различной солености внешней среды. Рассмотрим сценарий эволюции некоего гипотетического организма при освоении им новой среды с гораздо большей концентрацией солей. Если в условиях солевого стресса клетки такого организма будут просто «открыты» для поступления в них ионов, например  $K^+$  или  $Na^+$  (а также противоиона  $Cl^-$ , поддерживающего электронейтральность), то могут быть серьезно нарушены функции ферментов, так как многие ферментативные процессы чувствительны к концентрациям солей (см. ниже). В таком случае, вероятно, потребуются ферменты, способные функционировать при высокой концентрации солей, в связи с чем придется внести существенные изменения в аминокислотный состав белков. Если же наш гипотетический организм будет поддерживать осмотическое равновесие со средой, накапливая совместимые органические вещества, то выработки солетолерантных белков, требующей многих поколений, не понадобится. Трудно с определенностью сказать, какой из рассмотренных эволюционных процессов будет протекать быстрее — перестройка многих (возможно, большинства) белков или создание механизмов, регулирующих биосинтез совместимых осмолитов. Мы склонны думать, что второй из этих процессов, связанный с модификацией относительно немногих макромолекул, будет гораздо более быстрым.

Итак, стратегия, основанная на использовании совместимых осмолитов, имеет ряд преимуществ. Имея это в виду, рассмотрим некоторые случаи, где органические осмолиты играют доминирующую роль во внутриклеточной жидкости. Следует отметить, что у Metazoa значение органических веществ для осмотического баланса внеклеточных жидкостей сравнительно невелико (см. табл. 10-1). Такое существенное различие между вне- и внутриклеточными жидкостями может быть обусловлено разным уровнем сложности метаболизма в этих двух компартментах. Почти все метаболические превращения, включая энергетический обмен и процессы биосинтеза, осуществляются во внутриклеточном пространстве. Поэтому требования к микро-среде здесь могут быть чрезвычайно высокими.

Примеры значительного влияния растворенных веществ на активность ферментов, представленные на рис. 10-2—10-4, иллюстрируют важный аспект организации систем, состоящих из совместимых осмолитов. Обратите внимание на то, что неорганические соли  $NaCl$  и  $KCl$ , легко доступные без особых метаболических затрат, могут сильно нарушать функцию ферментов. Поэтому, как уже говорилось, организм, регулирующий осмотическое давление только путем изменения концентраций

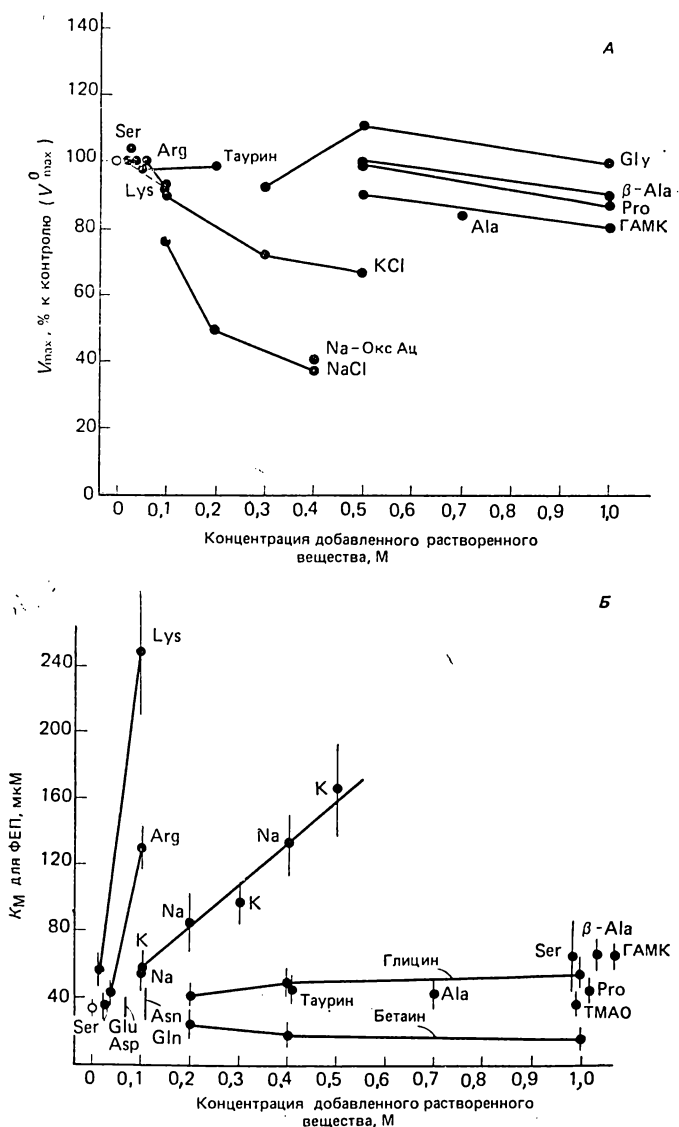


Рис. 10-2. А. Влияние различных растворенных веществ на максимальную скорость ( $V_{\max}$ ) реакции, катализируемой пируваткиназой *Pachygrapsus crassipes*. Б. Влияние тех же и некоторых других веществ на кажущуюся константу Михаэлиса ( $K_M$ ) для превращения фосфоенолпирувата (ФЕП), катализируемого пируваткиназой *P. crassipes*. Вертикальными отрезками при каждой точке обозначен 95%-ный доверительный интервал для  $K_M$ . Значение  $K_M$ , соответствующее контролю (при отсутствии исследуемых соединений в растворе), указано светлым кружочком. (По Bowlius, Somero, 1979, с изменениями.)

этих солей, должен был бы найти какие-то способы предотвращения их вредного действия. В процессе эволюции для этого потребовались бы многочисленные замены аминокислот в белках. Для адаптации к быстрым изменениям солености (например, в приливной зоне) могла бы потребоваться целая батарея изозимов, чтобы каждый чувствительный к солям фермент был представлен вариантами со своим оптимумом соле-

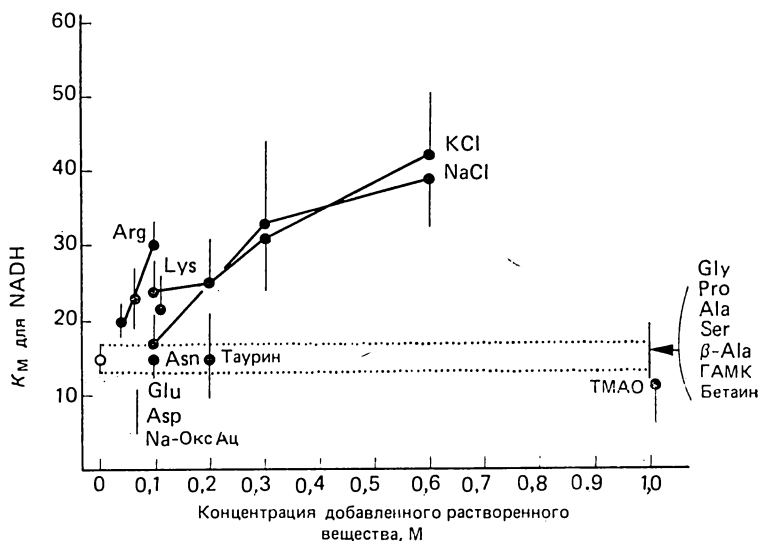


Рис. 10-3. Влияние различных растворенных веществ на кажущуюся константу Михаэлиса  $M_4$ -лактатдегидрогеназы тунца для NADH. Вертикальными отрезками при каждой точке показан 95%-ный доверительный интервал для  $K_m$ . Значение  $K_m$  в контроле (без добавления исследуемых веществ) указано светлым кружком. (По Bowlus, Somero, 1979.)

ности у каждого; используя же совместимые осмолиты, организм избегает этого затруднения.

Как видно из рис. 10-2 — 10-4, многие (но далеко не все) органические вещества, обычно присутствующие в биологических растворах, относятся к совместимым осмолитам. Некоторые аминокислоты, входящие в состав пула свободных аминокислот внутриклеточной жидкости (см. табл. 10-2), не оказывают заметного влияния на функции ферментов, другие же существенно нарушают их (рис. 10-2, 10-3). Неудивительно поэтому, что у морских беспозвоночных в наибольших концентрациях накапливаются те аминокислоты, которые не влияют на функции макромолекул, в особенности глицин, пролин и аланин (табл. 10-2). В экспериментах присутствие этих аминокислот



не сказывалось ни на скорости ферментативных реакций ( $V_{\max}$ ) (рис. 10-2, А), ни на кажущейся константе Михаэлиса ( $K_M$ ) (рис. 10-2, Б). Следует подчеркнуть, что нечувствительность пируваткиназы морского беспозвоночного *Pachygrapsus crassipes* к данным аминокислотам не связана с какой-то особой «приспособленностью» этого фермента: аналогичные свойства (толерантность к глицину, пролину и аланину и чувствительность к «несовместимым» аминокислотам) характерны для пируваткиназы весьма разнообразных морских и пресноводных бес-

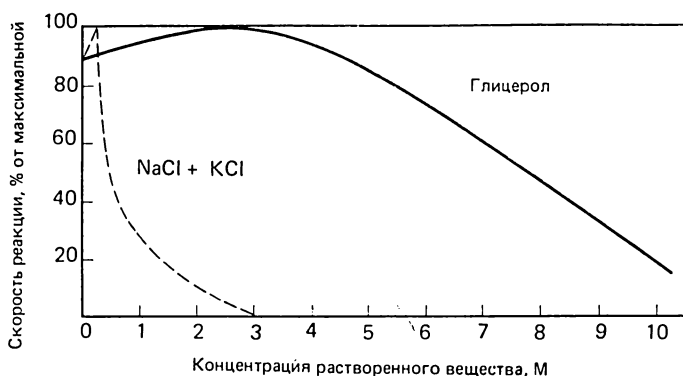


Рис. 10-4. Влияние соли (эквимольной смеси NaCl и KCl) и глицерола на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ *Dunaliella tertiolecta* и *D. viridis* (оба фермента реагируют одинаково). (По данным Bogowitzka, Brown, 1974.)

позвоночных и позвоночных животных. Сходство влияния аминокислот и других растворенных веществ на различные белки дополнительно иллюстрирует рис. 10-3, где представлены данные о мышечной М<sub>4</sub>-лактатдегидрогеназе тунца. Функцию этого фермента (так же как и пируваткиназы) не нарушает присутствие глицина, пролина, аланина и других аминокислот, составляющих заметную фракцию пула свободных аминокислот у морских беспозвоночных, и в то же время наблюдается сильно выраженный отрицательный эффект NaCl и KCl. Таким образом, совместимые аминокислоты не влияют на функции ферментов не потому, что те или иные ферменты адаптированы к ним: по-видимому, это связано с общими для всех биологических растворов закономерностями взаимодействия между белками, растворенными веществами и водой (этот вопрос мы рассмотрим позже). Характер этих взаимодействий таков, что вещество, совместимое с белками какого-либо одного типа, скорее всего окажется совместимым со многими или всеми иными белками. Это, несомненно, важная особенность всех совместимых осмолитов.

Среди двадцати (или около того) свободных аминокислот, содержащихся во внутриклеточной жидкости, есть также и несовместимые. Аргинин (см. рис. 10-1) и лизин — сильные ингибиторы пируваткиназы и лактатдегидрогеназы: в их присутствии резко возрастают величины  $K_m$ . Если концентрация лизина в клетках, как правило, очень низка, то аргининфосфат у боль-

Таблица 10-2. Концентрации свободных аминокислот в жидкостях организма у двух морских беспозвоночных (выражены в ммоль/кг сырого веса или ммоль/л и округлены до целых значений). — (По данным из обзора Schoffeniels, 1976)

Аминокислота	<i>Homarus vulgaris</i>		<i>Eriocheir sinensis</i>	
	Мышцы	Сыворотка	«Медленные» мышцы	«Быстрые» мышцы
Аланин	23	1	72	18
Аргинин	61	0	55	37
Аспартат+аспарагин	2	1	12	4
Цистеин	—	—	—	—
Глутамат+глутамин	34	0	28	10
Глицин	202	3	109	57
Гистидин	1	0	—	—
Изолейцин	—	—	3	1
Лейцин	6	0	5	2
Лизин	3	0	—	—
Метионин	1	0	—	—
Фенилаланин	1	0	—	—
Пролин	104	1	24	5
Серин	—	—	6	3
Таурин	—	—	28	21
Треонин	1	0	15	4
Тирозин	0	0	—	—
Валин	3	0	7	0

шинства морских беспозвоночных выполняет функции главного мышечного фосфагена (у остальных беспозвоночных и у всех позвоночных животных эту роль играет креатинфосфат). Поэтому нужно рассмотреть вопрос о том, каким образом беспозвоночные, использующие аргининфосфат, справляются с повышением уровня свободного аргинина в периоды интенсивной мышечной работы, когда истощаются запасы аргининфосфата, а концентрация свободного аргинина могла бы возрастать до 20—40 мМ (табл. 10-2). В некоторых случаях повышение концентрации аргинина, так же как и снижение рН, может служить сигналом для замедления реакций энергетического обмена в мышцах, предотвращающим дальнейшее закисление. В других случаях аргинин может превращаться в вещества, не нару-

шающие ход метаболических процессов, т. е. в совместимые осмолиты. Одним из таких веществ является октопин (см. рис. 10-1) — продукт конденсации аргинина с пируватом. Октопиндегидрогеназа (ОДГ) выполняет функцию, аналогичную функции лактатдегидрогеназы у самых разнообразных беспозвоночных, включая двусторчатых и головоногих моллюсков, сипункулид и актиний (хотя этот фермент имеется не у всех представителей перечисленных групп животных). В результате реакции  $\text{Пируват} + \text{Аргинин} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Октопин} + \text{NAD}^+$  регенерируется окисленный нуклеотид (что способствует непрерывному протеканию гликолиза), а аргинин превращается в соединение, принадлежность которого к числу совместимых осмолитов можно считать установленной (Bowlus, Somero, 1979). Действительно, октопин не влияет на  $K_m$  пируваткиназы; кроме того, в отличие от аргинина он не нарушает структурную организацию белков (см. ниже).

Осморегуляция с использованием подходящих свободных аминокислот свойственна не только морским беспозвоночным, но и некоторым галотолерантным (но не галофильным) бактериям и растениям, в сильной мере испытывающим водный стресс (табл. 10-1). Особенно важную роль у этих галотолерантных организмов, так же как и у морских беспозвоночных, играет накопление пролина. У некоторых бактерий в качестве главного аминокислотного осмолита используется глутамат (Measures, 1975), к которому сравнительно мало чувствительны и ферменты животных (рис. 10-2, 10-3). Отличие глутамата от пролина, глицина и аланина состоит, в частности, в том, что при физиологических значениях pH его молекула заряжена отрицательно. Поэтому на каждую аккумулярованную молекулу глутамата в клетку поступает один противоион (обычно  $\text{K}^+$ ). Высказана мысль (Measures, 1975), что у грамположительных бактерий превращение глутамата в пролин и  $\gamma$ -аминомасляную кислоту, которая тоже относится к числу совместимых осмолитов (рис. 10-2, 10-3), имеет адаптивное значение, так как сводит до минимума накопление одновалентных ионов в периоды роста концентрации свободных аминокислот.

Однако широкое использование свободных аминокислот не означает, что это единственная группа совместимых осмолитов. У разнообразных одноклеточных растений и грибов важнейшим осмолитом служит глицерол, концентрация которого достигает у одноклеточной зеленой водоросли *Dunaliella* 4,4 М (Borowitzka, Brown, 1974; Brown, Borowitzka, 1979), а у дрожжей *Debaryomyces hansenii* 2,7 М (Gustaffson, Norkrans, 1976; см. табл. 10-1). Даже в столь высоких концентрациях глицерол почти не ингибирует изученные в этом отношении ферменты (рис. 10-4). Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы

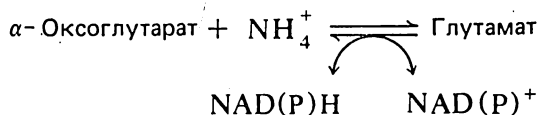
*Dunaliella tertiolecta* и *D. viridis* практически не изменялась при повышении концентрации глицерола почти до 5 М. В то же время в присутствии эквимольной смеси KCl и NaCl активность этого фермента несколько возрастала в растворах низкой ионной силы, но с увеличением концентрации солей резко снижалась (рис. 10-4). Глицерол обладает еще одной особенностью, облегчающей быстрое доведение осмотического давления в клетке до нужной величины: он может запасаться в клетке в осмотически неактивной форме. Мы вернемся к этому позже при анализе некоторых механизмов, регулирующих концентрацию органических осмолитов.

Поддержание осмотического давления у зеленых и сине-зеленых водорослей обеспечивается с помощью разнообразных органических соединений (см. табл. 10-1). Их влияние на активность ферментов в большинстве случаев не исследовалось. Однако, сопоставляя их с изученными осмолитами (пролином, глицином, глицеролом и т. п.), можно ожидать, что такие вещества, как изофлоридозид, циклогексантиол и осмолит, недавно обнаруженный у сине-зеленой водоросли *Synechococcus* sp., — 2-0- $\alpha$ -D-глюкопиранозилглицерол (Borowitzka et al., 1980), тоже окажутся совместимыми.

### Регулирование концентраций совместимых растворенных веществ

Ансамбли органических осмолитов у бактерий, растений и животных разнородны по составу, и неудивительно, что синтез этих соединений регулируется с помощью сложной комбинации метаболических путей. Рассмотрим вкратце некоторые из наиболее изученных регуляторных механизмов, чтобы показать на их примере разнообразие процессов, которые совместно обеспечивают один конечный результат — поддержание осмотического равновесия между клеткой и окружающей жидкостью путем накопления нужных количеств органических осмолитов.

1. **Реакция глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и синтез аминокислот.** Некоторые бактерии и морские беспозвоночные приспособляются к повышенной солености среды, накапливая в больших количествах свободные аминокислоты. В таких случаях центральную роль в регуляторном механизме могла бы играть реакция, катализируемая ГДГ:



Итогом этой реакции является присоединение аминокруппы к  $\alpha$ -оксокислоте с образованием глутамата. Эта аминокруппа переносится затем в трансаминазных реакциях с глутамата на другие  $\alpha$ -оксокислоты. Например, пируват, получая аминокруппу от глутамата, превращается в аланин; при этом интермедиат гликолиза в результате трансаминирования преобразуется в типичный органический осмолит (см. гл. 2).

Способность ГДГ активироваться под влиянием KCl и NaCl — важнейшая особенность этого фермента как у бактерий, так и у животных. Например, у некоторых видов бактерий активность ГДГ возрастает примерно вдвое при повышении концентрации  $K^+$  с 250 до 500 мМ (Measures, 1975). Наблюдалось также активирующее действие солей и на ГДГ разнообразных морских беспозвоночных (см. Schoffeniels, 1976). Значение такой активации состоит в том, что она позволяет увеличить выход аминокруппы для переноса на  $\alpha$ -оксокислоты (например, пируват и оксалоацетат) и образование самого глутамата, так как именно из него образуется пролин — один из важнейших аминокислотных осмолитов (см. табл. 10-1 и 10-2).

Пока не известно, каков вклад трансаминазных реакций в создание суммарного пула свободных аминокислот у того или иного организма. Описанный выше механизм с участием глутаматдегидрогеназы и трансаминаз следует рассматривать лишь как один из компонентов системы, регулирующей концентрации свободных аминокислот. Эксперименты на изолированном сердце двусторчатого моллюска *Modiolus demissus* (Greenwalt, Bishop, 1980) убедительно показали, что важную роль в осморегуляции играют и другие пути образования свободных аминокислот: даже после воздействия специфическими ингибиторами трансаминаз гиперосмотический стресс приводил к повышению концентрации многих аминокислот. Применявшиеся ингибиторы — аминооксиуксусная кислота и L-циклосерин — заметно подавляли образование пролина и аланина, но не препятствовали накоплению других аминокислот. Авторы обсуждаемой работы пришли к выводу, что при адаптации к гиперосмотической среде пул свободных аминокислот создается в значительной части за счет а) расщепления белков и б) катаболизма аргинина. Предположение о важной роли гидролиза белков в образовании свободных аминокислот при гиперосмотической регуляции высказывалось и прежде (Schoffeniels et al., 1976). Однако избирательное накопление определенных аминокислот, не отражающее «средний» аминокислотный состав белков, говорит против гипотезы о ведущей роли катаболизма белков в образовании свободных аминокислот у организмов, использующих эти вещества в качестве главных внутриклеточных осмолитов. (В разделе, посвященном белкам

галофильных бактерий, мы обсудим вопрос о «типичном» и «атипичном» аминокислотном составе белков.)

2. *Регулирование концентрации глицерола у Dunaliella.* Представление о том, что низкомолекулярные органические осмолиты могут запасаться в форме осмотически неактивных веществ, особенно легко приложимо к тем случаям, когда осмотически активные соединения образуются из высокомолекулярных запасных веществ (например, из крахмала) в результате небольшого числа метаболических реакций. К таким осмолитам относится глицерол, запасаемый в виде крахмала — легко доступного источника этого осмолита. Напомним, что осмотическое давление зависит от количества частиц в растворе (коллигативный эффект); иными словами, в одной большой полимерной молекуле крахмала «скрывается» огромное число потенциальных молекул низкомолекулярного осмолита, и клетке не требуется при этом много воды. Обсуждая механизмы, регулирующие содержание глицерола в клетке *Dunaliella*, Браун и Боровицка (Brown, Borowitzka, 1979) подчеркивают, что резкое и быстрое увеличение концентрации глицерола при гиперосмотической регуляции (адаптация полностью завершается за 60—90 мин) происходит как на свету, так и в темноте, если в клетках запасено достаточно крахмала. Пока не известно, каким путем активируется синтез глицерола при повышении солености среды (весьма заманчиво предположение, что у *Dunaliella* используется тот же механизм, что и при регуляции накопления изофлоридозида, см. ниже). Механизм удаления глицерола при уменьшении солености среды тоже недостаточно изучен, но известно, что это вещество используется в метаболических процессах, а не выводится из клетки. Процесс превращения крахмала в глицерол, вероятно, обратим, и в условиях, когда высокая концентрация глицерола в клетке больше не нужна, часть его снова превращается в крахмал. Однако каким бы способом ни регулировался метаболизм глицерола у *Dunaliella*, можно полагать, что в клетке активируются уже имеющиеся ферменты, поскольку ингибиторы белкового синтеза не нарушают осморегуляцию с использованием глицерола.

3. *Механизмы, регулирующие накопление изофлоридозида.* Вопрос о модуляции уже имеющихся ферментов под прямым воздействием солей уже обсуждался на примере глутаматдегидрогеназы бактерий и морских беспозвоночных. У водоросли *Poteroochromonas malhamensis* (Kauss et al., 1979) обнаружена система регуляции, сочетающая прямую активацию ферментов солями и образование осмотически активных мономеров из резервных полимерных молекул. Было показано, что у этого вида продолжительность лаг-периода до начала аккумуляции изофлоридозида составляет всего лишь одну — три минуты

(обзор: Kauss, 1979). При повышении солености среды вклад этого органического вещества в изменение внутреннего осмотического давления составляет примерно 70—80%. Учитывая, что изофлоридозид образуется очень быстро и в больших количествах, можно предполагать, что он запасается в клетках водоросли в осмотически неактивной форме и что ферменты, катализирующие его образование, постоянно присутствуют в клетке и активируются при повышении концентрации солей. Рассмотрим модель Каусса и его сотрудников, учитывающую оба этих фактора. Основной формой хранения изофлоридозидов может быть резервный полимер хризоламинарин. Эксперименты с  $^{14}\text{C}$ -изофлоридозидом показали, что при гипосмотическом стрессе этот осмолит остается в клетке и включается в хризоламинарин. Концентрация изофлоридозидов регулируется с помощью интересного каскадного механизма. Повышение концентрации соли в клетке, как полагают, активирует один или несколько протеолитических ферментов, которые в свою очередь активируют фермент изофлоридозидфосфат-синтазу путем ковалентной (протеолитической) модификации ее молекулы. (Напомним, что и при расщеплении мышечного гликогена ионы  $\text{Ca}^{2+}$  служат пусковым сигналом для ковалентной модификации ферментов, в данном случае для их фосфорилирования.) Активированная изофлоридозидфосфат-синтаза катализирует реакции, приводящие к образованию больших количеств изофлоридозидов. Таким образом, первичный сигнал (повышение осмолярности) преобразуется путем трансформации ферментов в изменение каталитической активности, необходимое для образования больших количеств главного осмолита. Такого рода регуляторный механизм отличается высокой чувствительностью и обеспечивает очень быструю реакцию клетки.

### Стратегия взаимокомпенсирующих растворенных веществ

Факт независимого появления совместимых органических осмолитов в ходе эволюции разнообразных бактерий, растений и морских животных, по-видимому, означает, что органические вещества, используемые для поддержания осмотического баланса, никогда не нарушают функций макромолекул. Поэтому может показаться странным, что у морских хрящевых рыб и целаканта выработалась совершенно иная стратегия осморегуляции — использование взаимокомпенсирующих осмолитов (Yancey, Somero, 1979, 1980). Главная особенность этой стратегии состоит (как это видно из ее названия) в уравнивании противоположно направленных эффектов. Так, повреждающее действие мочевины на макромолекулы нейтрализуют стабилизирующие или стимулирующие растворенные вещества,

относящиеся к метиламинам, — триметиламин-N-оксид, саркозин и бетаин (см. табл. 10-1, рис. 10-1). Лишь такая система в целом, включающая ряд азотсодержащих осмолитов, обладает свойством совместимости, отдельные же ее компоненты лишены этого свойства.

Прежде чем перейти к анализу противоположно направленных эффектов мочевины и метиламинов, остановимся на некоторых важных особенностях системы осморегуляции у пластиножаберных рыб. Во-первых, концентрации мочевины у них достаточно высоки, чтобы ее присутствие могло заметно сказываться на структуре и функции ферментов. В связи с этим можно предполагать, что такого рода организмы должны были найти способы защиты от повреждающего действия мочевины на макромолекулы. Для этого можно либо использовать растворенные вещества, противодействующие влиянию мочевины, либо обзавестись нечувствительными к ней белками. Хотя описан и тот и другой тип адаптации, возможности видоизменения белков, по-видимому, ограничены. Во-вторых, для системы осморегуляции пластиножаберных рыб характерно определенное отношение концентрации мочевины к суммарной концентрации метиламинов, равное 2 : 1. Это отношение примерно одинаково у разных видов и у разных особей независимо от солёности среды и от абсолютных концентраций азотсодержащих осмолитов в жидкостях тела. Не удивительно поэтому, что именно при таком соотношении концентраций мочевины и метиламинов взаимокомпенсирующее действие этих соединений наиболее выражено.

Противоположное действие мочевины и метиламинов на разнообразные ферменты иллюстрирует рис. 10-5. На примере креатинфосфокиназы и пируваткиназы можно видеть, что мочевина увеличивает кажущуюся  $K_m$  этих ферментов для ADP (рис. 10-5, А), в то время как все метиламины уменьшают ее. Решающее значение, однако, имеет тот факт, что при соотношении концентрации мочевины и суммарной концентрации метиламинов, равном 2 : 1, величина  $K_m$  не отличается от контроля (без мочевины и метиламинов). Антагонизм между этими осмолитами не ограничивается какой-то особой областью их концентраций — он выявляется в широком диапазоне концентраций, если только сохраняется указанное выше соотношение 2 : 1.

Мочевина и метиламины влияют противоположным образом и на величину  $V_{max}$  некоторых ферментативных реакций. Например, мочевина ингибирует аргининсукцинат-лиазную реакцию, в то время как триметиламиноксид ее активизирует (рис. 10-5, Б и В); реакцию же, катализируемую  $M_4$ -лактатдегидрогеназой, напротив, мочевина активизирует, а триметилами-



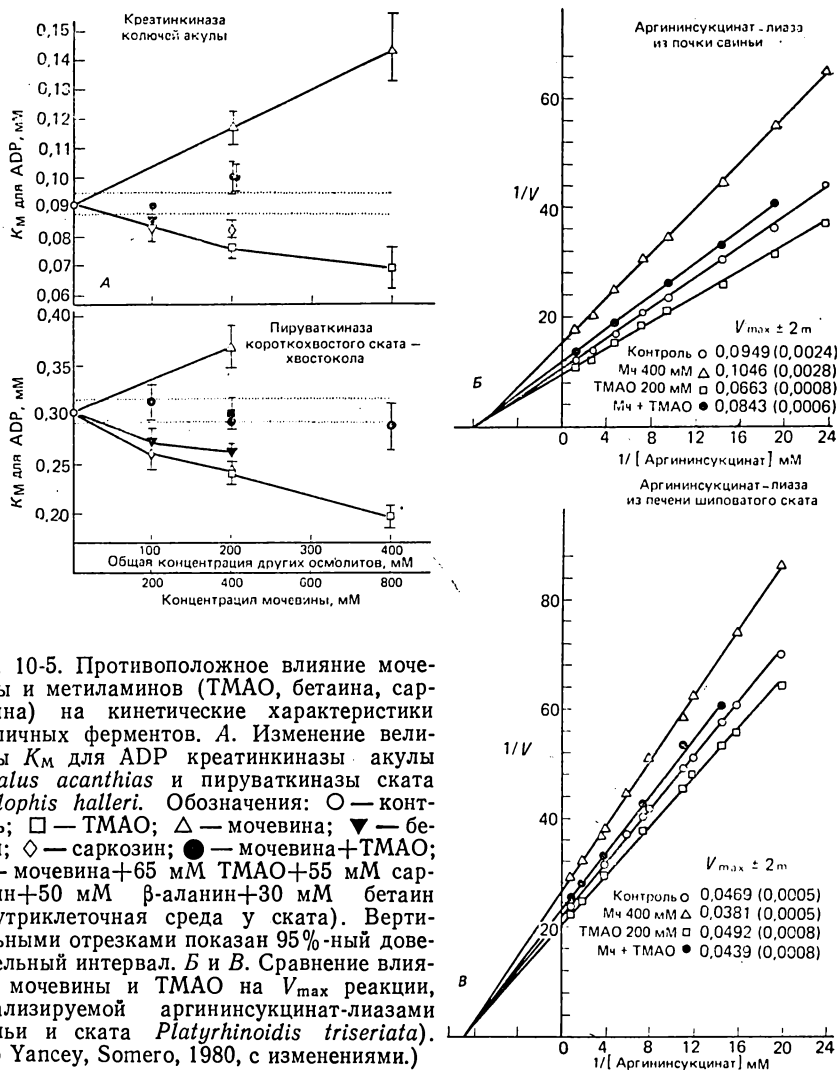


Рис. 10-5. Противоположное влияние мочевины и метиламинов (ТМАО, бетаина, саркозина) на кинетические характеристики различных ферментов. А. Изменение величины  $K_M$  для ADP креатинкиназы акулы *Squalus acanthias* и пируваткиназы ската *Urolophus halleri*. Обозначения:  $\circ$  — контроль;  $\square$  — ТМАО;  $\Delta$  — мочевина;  $\blacktriangledown$  — бетаин;  $\diamond$  — саркозин;  $\bullet$  — мочевина+ТМАО;  $\blacksquare$  — мочевина+65 мМ ТМАО+55 мМ саркозин+50 мМ  $\beta$ -аланин+30 мМ бетаин (внутриклеточная среда у ската). Вертикальными отрезками показан 95%-ный доверительный интервал. Б и В. Сравнение влияния мочевины и ТМАО на  $V_{\max}$  реакции, катализируемой аргининсукцинат-лиазами свиньи и ската *Platyrrhinoidis triseriata*. (По Yancey, Somero, 1980, с изменениями).

ноксид подавляет (Yancey, Somero, 1980). Однако при любой направленности эффектов этих веществ они взаимно компенсируются, если соотношение концентраций остается равным 2:1.

Мочевина и метиламины оказывают сходное действие на аргининсукцинат-лиазу пластиножаберных рыб (шиповатого ската) и млекопитающих (свиньи) (рис. 10-5). Это вновь подтверждает вывод, сделанный при обсуждении свойств совмести-

мых осмолитов: влияние растворенных веществ на ферменты в основном обусловлено, по-видимому, тем или иным общим типом взаимодействий между белками, растворенными веществами и водой. Именно поэтому белки пластиножаберных и костистых рыб, млекопитающих и беспозвоночных, растений и даже бактерий большей частью сходно реагируют на любые изменения в составе биологического раствора; и это может относиться к белкам разных типов в одной и той же системе растворенных веществ.

### Влияние совместимых и взаимокompенсирующих растворенных веществ на структуру белка

Обсуждая свойства биологических растворов, мы до сих пор касались лишь *функциональных* (кинетических) свойств ферментов и их изменения под влиянием различных растворенных веществ. Посмотрим теперь, каким образом совместимые и противодействующие вещества влияют на *структуру* белка. Мы покажем, что различия между теми и другими веществами иногда бывают нечеткими; например, некоторые совместимые аминокислоты стабилизируют структуру белка. Однако главный результат структурных исследований состоит в том, что некоторые закономерности, выявленные в отношении кинетических параметров ферментов, обнаруживаются и при изучении структуры белков.

Изучая влияние растворенных веществ на структурную стабильность белка, в качестве модели часто используют тепловую инактивацию рибонуклеазы (von Hippel, Schleich, 1969). Растворенные вещества, стабилизирующие структуру белковой молекулы, повышают температуру денатурации ( $T_m$ ) РНКазы в отличие от дестабилизирующих, которые ее понижают. Большая часть имеющихся данных о влиянии органических соединений на  $T_m$  РНКазы суммирована на рис. 10-6. Можно видеть, что совместимые вещества в тех концентрациях, в которых они обычно присутствуют *in vivo* (см. табл. 10-1 и 10-2), практически не влияют на величину  $T_m$  (так же как и на кинетические свойства ферментов). Например, глицин и аланин даже в концентрации 0,4 М (больше, чем в животных клетках) оказывают лишь слабое стабилизирующее действие на РНКазу, а пролин в 1 М растворе не влияет на  $T_m$  этого белка. Однако аргинин значительно дестабилизирует структуру РНКазы, и в то же время эта несовместимая аминокислота сильно ингибирует некоторые ферменты. Октопин, который мы упоминали как совместимое производное аргинина, не влияет на  $T_m$  РНКазы вплоть до концентрации 0,2 М.

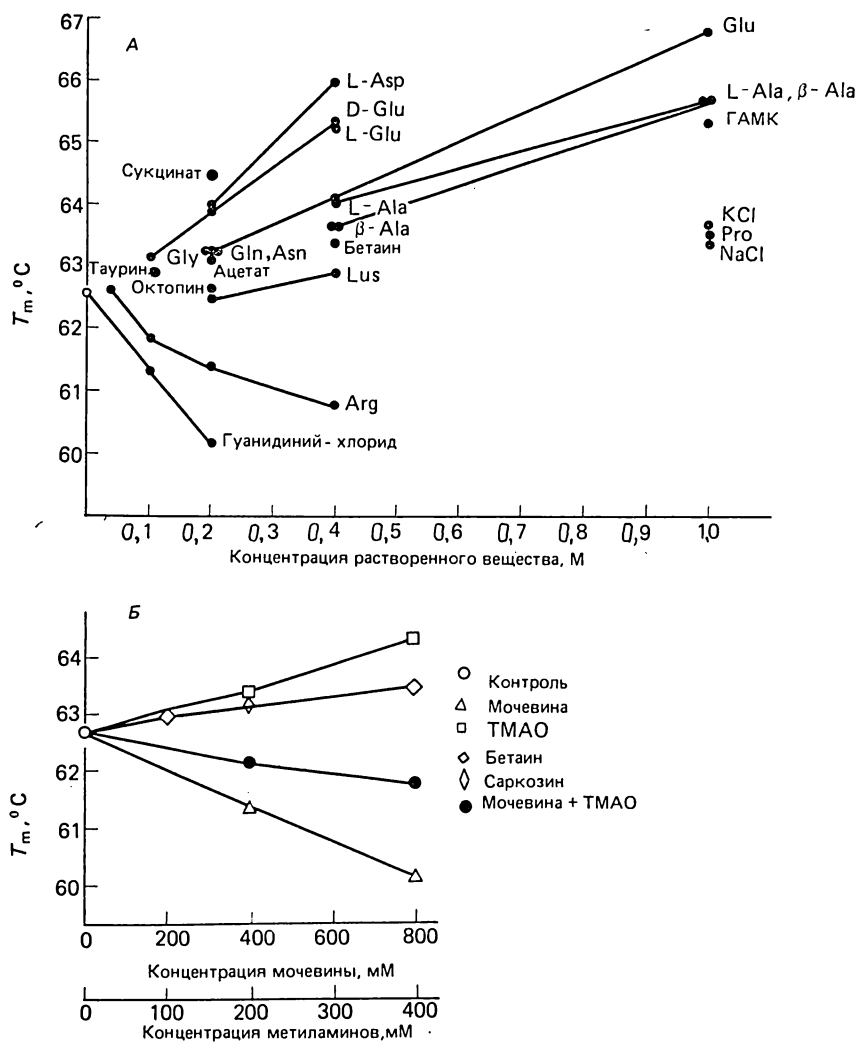


Рис. 10-6. Влияние различных растворенных веществ на температуру теплового перехода («температуру плавления»,  $T_{пл}$ ) бычьей панкреатической рибонуклеазы. А. Влияние нейтральных солей, свободных аминокислот и различных их производных, например октопина, на  $T_{пл}$  (по Bowlus, Somero, 1979, с изменениями). Б. Противоположное влияние мочевины и метиламинов на  $T_{пл}$  рибонуклеазы (по Yalpcsey, Somero, 1979, с изменениями).

Lus на рис. А — ошибочно вместо Lys (лизин).

Противодействующие растворенные вещества тоже изменяют  $T_m$  РНКазы соответственно их типичному влиянию на кинетические параметры ферментов (рис. 10-6, Б). Метиламины стабилизируют структуру РНКазы, и наблюдаемый при этом эффект пропорционален числу метильных групп, связанных с азотом (см. рис. 10-1). Мочевина, как уже давно известно, является мощным агентом, дестабилизирующим РНКазу (и другие белки). Но если концентрации мочевины и метиламинов в растворе относятся как 2 : 1, их влияние на  $T_m$  РНКазы в значительной мере (хотя и не полностью) взаимно нейтрализуется.

Сходный эффект совместного действия мочевины и метиламинов проявляется и в отношении ряда других ферментов. Его можно обнаружить, изучая ренатурацию денатурированных молекул лактатдегидрогеназы или оценивая скорость включения сульфгидрильных групп в молекулу глутаматдегидрогеназы (Yancey, Somero, 1979). Видимо, подобного рода эффекты характерны для белков различного типа и почти не зависят от их видовой принадлежности.

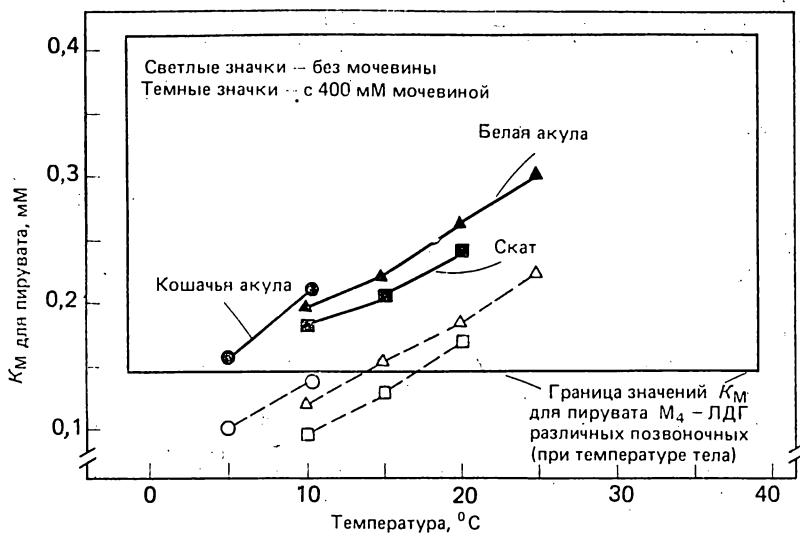
Подводя итоги рассмотрению взаимокомпенсирующих растворенных веществ, следует подчеркнуть, что хотя метиламины обычно повышают активность ферментов и стабилизируют структуру белков, было бы ошибкой включать их в одну группу с пролином, глицином, глицеролом и другими совместимыми веществами. На страницах этой книги уже неоднократно отмечалось, что характерная для каждого фермента величина  $K_m$  и различные структурные особенности ферментов представляют собой своеобразный итог адаптивного процесса. С точки зрения эффективности регуляции метаболизма слишком низкая величина  $K_m$  или слишком стабильная структура фермента может оказаться столь же невыгодной для организма, как и повышенные значения  $K_m$  и дестабилизация ферментов, обусловленные присутствием мочевины. Поэтому правильное, на наш взгляд, рассматривать мочевины как антагониста метиламинов, а метиламины — как вещества, нейтрализующие ее действие. Таким образом, лишь система растворенных веществ, включающая и мочевины, и метиламины, может считаться совместимой.

### Белки, адаптированные к присутствию мочевины

Как уже отмечалось, организмы с высоким содержанием мочевины в жидкостях тела (такие, как пластиножаберные рыбы), вообще говоря, могут адаптироваться к ней двумя способами — либо с помощью противодействующих растворенных веществ, либо путем создания белков, толерантных к мочеvine.

Заканчивая обсуждение адаптации белков к мочеvine, рассмотрим один случай, когда ингибирующий эффект мочевины преодолевается без участия метиламинов, путем изменения свойств самого ферментного белка.

На рис. 10-7 представлены данные об  $M_4$ -лактатдегидрогеназе трех пластиножаберных рыб и ряда других позвоночных; изу-



Вис. 10-7. Влияние температуры на  $K_M$  для пирувата  $M_4$ -лактатдегидрогеназы пластиножаберных рыб. Область допустимых значений этой величины при физиологических температурах, определенная по данным исследований примерно 20 видов позвоночных, обведена рамкой (Yancey, Somero, 1978a, b; Graves, Somero, 1982; Somero et al., 1983). Можно видеть, что при температуре тела  $K_M$   $M_4$ -ЛДГ пластиножаберных рыб попадает в эту область допустимых значений только в присутствии физиологических концентраций мочевины (около 400 мМ).

чалось влияние температуры на кажущуюся  $K_M$  для пирувата. В отличие от рассмотренного ранее примера, где влияния мочевины и метиламинов на величину  $K_M$  для ADP креатинкиназы и пируваткиназы компенсировали друг друга, в данном случае эффект мочевины, проявляющийся в увеличении  $K_M$  для пирувата, не снимается действием метиламинов (Yancey, Somero, 1978b). Сохранение нужной величины  $K_M$  для пирувата, составляющее важный аспект адаптации и эволюции этого фермента, обеспечивается в данном случае благодаря изменению «исходной» величины  $K_M$ . В отсутствие мочевины  $K_M$  для пирувата у ЛДГ пластиножаберных рыб ниже, чем со-

ответствующая величина у костистых рыб с такой же температурой тела. При добавлении физиологических концентраций мочевины *in vitro* величины  $K_m$  ферментов пластиножаберных рыб возрастали, принимая значения, характерные для  $K_m$  ЛДГ костистых рыб. Таким образом, в рассмотренном случае толерантность фермента к высоким концентрациям мочевины сформировалась в ходе эволюционной адаптации. Потребность в такого рода адаптации может возникнуть тогда, когда мочевина связывается со специфическим активным участком фермента и действует как конкурентный ингибитор. Не следует удивляться, что метиламины в таком случае не снимают эффект мочевины (Yancey, Somero, 1978 b).

### Регулирование концентраций мочевины и метиламинов

Мочевина по своим свойствам существенно отличается от совместимых осмолитов, рассмотренных выше. В метаболизме животных мочеvine отводится роль конечного продукта, который не может быть использован как источник энергии или углеродных атомов. Поэтому, когда нужно понизить внутреннее осмотическое давление, нет необходимости сохранять мочеvinу, включая ее, например, в полимерные молекулы. Избыток мочевины обычно выводится из организма — в отличие от таких ценных метаболитов, как свободные аминокислоты, глицерол или изофлоридозид.

Механизмы регуляции уровней мочевины и метиламинов в организме пластиножаберных рыб мы понимаем сегодня лишь отчасти. Известно, что у них имеются все ферменты цикла мочевины и в нем происходят те же реакции, что и у млекопитающих. Однако пути синтеза триметиламинооксида мы знаем гораздо хуже; скорее всего это тоже конечный продукт, образующийся при распаде холина и других веществ. Поэтому концентрации как мочевины, так и метиламинов в клетках и в крови могут в принципе регулироваться путем строго контролируемой экскреции каждого из этих так называемых отходов метаболизма, тогда как их синтез может не зависеть существенным образом от солености окружающей воды. В связи с этим интересен тот факт, что жабры пластиножаберных рыб почти непроницаемы для мочевины. У костистых рыб дело обстоит иначе: их жабры пропускают мочеvinу достаточно хорошо. Чем обусловлена непроницаемость жабр у пластиножаберных, не выяснено. Поскольку мочевина, как правило, свободно проходит через клеточные мембраны, можно предположить, что в данном случае речь идет о специальном адаптивном изменении жабр. Вторая линия защиты от потери мочевины связана с почками, где происходит ее реабсорбция. Количество мочеви-

ны, возвращаемое в жидкости тела из первичной мочи, вероятно, зависит от осмотического градиента между организмом и окружающей средой. Об эффективности осморегуляторных механизмов у пластиножаберных свидетельствует то, что соотношение между концентрациями мочевины и метиламинов в организме поддерживается на уровне 2:1 независимо от суммарной осмолярности жидкостей тела (Forster, Goldstein, 1976). Поэтому у эвригалинных (т. е. переносящих большие изменения солености воды) пластиножаберных рыб, таких как скат *Dasyatis americana*, акклимация к 50%-ной морской воде сопровождается резким снижением суммарной концентрации мочевины и метиламинов, но между этими веществами сохраняется соотношение, необходимое для взаимной компенсации их влияния на структуру и функцию белков (см. табл. 10-1).

#### Эффекты мочевины и метиламинов: некоторые нерешенные вопросы

Как мы видели, механизм, регулирующий концентрации мочевины и метиламинов у таких организмов, как пластиножаберные рыбы, не вполне ясен. Остаются нерешенными и некоторые вопросы относительно действия этих азотсодержащих веществ. В частности, не выяснена роль триметиламиноксида и других метиламинов у тех животных, которые не накапливают больших количеств мочевины. Между тем концентрации метиламинов у многих морских беспозвоночных могут достигать 0,1 М (см. табл. 10-2). Как действуют эти метиламины на внутриклеточные макромолекулы в отсутствие такого повреждающего агента, как мочевина? Не могут ли они служить антагонистами неорганических ионов, взаимодействующих с макромолекулами? Как показали эксперименты с малатдегидрогеназой ячменя (Pollard, Wyn Jones, 1979), один из метиламинов, бетаин, предотвращает ингибирующее действие NaCl на этот фермент. Таким образом, вопрос о возможной взаимной компенсации эффектов солей и метиламинов заслуживает дальнейшего изучения.

Не менее интересен вопрос о возможной роли метиламинов у накапливающих мочевины амфибий, таких как лягушка-крабод *Rana cancrivora* (Gordon, Tucker, 1968) и впадающий в летнюю спячку лопатоног *Scaphiopus couchi* (McClanahan, 1967; Jones, 1980). Аккумулируются ли во внутриклеточной жидкости этих животных триметиламиноксид и другие антагонисты мочевины? Или же в отсутствие этих веществ мочевина обеспечивает угнетение метаболизма? Последнее предположение особенно уместно в случае *Scaphiopus*, впадающего в спячку при высокой концентрации мочевины в организме. То же самое от\*

носятся и к двоякодышащим рыбам, у которых концентрация мочевины в периоды летней спячки измеряется десятками долями моля на 1 л. Весьма вероятно, что в условиях (температура, pH, концентрация мочевины), которые складываются в организме у некоторых видов при зимней (а возможно, и при летней) спячке, мочевина действует как сильный ингибитор гликолиза. Таким образом, можно выделить две функции внутриклеточной мочевины. Во-первых, она предотвращает обезвоживание организма: это можно наблюдать у морских хрящевых рыб и у некоторых животных, впадающих при засухе в летнюю спячку, например у зарывающегося в ил лопатонога (*Scaphiopus*). Во-вторых, мочевина участвует в регуляции метаболизма (у организмов, не имеющих антагонистов мочевины, таких как триметиламиноксид).

### Стратегия адаптации галофильных бактерий

Основное положение, к которому мы пришли, обсуждая свойства совместимых растворенных веществ и систем взаимокompенсирующих осмолитов, состоит в следующем: организмы с высоким осмотическим давлением жидкостей тела, накапливая органические осмолиты вместо неорганических (таких, как NaCl и KCl), избегают необходимости «перестраивать» свои белки, чтобы сделать их устойчивыми к солям. Однако мы сформулировали этот вывод несколько по-иному: благодаря использованию совместимых и взаимокompенсирующих осмолитов эволюция систем осморегуляции могла затрагивать уже не все белки, а только те, которые участвуют в регулировании концентраций определенных органических веществ. При этом отбор шел уже по совершенно иным признакам, и для такого пути эволюции не характерны замены аминокислот, приводящие к солеустойчивости белков.

Известны удивительные организмы, которые придерживаются иной стратегии осмотической адаптации, хотя это исключение из указанного выше правила на самом деле лишь подтверждает его. Галофильные бактерии прошли совершенно иной путь эволюции, нежели растения-галофиты, хрящевые рыбы и морские беспозвоночные. Такие бактерии, как *Halobacterium halobium*, поддерживают осмотическое равновесие с окружающей средой при помощи неорганических ионов, чаще всего  $K^+$ . Среда обитания этих бактерий достаточно разнообразна: они могут жить в соленых, рассолах и в водоемах, по уровню солёности приближающихся к водам Мертвого моря. Концентрация солей, главным образом NaCl, в таких местообитаниях составляет 3—5 М, т. е. близка к уровню насыщения. Однако галобактерии не только выживают в средах с высокой



концентрацией солей, поддерживая изоосмотичность своей внутриклеточной среды: присутствие 1—2 М NaCl в воде даже необходимо для их роста (Lanyi, 1974, 1978). Схемы метаболических путей галофилов сравнительно несложны (Lanyi, 1974); возможно, это обусловлено ограниченной растворяющей способностью внутриклеточной жидкости (см. ниже) или же тем, что определенные группы ферментов инактивируются в присутствии высоких концентраций солей. В то же время галофильные бактерии необычайно эффективно используют солнечную энергию. Их клеточные мембраны содержат бактериородопсиновую пигментную систему, с помощью фотонов перемещающую протоны. Таким образом создаются градиенты энергии, за счет которых может совершаться полезная работа, в первую очередь выведение  $\text{Na}^+$  из клетки. Поступление  $\text{Na}^+$  в клетку «вниз» по натриевому градиенту может в свою очередь использоваться для транспорта аминокислот внутрь клетки. Как полагают, энергетический обмен этих бактерий в значительной части основан на катаболизме аминокислот (Lanyi, 1974, 1978; Stoeckenius, 1979).

### Природа белков галофильных бактерий

Особый интерес у галофильных бактерий представляют адаптации в структуре белков (ферментных и рибосомных), которые позволяют им функционировать при высокой концентрации соли. Важно отметить, что такие условия тут уже *необходимы* для их эффективной работы. Ситуация здесь принципиально отличается от рассмотренной выше: высокие концентрации совместимых и взаимокompенсирующих веществ тоже не повреждают белки, но *не* являются необходимыми для их функционирования.

Для того чтобы понять, чем именно белки галофильных бактерий отличаются от известных белков всех других организмов, нужно прежде всего рассмотреть необычный аминокислотный состав галофильных белков и те силы, которые поддерживают их нативную функциональную конформацию. Белки галофильных бактерий отличаются необычайно высоким содержанием кислых аминокислот (глутамата и аспартата), но бедны аминокислотами с выраженными гидрофобными свойствами — лейцином, изолейцином и валином (табл. 10-3; Lanyi, 1974). Слабогидрофобные остатки представлены в них достаточно широко. Эти различия между белками галофильных бактерий и так называемыми «нормальными» белками обусловлены тем, что высокие концентрации солей изменяют стабильность белковой молекулы. Например, KCl в высоких концентрациях оказывает сильное стабилизирующее действие, осаждает белки (см.

рис. 10-1), а при концентрациях, близких к молярной, молекулы «нормальных» белков приобретают чрезвычайно высокую «жесткость», утрачивая порой функциональную активность, и могут даже перейти в нерастворимое состояние. Такие соли, как KCl, влияют на структуру белка, стабилизируя гидрофобные взаимодействия. Поэтому в присутствии KCl и других осаждающих белки солей из ряда Гофмейстера создаются условия, способ-

Таблица 10-3. Рибосомные и растворимые цитоплазматические белки галофильных и негалофильных бактерий. Соотношение кислых и основных аминокислотных остатков в этих белках и степень их гидрофобности. Кислые остатки — глутамат и аспартат, основные — лизин и аргинин. (По Lanyi, 1974, с изменениями)

Вид (г — галофильный, нг — негалофильный)	А. Содержание кислых остатков, % (моль на 100 моль)	Б. Содержание основных остатков, % (моль на 100 моль)	А—В	Гидрофобность, ккал/остаток <sup>1)</sup>
Цитоплазматический белок				
(г) <i>Halobacterium salinarium</i>	26,8	9,7	17,1	0,958
(г) <i>Halococcus</i> № 24	27,8	9,9	17,9	0,936
(г) <i>Halococcus</i> № 46	26,8	10,3	16,5	0,956
(нг) <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20,9	13,8	7,1	1,054
(нг) <i>Sarcina lutea</i>	21,2	12,6	8,6	1,025
(нг) <i>Escherichia coli</i>	18,4	18,2	0,2	1,114
Субъединица 70S рибосомы				
(г) <i>Halobacterium cutirubrum</i>	28,2	13,7	14,5	0,943
(нг) <i>Escherichia coli</i>	21,6	12,5	9,1	1,114

<sup>1)</sup> Степень гидрофобности отражает содержание неполярных аминокислот в белке.

ствующие «упрятиванию» гидрофобных остатков внутрь белковой молекулы (von Hippel, Schleich, 1969).

С этой точки зрения становится понятным необычный аминокислотный состав белков галофильных бактерий. Фундаментальное свойство этих белков состоит в том, что они *крайне нестабильны и приобретают надлежащую стабильную структуру только в присутствии физиологических (измеряемых молями на 1 л) концентраций K<sup>+</sup>*. Для этой группы белков характерны две особенности. Во-первых, благодаря высокому содержанию в них глутамата и аспартата очень сильно проявляется отталкивание одноименно заряженных аминокислотных остатков в отсутствие высоких концентраций противоиона (K<sup>+</sup>). Таким образом, свойственная галофильным белкам нестабильность отчасти обусловлена высокой плотностью отрицательно заряженных

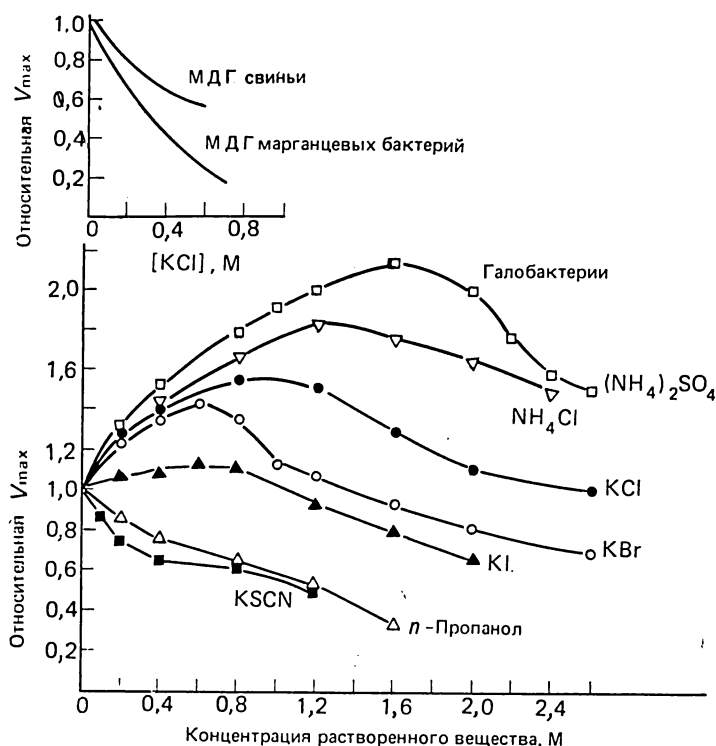


Рис. 10-8. Действие солей из ряда Гофмейстера (и *n*-пропанола) на  $V_{\max}$  реакции, катализируемой малатдегидрогеназой (МДГ) крайне галофильной бактерии *Halobacterium halobium* (неопубликованные данные Someo, Wogowitzka). Можно видеть, что эффект той или иной соли соответствует ее положению в ряду Гофмейстера (рис. 10-1). *n*-Пропанол солибилизирует боковые цепи белка и является сильным дестабилизирующим агентом, так же как и нейтральная соль KSCN. Для сравнения показано действие KCl на МДГ из сердца свиньи и из морской бактерии, окисляющей марганец (штамм 52В, French, 1981). Активность обеих малатдегидрогеназ сильно ингибируется присутствием KCl в концентрациях, меньших, чем оптимальные для фермента галобактерий.

групп. Поэтому активирующее действие  $\text{K}^+$  на многие ферменты галофильных бактерий (рис. 10-8), вероятно, связано с блокированием ионами  $\text{K}^+$  отрицательно заряженных участков, что и обеспечивает переход молекулы в функционально активную конформацию (Lanyi, 1974). Во-вторых, источником структурной нестабильности галофильных белков служит пониженное содержание в них остатков с сильными гидрофобными свойствами. Стабилизирующее влияние высоких концентраций  $\text{K}^+$  на

гидрофобные взаимодействия и относительно низкая гидрофобность этих белков компенсируют друг друга. Место валина, изолейцина и лейцина в них занимают слабогидрофобные остатки, например глицин и аланин. Можно предположить (Лапуи, 1974), что *in situ* белки галофильных бактерий по своей структурной стабильности сходны с «нормальными» белками, находящимися в относительно разбавленной среде.

Действие солей на малатдегидрогеназу (МДГ) *Halobacterium halobium* показано на рис. 10-8. Этот рисунок наглядно иллюстрирует упомянутый выше стабилизирующий эффект высоких концентраций  $K^+$  и зависимость действия соли на фермент от ее положения в ряду Гофмейстера (см. рис. 10-1). Обратите внимание, что в относительно низких концентрациях все исследованные соединения активировали МДГ *H. halobium* (за исключением соли  $KSCN$ , оказывающей сильное денатурирующее действие, и органического растворителя *n*-пропанола, который солюбилизирует гидрофобные группы). Этот эффект, видимо, свидетельствует о том, что основной причиной активации фермента в данном случае является экранирование заряженных групп его молекулы и что нейтрализующее заряды действие одновалентного катиона  $K^+$  (входящего в состав большинства изученных солей) «перевешивает» все эффекты разнообразных анионов. Однако при более высоких концентрациях солей преобладает воздействие аниона. Анионы, эффективно высаливающие гидрофобные группы, например анион  $SO_4^{2-}$ , активируют МДГ даже при очень высоких концентрациях соли. В то же время растворяющие анионы, особенно  $Br^-$  и  $I^-$ , активируют этот фермент в меньшей степени, а при достаточно высоких концентрациях соли даже ингибируют его. Таково действие солей из классического ряда Гофмейстера. Следует отметить, что в отличие от МДГ *H. halobium* МДГ из сердца свиньи или из морской бактерии, окисляющей марганец, ингибируется значительно более низкими концентрациями солей (порядка десятых долей моля/л).

Изучалось также действие солей на ряд других растворимых ферментов и на рибосомные белки галобактерии (обзоры: Лапуи, 1974, 1978). Эффекты, рассмотренные выше на примере МДГ, довольно типичны и для других галобактериальных белков. Например, для стабильности рибосом необходимы высокие концентрации  $K^+$ . Многие ферментативные реакции протекают с максимальной скоростью при концентрациях соли в среде около 1 М или выше. Однако некоторые ферменты галобактерий не активируются солями (но и не ингибируются ими). У галофилов имеются также ферменты, активность которых под влиянием солей понижается, хотя и в меньшей степени, чем у соответствующих ферментов мезофильных организмов.

Даже такой краткий обзор свойств белков галофильных бактерий достаточен, чтобы показать, что эти организмы составляют исключение, подтверждающее правило, сформулированное выше при обсуждении двух главных стратегий осмотической адаптации. Белки галофилов должны были претерпеть в процессе эволюции весьма основательную адаптивную перестройку, о чем можно судить по их аминокислотному составу. Естественно предположить, что такая реконструкция белков доступна только для прокариот — относительно простых организмов с коротким временем генерации (по сравнению с большинством эукариот). Однако стратегия адаптации галофильных бактерий — оружие обоюдоострое. Белки этих бактерий, обладая уникальной способностью функционировать при высоких концентрациях солей, нередко уже не могут без них обходиться. Достигаемая таким образом галотолерантность как бы «запирает» вид в концентрированной среде. Организмы, использующие для осморегуляции совместимые осмолиты, например *Dunaliella*, не столь ограничены в выборе местообитаний. Та же *Dunaliella*, способная расти в насыщенных рассолах, превосходно чувствует себя и в гораздо более разбавленных растворах, так как свойственная ей стратегия осморегуляции обеспечивает возможность эффективного метаболизма при весьма различных концентрациях осмолитов в клетке.

#### Физико-химические особенности взаимодействий между осмолитами, белками и водой

Какие общие физико-химические принципы лежат в основе построения биологических систем осмолитов? Предположительный ответ можно получить, исходя из сказанного выше об осаждающем и растворяющем действии неорганических ионов на белки. Кларк и Заунс (Clark, Zounes, 1977) впервые заметили, что органические осмолиты, типичные для морских животных и для некоторых галотолерантных растений и бактерий, обнаруживают черты структурного сходства со стабилизирующими (осаждающими) ионами из ряда Гофмейстера (см. рис. 10-1). Поразительна аналогия между метиламинами и семейством стабилизирующих белки соединений метиламмония. Ионы метиламмония относятся к наиболее сильным из всех известных стабилизирующих и высалающих агентов. Наоборот, мочевины является мощным дестабилизирующим фактором. В то же время такие распространенные осмолиты, как свободные аминокислоты, оказывают слабое стабилизирующее действие, которое может даже не проявляться при физиологи-

ческих концентрациях (см. данные об изменении  $T_m$  РНКазы, рис. 10-6). Стабилизирующий эффект глицерола особенно выражен при низких температурах; как полагают, он препятствует холодной денатурации, стабилизируя гидрофобные взаимодействия.

Гипотезы о фундаментальных механизмах действия растворенных веществ на белки не могут не учитывать факт сходства некоторых органических осмолитов с ионами из ряда Гофмейстера. Система осморегуляции пластиножаберных рыб представляется наиболее понятной. Легко представить себе, что организм, «открывший» для себя ряд Гофмейстера, а главное — аддитивный характер действия членов этого ряда (взаимную компенсацию эффектов стабилизирующих и дестабилизирующих ионов), был примитивным предком современных хрящевых рыб! Использование сбалансированной смеси метиламинов в принципе сходно с использованием смеси таких ионов, как, например, сульфат и бромид или же тетраметиламмоний и тиоцианат. Во всех этих случаях раствор содержит пару осмолитов, расположенных на противоположных концах ряда Гофмейстера, и эффект одного из них уравнивается или нейтрализуется действием другого. Мы полагаем поэтому, что важным конструктивным принципом, определяющим состав биологических растворов, является создание условий, при которых растворимость аминокислотных боковых цепей оптимальна для функционирования белка. Растворы, обладающие слишком сильным осаждающим или растворяющим действием, т.е. излишне стабилизирующие или дестабилизирующие белки, обычно нежелательны. Возможно, именно поэтому ни триметиламиноксид, ни мочевины не встречаются у пластиножаберных по отдельности. Ни одно из этих соединений в одиночку не может обеспечить условий, в которых растворимость и стабильность макромолекул были бы оптимальными. Действие совместимых осмолитов на растворимость аминокислотных боковых цепей может быть ничтожным или довольно слабым, судя по тому, что большинство свободных аминокислот не оказывает существенного влияния на термостабильность РНКазы, а глицерол слабо взаимодействует с белками (Brown, Borowitzka, 1979). Иногда баланс высаливающего и растворяющего действия биологического раствора бывает резко изменен (как, например, у галобактерий), и тогда должное равновесие между стабильностью белковой молекулы и ее гибкостью может быть достигнуто лишь путем изменения самого белка, т.е. значительной перестройки аминокислотных последовательностей. Таким образом, шаг в сторону от должного баланса высаливающего и растворяющего эффектов оплачивается ценой значительных эволюционных перестроек белковой молекулы.

### Взаимодействия моносахаридов с белками: преимущества использования глюкозы как источника энергии

Низкомолекулярные органические вещества, не повреждающие макромолекулы, отбираются в процессе эволюции не только в качестве осмолитов. Получены данные (Bunn, Higgins, 1981) в пользу того, что выбор глюкозы на роль главного моносахарида, доставляющего энергию, обусловлен низкой (по сравнению с другими моносахаридами) способностью ее к неферментативному гликозилированию белков. Моносахариды с незамкнутой (карбонильной) структурой могут без помощи ферментов взаимодействовать с концевыми аминокетогруппами белков, образуя при этом шиффовы основания. Такое основание (альдимин) затем перестраивается в кетоамин. Функциональные свойства белка в результате такой реакции могут нарушаться, поэтому кажется выгодным уменьшить вероятность подобных реакций.

Один из возможных способов свести до минимума гликозилирование белков состоит в том, чтобы накапливать моносахариды, существующие главным образом в виде замкнутых циклических структур (полуацеталей и полукеталей), так как гликозилировать концевые аминокетогруппы способны только моносахариды с незамкнутой структурой. Как отмечают Банн и Хиггинс, тенденция к циклизации у глюкозы выражена сильнее, чем у всех других альдогоексоз, и в соответствии с этим в их эксперименте по гликозилированию гемоглобина глюкоза оказалась в этом отношении наименее активной. Таким образом, экспериментальные результаты хорошо согласуются с гипотезой, объясняющей отбор глюкозы в процессе эволюции тем, что она отличается от других потенциально доступных гексоз стабильностью циклической структуры и поэтому слабо взаимодействует с белками и другими молекулами, содержащими аминокетогруппы.

### Оптимальная величина рН и состав буферных систем

*Основные соображения: чем определяется величина рН?* Обсуждая свойства и эволюцию биологических растворов, мы до сих пор не касались одного из их компонентов — протона, присутствие которого, несмотря на низкую его активность, существенно влияет на структуру и функцию биологических систем. Протон ( $H^+$ ) — наименьшая из всех частиц, находящихся во внутриклеточных растворах. Концентрация протонов обычно составляет от  $10^{-8}$  до  $10^{-6}$  М, что меньше одной тысячной доли концентрации главных осмолитов. И все же, как известно любому студенту из курсов физиологии и биохимии, даже слабые

сдвиги pH могут очень сильно влиять на скорости метаболических процессов и стабильность белков; поэтому все организмы — прокариоты, растения и животные — стремятся поддерживать постоянство этой величины. Чтобы объяснить на молекулярном уровне, зачем нужна такая регуляция pH, уместно начать с рассмотрения вопроса: почему в биологических системах поддерживаются именно те, а не другие величины pH?

Один из подходов к этому вопросу связан с изучением химических превращений составной части одной из аминокислот — имидазольной группы гистидина (рис. 10-9). Разобравшись

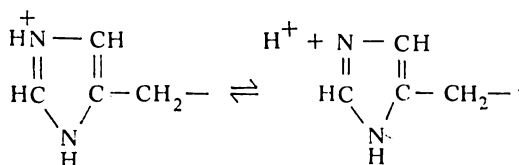


Рис. 10-9. Имидазольная группа гистидина в протонированном (слева) и непротонированном (справа) состоянии.

в химии кислотно-основных переходов в случае имидазола, мы сможем лучше понять ряд наиболее фундаментальных принципов, лежащих в основе регуляции pH, и уяснить, почему организмы стремятся обеспечить стабильность протонированного состояния имидазольной группы (Reeves, 1972), вместо того чтобы поддерживать pH на каком-то одном для всех случаев уровне, не зависящем от температуры и других условий.

Некоторые важные свойства имидазольных групп гистидина представлены в табл. 10-4. В главе, посвященной температурным эффектам, мы будем обсуждать вопрос о влиянии pH жидкостей тела на энтальпию ионизации имидазольных групп. А сейчас нам важно знать значения pK имидазола при биологических температурах. Хотя эти значения могут зависеть от того, какие аминокислоты соседствуют с гистидином в молекуле белка (табл. 10-4; см. Matthew et al., 1979a,b; Ohe, Kajita, 1980), в большинстве случаев величина pK имидазольной группы гистидина при 25°C близка к 7, и не случайно организмы поддерживают pH на уровне, близком к этой величине. Такая стратегия регуляции pH получила удачное название «альфа-статной регуляции» (Reeves, 1972): этим подчеркивается, что главная функция такого регуляторного механизма состоит в поддержании постоянной величины  $\alpha_{\text{имид}}$ , определяемой следующим образом:

$$\alpha_{\text{имид}} = [\text{Имид}] / ([\text{Имид} \cdot \text{H}^+] + [\text{Имид}]).$$



Величина  $\alpha_{\text{имид}}$  для внутриклеточной жидкости составляет около 0,55, а для крови несколько выше — около 0,85. Для того чтобы разобраться, почему поддерживаются именно такие величины  $\alpha_{\text{имид}}$ , надо будет кратко остановиться на функциях, выполняемых имидазольными группами гистидина. Ключевое значение здесь имеет отмеченный выше факт — то, что при биологических значениях pH эти группы протонированы примерно наполовину, чего нельзя сказать ни об одной из остальных аминокислотных боковых цепей. Иными словами, имидазольные

Таблица 10-4. Свойства имидазольных групп гистидина<sup>1)</sup>

<i>Величины pK</i>	
Имидазол	6,95
Имидазол гистидина	6,00
Имидазол гистидила	
«типичный»	6,5
соседствующий с кислой (—) группой	7—8
соседствующий с основной (+) группой	5—6
<i>Энтальпия ионизации</i> <sup>2)</sup>	7 ккал/моль

<sup>1)</sup> Величины pK определены при температуре около 25 °C. Данные о влиянии соседних групп на величину pK имидазола гистидила можно найти в следующих работах: Botelho, Gurd, 1978; Botelho et al., 1978 (миоглобин); Matthew et al., 1979a, b (гемоглобин); Ohe, Kajita, 1980 (гемоглобин).

<sup>2)</sup> Средняя величина; реальные значения могут зависеть от локального окружения аминокислотного остатка.

группы гистидина уникальным образом приспособлены для разнообразных функций, требующих обратимого присоединения и отщепления протонов. Обратимое протонирование молекул нередко бывает критическим этапом таких процессов, как 1) взаимодействие фермента с лигандом, 2) фаза катализа ферментативной реакции, 3) структурные переходы в молекулах белков и 4) реакции в буферных системах. Мы рассмотрим каждую из этих функций имидазольных групп гистидина, начав с роли имидазолов в активных центрах ферментов.

*Механизм связывания лиганда и величина  $\alpha_{\text{имид}}$ : сохранение величин  $K_M$  и обратимость реакций.* Важную роль имидазольных групп гистидина в работе ферментов мы проиллюстрируем на примере взаимодействия лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с субстратами — пируватом и лактатом (рис. 10-10); мы убедимся, что около половины этих групп протонировано. В скелетных мышцах позвоночных главная функция ЛДГ состоит в поддержании окислительно-восстановительного баланса при ограниченном доступе кислорода. В таких условиях ЛДГ должна эффективно связывать пируват, а ее способность к этому зависит от состояния гистидина 195. ЛДГ может присоединить молекулу пи-

рувата и восстановить ее до лактата лишь в том случае, если остаток His-195 находится в протонированном состоянии. Кажется бы, оптимальная величина рН для пируватредуктазной реакции должна быть достаточно низкой, чтобы His-195 был *всегда* протонирован. Однако так уж устроены биохимические системы, что условия, оптимизирующие одно из свойств системы, как правило, не оптимальны для проявления других ее свойств,

не менее важных. Это относится и к ЛДГ, и к другим ферментам, функции которых зависят от состояния гистидиновых остатков. Некоторые ферменты (в том числе ЛДГ) с остатками гистидина в активных центрах должны катализировать обратимые реакции в прямом и обратном направлениях, и в таких случаях полное протонирование или полное депротонирование имидазола препятствовало бы обратимости реакции. Во многих тканях ЛДГ играет ключевую роль в метаболизме, окисляя лактат в пируват, который может затем направляться в аэробные пути (например, в цикл лимонной кислоты) или использоваться в глюконеогенезе. Для связывания лактата ферментом

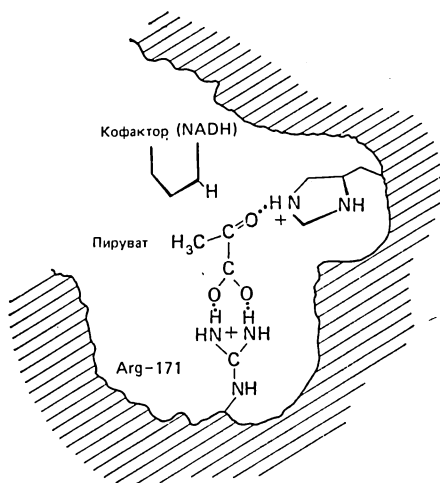


Рис. 10-10. Активный центр лактат-дегидрогеназы. Показаны ключевые аминокислотные остатки, участвующие в связывании пирувата; важную роль здесь играет гистидин-195.

His-195 должен быть депротонирован. Поэтому в тех тканях, где преобладает окисление лактата, выгоднее было бы поддерживать высокое значение рН (и очень высокую величину  $\alpha_{\text{имид}}$ ). В какой-то мере ткани действительно различаются между собой по величине рН. Отклонения от средних значений особенно велики в случае работающей мышцы, где значение рН может быть снижено и соответственно повышена способность ЛДГ связывать пируват. Однако при обычных условиях для цитозоля характерна величина  $\alpha_{\text{имид}}$ , близкая к 0,5, и это заставляет предполагать, что поддержание рН на уровне, обеспечивающем обратимость реакции, является одной из важных стратегий в эволюции биологических растворов (эта мысль получила дальнейшее развитие в работе Somero, 1981).

Мы говорили в основном о связывании лиганда и величине  $K_m$ , однако очевидно, что аналогичные соображения могут

относиться и к каталитической фазе лактатдегидрогеназной реакции. В реакциях, катализируемых пируватредуктазой и лактатдегидрогеназой, His-195 участвует в переносе протонов, и поддержание  $\alpha_{\text{имид}}$  на уровне, близком к 0,5, необходимо для обратимости не только этапа связывания лиганда, но и каталитического этапа. Гистидин входит в состав активных центров многих ферментов, катализирующих перенос протонов (см. Fersht, 1977), поэтому величина  $\alpha_{\text{имид}}$ , близкая к 0,5, благоприятна для широкого круга ферментативных реакций.

Поддержание указанной величины  $\alpha_{\text{имид}}$  важно для работы еще одной группы ферментов (в том числе рибонуклеазы), активные центры которых содержат два гистидиновых остатка, причем один из них выступает в роли основания (и поэтому должен быть депротонирован в начале реакции), а другой ведет себя как кислота (и в начале реакции должен присоединить протон). Очевидно, что такие ферменты нуждаются в микро-среде, рН которой позволял бы гистидину активного центра проявлять как кислотные, так и основные свойства. Таким образом, и в этом случае величина  $\alpha_{\text{имид}}$ , близкая к 0,5, будет благоприятной для функции ферментов.

Обсуждая значение протонирования имидазольной группы гистидина для процессов ферментативного катализа и связывания лигандов, нужно также рассмотреть ферменты, катализирующие однонаправленные реакции, например протеолиз. На примере этих ферментов можно еще раз убедиться, что величина  $\alpha_{\text{имид}}$  около 0,5 выгодна для большинства внутриклеточных ферментов. Многие протеолитические ферменты из числа пищеварительных функционируют в сильнокислой среде, в которой почти все имидазольные группы гистидиновых остатков все время находятся в протонированном состоянии. Это обеспечивает протекание гидролитических реакций главным образом в направлении разрыва пептидной связи. Крайние значения рН, характерные для пищеварительных органов, можно рассматривать как адаптацию, способствующую практически однонаправленному катализу: при таких рН величина  $\alpha_{\text{имид}}$  принимает крайние значения, далекие от 0,5.

При рассмотрении величины  $\alpha_{\text{имид}}$  следует коснуться еще одного компартмента — митохондриального матрикса. В отношении рН он менее изучен, нежели кровь или цитозоль, однако, судя по имеющимся данным, рН здесь на несколько десятых долей единицы больше, чем в цитозоле (см. Hazel et al., 1978; Somero, 1981). Означает ли это, что ферменты митохондриального матрикса поставлены в условия, неоптимальные для связывания лигандов и катализа? На этот вопрос, по-видимому, можно ответить отрицательно. Как выяснилось (Hazel et al., 1978), оптимумы рН исследованных ферментов матрикса на

несколько десятых единицы выше, чем у ферментов цитозоля. Сейчас еще рано распространять этот вывод на все ферменты цитозоля и митохондриального матрикса, но имеющиеся данные позволяют думать, что в обоих этих компартментах оптимальные рН содержащихся в них ферментов соответствуют фактическим уровням рН. Означает ли указанная особенность митохондриальных ферментов, что имидазольные группы гистидина здесь не играют такой же важной роли, как у ферментов цитозоля? Ответ и на этот вопрос, по-видимому, должен быть отрицательным. Хотя рК имидазольной группы гистидина в среднем составляет около 7 (при 25 °С), при включении гистидина в белок эта величина может заметно варьировать в зависимости от полярности микроокружения, создаваемого соседними аминокислотами (табл. 10-4). Например, ее можно повысить на 1—2 единицы рН, если окружить гистидин отрицательно заряженными группами — остатками аспартата и глутамата (табл. 10-4). Ввиду этого мы можем высказать догадку, что эволюция митохондриальных ферментов шла путем изменения полярности остатков, расположенных поблизости от ключевых остатков гистидина; при этом в соответствии с условиями среды (рН матрикса на несколько десятых единицы выше, чем в цитозоле) величина рК для имидазольных гистидина повышалась до значений, соответствующих  $\alpha_{\text{имид}} \sim 0,5$ . Важно отметить, что согласно этой схеме гистидин по-прежнему остается ключевой аминокислотой, протонирование и депротонирование которой необходимо для обратимости реакций. Более того, гистидин, если так можно выразиться, «навязывает свою волю» другим аминокислотным остаткам: их замены должны обеспечить оптимальное микроокружение для имидазольных групп гистидина (и надлежащие величины их рК).

*Структурные переходы и величина  $\alpha_{\text{имид}}$ .* Структурная организация белков тоже может изменяться в зависимости от рН — об этом свидетельствует тот факт, что при экстремально низких и высоких рН большинство белков денатурируется. Изменения рН даже в пределах биологического диапазона могут быть причиной структурных переходов, существенно влияющих на метаболизм. И в этом случае важную конструктивную роль играет величина  $\alpha_{\text{имид}}$ . Мы проиллюстрируем влияние рН на структуру молекулы белка на примере фосфофруктокиназы (ФФК) скелетной мышцы, так как надежно установлено, что активность этого фермента зависит от изменений структурных и кинетических параметров, вызываемых очень небольшими смещениями рН (от 0,1 до нескольких десятых единицы).

На рис. 10-11 показано, как влияют изменения рН на кинетические свойства ФФК и на сборку ее субъединиц. Изменения структуры и кинетики ФФК тесно взаимосвязаны и используют

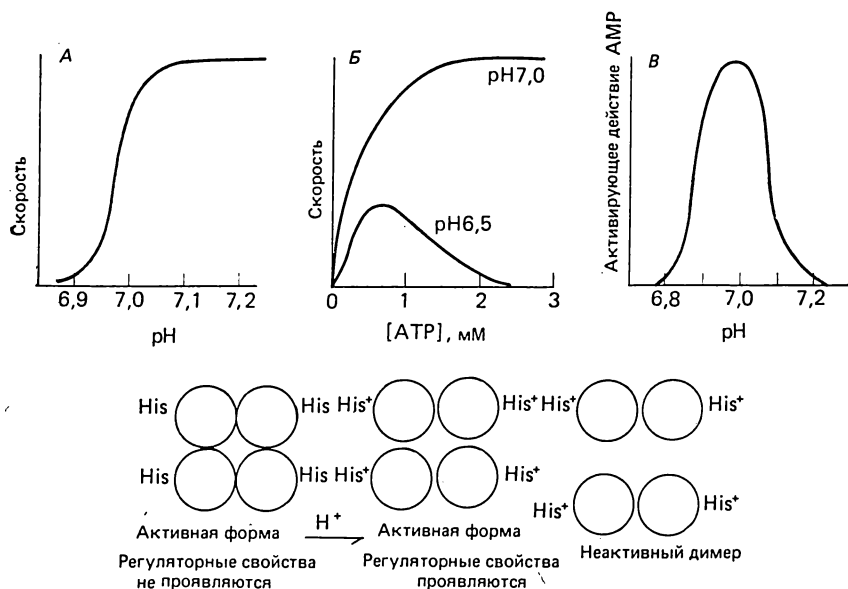


Рис. 10-11. Влияние pH на кинетические характеристики и структуру фосфофруктокиназы. Графики А—В иллюстрируют кинетику ферментативных реакций. А. Зависимость скорости реакции от pH (по данным Trivedi, Danforth, 1966); концентрация фруктозо-6-фосфата 0,43 мМ, концентрация АМР 0,1 мМ. Обратите внимание, что активность фермента изменяется наиболее резко в интервале pH, соответствующем титрованию имидазольных групп гистидила. Б. Влияние pH на зависимость активности фермента от АТФ (по данным Uyeda, Racker, 1965). Обратите внимание, что АТФ служит для фосфофруктокиназы не только субстратом, но и регулирующим метаболитом (аллостерическим эффектором). В диапазоне pH, характерном для работающей мышцы, АТФ выполняет эти функции, однако при более высоких значениях pH ингибирующий эффект АТФ не проявляется. В. Влияние pH на активацию фосфофруктокиназы аллостерическим эффектором 5'-АМР (по данным Trivedi, Danforth, 1966).

Внизу: гипотетический механизм изменений структуры фермента при изменении pH (см. Bock, Frieden, 1976). Предполагается, что при снижении pH происходит протонирование остатков гистидина (одного или более на одну субъединицу тетрамера). Протонированный тетрамер довольно легко распадается на функционально неактивные димеры, способные к самосборке в активные тетрамеры при возвращении pH на прежний уровень.

ся для регуляции активности этого важного «вентильного» фермента гликолитического пути. При понижении pH до величин, типичных для мышц млекопитающих, ФФК начинает обнаруживать свои характерные регуляторные свойства (рис. 10-11). Однако действие столь малого сдвига pH этим не ограничивается — одновременно фермент утрачивает стабильность и легко распадается на неактивные димеры. Дальнейшее снижение pH

еще больше сдвигает равновесие тетрамеры/димеры в сторону димеров; соответственно уменьшается активность ФФК и снижается способность клетки к гликолизу. Такой способ регуляции рН предотвращает чрезмерное снижение  $pH_i$  в ходе мышечного метаболизма. Таким образом, структурный переход, вызываемый сдвигом рН, играет для клетки роль своего рода «предохранительного клапана», так как неконтролируемое снижение рН могло бы иметь серьезные и, возможно, даже необратимые последствия для многих клеточных процессов и структурных элементов. Важно отметить, что этот переход тетрамерной формы ФФК в димерную легко обратим; димеры ни в каком смысле не являются продуктом денатурации — их можно рассматривать как резервную форму молекул ФФК, из которых при повышении  $pH_i$  могут быть собраны функционально активные тетрамеры.

Хотя аминокислотные остатки, ответственные за структурные перестройки молекулы ФФК при сдвиге рН, не идентифицированы, есть веские основания предполагать участие в этих процессах гистидинов (Pettigrew, Frieden, 1978; Hand, Somero, 1982). Гипотетический механизм влияния рН представлен на рис. 10-11; он включает титрование одного или нескольких гистидиновых остатков каждой из субъединиц, в результате чего изменяется структура последних и ослабляются связи, удерживающие все четыре субъединицы вместе. Таким образом, и в этом случае величины  $\alpha_{имид}$ , близкие к 0,5, имеют важное значение для метаболизма. В цитозоле мышечных клеток сдвиги рН могут приводить к протонированию ключевых остатков гистидина в ФФК и тем самым к изменению ее регуляторных свойств и структуры. Благодаря близости значений  $pH_i$  и  $pK$  указанных имидазольных групп фермент, подобный ФФК, может резко изменить свои регуляторные характеристики даже при малых, хотя и физиологически значимых, изменениях  $pH_i$ . Высокая чувствительность фермента обусловлена тем, что его молекула содержит аминокислотные остатки, которые титруются в диапазоне  $pH_i$ , включающем значения, характерные как для покоящейся, так и для активно работающей мышцы. Крутизна кривых титрования наиболее выражена вблизи величины  $pK$  титруемой группы, поэтому близость значений  $pH_i$  и  $pK$  имидазола придает системам, подобным ФФК, оптимальную чувствительность даже к небольшим изменениям рН.

*Величина  $pH_i$  и активация метаболизма.* На примере ФФК мы видели, что изменения  $pH_i$  всего лишь на несколько десятых могут приводить к весьма существенному перераспределению потоков метаболитов. В связи с этим не удивительно, что у самых разнообразных организмов наблюдается тесная корреляция между активацией метаболизма на определенных стадиях развития и изменениями  $pH_i$  (Nuccitelli, Deamer, 1982). Напри-

мер, в период прорастания бактериальных спор  $pH_i$  увеличивается примерно на единицу (Setlow, Setlow, 1980). На ранних стадиях развития животных изменения  $pH$  тоже нередко выполняют важные триггерные функции, активируя метаболизм. Грейнджер и др. (Grainger et al., 1979) показали, что увеличение  $pH_i$  всего лишь на 0,13 единицы после оплодотворения яйцеклетки морского ежа ведет к четырехкратному ускорению синтеза белка. Высказано мнение (Gillies, Deamer, 1979), что небольшие сдвиги  $pH_i$  на протяжении клеточного цикла играют роль в регуляции синтеза ДНК. Некоторое повышение  $pH_i$  сопровождается также активацией метаболизма у артемии (Nuccitelli, Heiple, 1982). Связана ли активация метаболизма во всех этих случаях с активацией ферментов (примером может служить переход димерной формы ФФК в тетрамерную), не ясно. Очевидно, однако, что 1) имидазольные группы гистидина — наиболее вероятные центры титрования при изменении  $pH$  и 2) поддержание  $pH_i$  на уровне, допускающем титрование имидазола, имеет большое значение для разнообразных биологических систем, в которых происходит переход от покоя к активности.

*Свойства внутриклеточных буферных систем.* Ввиду важности поддержания величины  $\alpha_{имид}$  в определенном узком диапазоне (вблизи  $pK$ ) уместно будет рассмотреть буферные системы, наиболее пригодные для этой цели. Обсуждая свойства этих систем, мы не должны забывать принципы «совместимости растворенных веществ», изложенные ранее: одна лишь способность буфера поддерживать нужную величину  $pK$  еще не гарантирует, что его можно использовать во внутриклеточной жидкости в высоких концентрациях. Как мы увидим, в процессе эволюции буферные системы отбираются по двум признакам: *они должны обеспечивать требуемый уровень  $pK$  и быть совместимыми с метаболическим аппаратом клетки.*

Обычно буферные свойства внутриклеточного содержимого определяются главным образом гистидином (Burton, 1978; Somero, 1981), и это вполне понятно, если вспомнить, как важно поддерживать величину  $pH_i$ , близкую к  $pK$  имидазольных групп этой аминокислоты. Гистидин присутствует в клетке в трех различных формах: в виде свободной аминокислоты, в составе белков и в составе дипептидов. В большинстве тканей вклад свободного гистидина в суммарную буферную емкость весьма невелик (исключение составляют мышцы некоторых рыб; Lukton, Olcott, 1958). В наибольшей мере буферные свойства тканей зависят от гистидина белков, хотя в некоторых тканях доминирующее значение приобретают дипептиды, содержащие гистидин (Davey, 1960; Crush, 1970; Burton, 1978; Somero, 1981). Основное внимание мы уделим этим удивительным дипептидам, так

как это интереснейший объект для молекулярной биологии клетки.

Все буферные дипептиды — карнозин, ансерин и офидин — содержат гистидин, иногда модифицированный; вторая аминокислота дипептида тоже может быть модифицирована (табл. 10-5). Обсуждая свойства этих дипептидов, постараемся прежде всего ответить на вопрос: почему буферная емкость некоторых тканей обеспечивается с помощью дипептидов, а не просто свободного гистидина? [Как говорилось в главе 4, наиболее высокой буферной емкостью обладает мышечная ткань, испытывающая недостаток кислорода в короткие периоды интенсивной работы (например, у некоторых рыб) или при небольшой, но продолжительной нагрузке (например, у ныряющих млекопитающих); показано, что буферные свойства такой ткани полностью или почти полностью определяются дипепти-

Таблица 10-5. Дипептидные буферы: структура, свойства и локализация в тканях. (По данным Davey, 1960; Crush, 1970)

Буфер	Химическая структура	Величина рК <sup>1)</sup>	Локализация (концентрация, мМ <sup>2)</sup> )
Карнозин	β-Аланил-L-гистидин	6,83	Мышцы кролика: latissimus dorsi (19,3) [3,2] psoas (21,1) [1,9] сердечная (0) [0] Мышцы синего кита: latissimus dorsi (47,8) [0,4] psoas (48,2) [2,3] Мышцы финвала: latissimus dorsi (47,9) [4,3] psoas (50,0) [0,8] Мышцы курицы: pectoralis (43,5) [12,3] мышцы ноги (7,4) [2,2] Мышцы крысы: latissimus dorsi (8,9) [3,0] gastrocnemius (6,7) [0] сердечная (0) [0] [см. выше величины, указанные в квадратных скобках]
Ансерин	β-Аланил-L-1-метилгистидин	7,04	
Офидин	β-Аланил-L-3-метилгистидин		[см. Crush, 1970]

<sup>1)</sup> Предполагается, что измерения проведены при 25 °С, а величина рК отражает рК<sub>2</sub> имидазольной группы гистидина.

<sup>2)</sup> Более полные сведения о локализации дипептидных буферов и концентрации их в тканях приведены в работе Crush, 1970.



дами (см. Davey, 1960).] На поставленный вопрос возможен такой ответ: использование дипептидов обусловлено, в частности, их меньшей реакционной способностью. Свободный гистидин взаимодействует с различными ферментами, участвующими в его синтезе и включении в белковую молекулу. В дипептиде же гистидин в значительной мере, если не полностью, утрачивает эту способность. Напомним в связи с этим, что один или оба аминокислотных остатка в дипептиде модифицированы (табл. 10-5; ансерин, например, образован  $\beta$ -аланином и 1-метилгистидином). Модификация аминокислот дипептида может затруднять их узнавание соответствующими участками клеточных макромолекул и тем самым еще больше снижать их реактивность. Таким образом, буферные дипептиды скорее всего будут совместимыми растворенными веществами, еще менее способными вступать в реакции с ферментами, чем свободные аминокислоты (напомним, что некоторые организмы накапливают свободные аминокислоты в качестве осмолитов).

Главная основа использования буферных дипептидов — это, конечно, близость  $pK$  их имидазола к оптимальному  $pH$  цитозоля. Выгодность этого для клетки очевидна. Таким образом, довольно инертные дипептиды — идеальное средство для поддержания  $pH$  на уровне, соответствующем структурным и функциональным особенностям ферментов.

Разумеется, не только имидазол мог бы быть «хорошим» буфером. Неорганический фосфат по своим свойствам тоже вполне подошел бы для использования в клетке. И действительно, в большинстве тканей второй по значению буферной системой после имидазольной является фосфатная (Burton, 1978). Важно учитывать, однако, что неорганический фосфат во многих случаях оказался бы несовместимым растворенным веществом. Так, он участвует в самых разнообразных трансформациях ферментов, в том числе в фосфотрансферных реакциях и обратимом фосфорилировании белков. Вполне вероятно, что при очень высоких концентрациях фосфата равновесие этих реакций смещалось бы; взаимодействие фосфата с другими ионами тоже могло бы влиять на химию клетки неблагоприятным образом. Поэтому то, что именно дипептиды используются как главное средство для повышения буферной емкости тканей, можно считать свидетельством их лучшей (по сравнению с фосфатом) совместимости с другими клеточными компонентами.

#### **Величина $pH$ внутриклеточной жидкости и значение ионизации метаболитов**

Обсуждая свойства внутриклеточных буферных систем, мы подчеркивали особую роль имидазольных групп гистидина и отмечали необходимость их пребывания в наполовину протони-

рованном состоянии. Однако проницательный читатель уже, возможно, почувствовал, что эта необходимость сама вытекает из каких-то еще более фундаментальных требований, которым должны отвечать биологические растворы. Чтобы разобраться в этом, зададимся вопросом: почему где-то в начале эволюции клетки для титрования не была отобрана вместо гистидина ка-

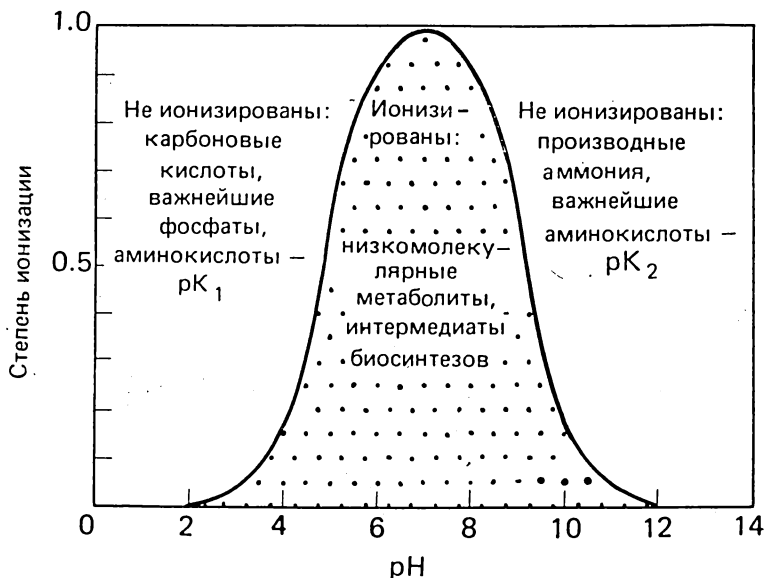


Рис. 10-12. «О важной роли ионизации» (Davis, 1958): влияние величины pH на степень ионизации ключевых биомолекул. Кривая ограничивает область, где большинство низкомолекулярных метаболитов, промежуточных продуктов биосинтеза и имидазольных групп гистидина ионизировано (заряжено). (См. обсуждение в тексте; рисунок и обсуждение по Rahn et al., 1975.)

кая-нибудь другая аминокислота, например с кислой боковой цепью (глутамат или аспартат)? Есть ли вообще основания полагать, что рассмотренные свойства биологических растворов и белковых систем не могли развиваться при внутриклеточном pH порядка 3—5? Эти вопросы имеют принципиальное значение. Насколько мы знаем, наилучшим образом ответил на них Бернард Дэвис (Davis, 1958) в статье, озаглавленной «О важной роли ионизации» («On the importance of being ionized»). Взяв за основу его идею, Ран и др. (Rahn, Howell, Reeves, 1975) рассмотрели эволюцию pH и регуляцию  $\alpha$ -имид. Существо их аргументов иллюстрирует рис. 10-12. При биологических pH почти все промежуточные метаболиты ионизированы. Но, если бы в ходе эволюции было принято иное первоначальное «решение»

и титруемым аминокислотным остатком в клетке оказался глутамат или аспартат, многие из этих метаболитов были бы электронеутральными. Почему же так важно, чтобы они имели заряд? Дэвис высказал вполне обоснованную догадку, что заряженные частицы легче удержать в клетке, чем незаряженные. Это как будто подтверждается экспериментальными данными, касающимися разнообразных метаболитов (например, фосфорилирование глюкозы в гексокиназной реакции позволяет эффективно «запереть» молекулы глюкозы в клетках печени). На самых ранних этапах эволюции первичной клетки, когда многие или даже все нужные ей органические вещества поступали из окружающей среды, было необычайно важно «уметь» захватывать их и удерживать в клетке. Позже, когда клетка приобрела способность синтезировать органические молекулы, необходимые для энергетического обмена и биосинтезов, эти «самодельные» молекулы тоже не должны были выходить наружу. Задача их удержания в клетке решалась бы сравнительно легко, если бы величина рН внутриклеточной жидкости обеспечивала заряженное состояние интермедиатов. Поэтому главным внутриклеточным буфером могла быть та аминокислота, у которой величина рК близка к значению рН, соответствующему максимальной ионизации метаболитов; именно этот аминокислотный остаток и титровался бы в молекулах ферментов. Таким образом, наблюдаемое сегодня разнообразие функций гистидина можно связать с отбором, шедшим на заре эволюции, когда уже было необходимо, чтобы компоненты внутриклеточной жидкости находились в ионизированном состоянии.

### **Растворяющая способность воды и эволюция метаболизма**

До сих пор в этой главе в основном обсуждались свойства растворенных веществ: мы говорили об осмолитах, протонах, буферах и белках, игнорируя сам растворитель — воду. Биохимики часто фокусируют свое внимание лишь на химии веществ, растворенных в клеточной воде, не рассматривая саму среду, в которой происходят почти все метаболические превращения. Но, если мы попытаемся перечислить все множество разнообразных соединений, содержащихся в малом объеме внутриклеточной жидкости, сама собой выявится важная проблема. Ее можно было бы назвать «проблемой растворяющей способности». Каким образом клетке удается разместить такое множество различных метаболитов, ферментов, осмолитов, нуклеиновых кислот и т. д. в столь малом объеме воды? На этот вопрос нельзя ответить в двух словах. Решение проблемы связано, по-видимому, с различными аспектами организации внутриклеточных процессов. Ниже мы кратко рассмотрим некоторые

адаптации, которые могут играть важную роль в разрешении этой задачи.

*Почему именно  $K^+$ ?* Анализ принципов «конструирования» биологических растворов, содержащих тысячи различных ферментных систем, целесообразно начать с обсуждения вопроса: одинаковое ли количество воды требуется для растворения веществ разных типов? Рассмотрим этот вопрос конкретно применительно к ионам  $K^+$  и  $Na^+$ . Из одновалентных катионов в клетке почти всегда преобладает  $K^+$ , а не  $Na^+$ . Можно ли объяснить это хотя бы отчасти различиями в гидратации этих ионов и разным влиянием их на структуру воды? По мнению Уиггинса (Wiggins, 1971, 1979), дело обстоит именно так. Суть ее аргументации сводится к следующему: ион калия больше иона натрия, поэтому плотность заряда у него меньше; соответственно эти ионы по-разному влияют на структуру воды — натрий оказывает структурирующее действие, тогда как калий, напротив, разрушает структуру воды.

Из этого различия между  $K^+$  и  $Na^+$  вытекает ряд следствий. С одной стороны, для клетки может быть выгодным избирательное поглощение  $K^+$  из окружающей ее среды и выведение  $Na^+$  наружу, так как при этом снижается потребность в воде как растворителе неорганических ионов. Поэтому накопление в клетке  $K^+$  вместо  $Na^+$  увеличивает возможности для растворения других веществ. С другой стороны, различное влияние  $K^+$  и  $Na^+$  на структуру воды можно интерпретировать и противоположным образом. Некоторые авторы (см. Hazlewood, 1979; Ling, 1979; Wiggins, 1971, 1979) высказывают предположение, что аккумуляции этих ионов в клеточной воде, которая уже сильно структурирована, протекает с большей или меньшей легкостью в зависимости от того, насколько при этом уменьшается растворяющая способность воды. В этой гипотезе предполагается, что высокая структурированность внутриклеточной воды обусловлена присутствием в клетке белков, мембран, нуклеиновых кислот и тысяч органических метаболитов. При такой структурированности желательно, чтобы растворение неорганического катиона (особенно в концентрациях около 0,1 М; см. табл. 10-1) лишь незначительно уменьшало растворяющую способность воды. Поэтому избирательное накопление  $K^+$ , а не  $Na^+$  в клетке можно рассматривать как физико-химическое следствие включения ионов в растворы с «плотной упаковкой» компонентов. Некоторые авторы полагают даже, что высокая концентрация  $K^+$  в клетке и низкая концентрация  $Na^+$  создавалась бы и без ионных насосов, получающих энергию от гидролиза АТФ (Ling, 1979). Большинство исследователей ионного транспорта не разделяют эту крайнюю точку зрения, однако различное влияние  $K^+$  и  $Na^+$  на структуру воды все

же, видимо, как-то учитывается в «конструкции» биологических растворов.

*Адаптации, снижающие необходимые концентрации субстратов.* В «конструкции» биологических растворов должно учитываться еще одно важное обстоятельство. В клетке протекает огромное множество разнообразных ферментативных реакций, и в каждой из них помимо фермента участвуют еще один или несколько субстратов и кофакторов, и все это нужно разместить в минимальном объеме воды. Первым из биохимиков всесторонне проанализировал эту проблему Эткинсон (Atkinson, 1969), и некоторые из его идей заслуживают рассмотрения. Он показал, что многие общие черты клеточной архитектуры, кинетические свойства ферментов и даже химические особенности субстратов можно объяснить отбором, направленным на уменьшение необходимого объема внутриклеточной воды.

1. *Сродство ферментов к субстратам.* Ферменты не только обеспечивают высокую скорость метаболических реакций при низких температурах, но и делают это при очень низких концентрациях субстратов и кофакторов. Большинство промежуточных продуктов присутствует в клетке в концентрациях, не превышающих 1 мМ (см. таблицу на стр. 256 в работе Fersht, 1977). Сродство ферментов к субстратам и кофакторам исключительно велико, поэтому внутриклеточная вода не «растрачивается» на создание высоких концентраций лигандов. Столь высокое сродство ферментов к лигандам имеет важнейшее адаптивное значение, так как открывает возможности для развития сложных метаболических систем. Мы полагаем, что сохранение этого сродства при всех помехах со стороны температуры, давления и растворенных веществ было одной из главных задач в процессе эволюции белков.

Важно, однако, понимать, что само по себе высокое сродство к лиганду еще не обеспечивает достаточной адаптации фермента. Эткинсон (Atkinson, 1969) внес в этот вопрос полную ясность, проанализировав случай, когда фермент обладает настолько высоким сродством к субстрату, что насыщается им (т. е. скорость реакции достигает  $V_{\max}$ ) уже при условиях, обычно существующих в клетке. Дальнейшее увеличение притока субстрата в этом случае поведет к быстрому росту его концентрации (рис. 10-13). Иными словами, для того чтобы справиться с увеличением метаболического потока, нужны соответствующие «резервные мощности», т. е. в обычных условиях фермент должен работать, не насыщаясь субстратом (ниже уровня  $V_{\max}$ ). Именно этим объясняется то, что концентрации субстратов в клетке, как правило, ниже соответствующих  $K_m$  ферментов (Fersht, 1977, p. 256). Таким образом, в основе эволюционных изменений фермент-субстратного сродства ле-

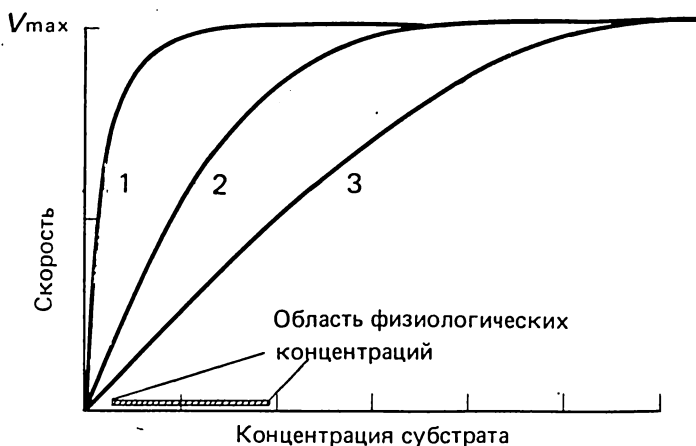


Рис. 10-13. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для трех форм фермента с одинаковой каталитической способностью (на рисунке величины  $V_{\max}$  у них одинаковы), но разной кажущейся  $K_M$ . Самая низкая  $K_M$  у фермента 1, и в этом случае  $V_{\max}$  достигается при наиболее низких концентрациях субстрата. Насыщение этого фермента субстратом происходит настолько быстро, что скорость реакции приближается к  $V_{\max}$  уже примерно на середине области физиологических концентраций субстрата. В этих условиях может происходить резкое возрастание концентрации субстрата. Фермент 3 не насыщается субстратом в физиологических условиях, но и никогда не работает в полную силу. Фермент 2 — «наилучший» из всех трех: его  $K_M$  относительно невелика, поэтому при физиологических концентрациях субстрата он обеспечивает достаточную скорость реакции и в то же время обладает некоторым «резервом мощности», т. е. способен при возрастании концентрации субстрата существенно увеличить интенсивность катализа, не достигая при этом насыщения субстратом.

жат два важных принципа. С одной стороны, это средство должно быть очень высоким, чтобы обеспечить эффективный катализ при низких концентрациях субстратов. А с другой стороны, оно должно быть таким, чтобы фермент не насыщался субстратом (т. е. работал значительно ниже уровня  $V_{\max}$ ) и тем самым исключалась опасность быстрого накопления субстрата при увеличении потока метаболитов. Поэтому регуляторные механизмы клетки поддерживают физиологические концентрации субстратов на уровне, близком к  $K_M$  или ниже.

2. *Эволюция метаболитов.* Еще одна опасность в случае создания высоких концентраций субстратов связана с тем, что субстраты нередко обладают высокой реакционной способностью и (или) могут сильно нарушать внутриклеточный кислотно-щелочной баланс. Этот эффект, так же как и сложности,

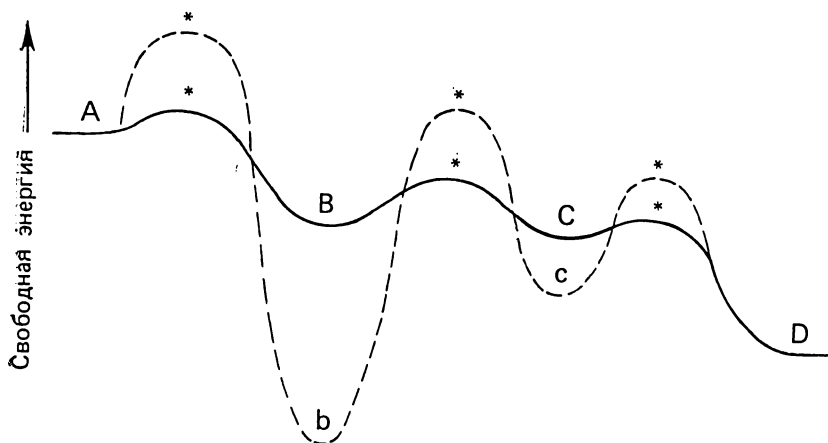


Рис. 10-14. Изменение свободной энергии при последовательности реакций, протекающих без участия ферментов (прерывистая линия), и ферментативных реакций (сплошная линия). Исходное вещество А превращается в конечный продукт D с образованием двух промежуточных продуктов — В (b) и С (c); прописные буквы относятся к ферментативным реакциям, строчные — к неферментативным. Ферменты существенно изменяют энергетический профиль реакций: они снижают энергию активированных комплексов (переходных состояний), обозначенных на рисунке значками \*. Благодаря образованию высокоэнергетических активированных форм субстратов В и С удается избежать «провалов» свободной энергии в ходе реакции. Если реакция протекает вблизи точки равновесия, выбраться из «энергетической ямы» (особенно такой, как в случае b) можно, лишь увеличив концентрацию промежуточного продукта до крайних пределов. Подробнее см. в тексте. (По Atkinson, 1969, с изменениями.)

связанные с малым объемом растворителя, проявляется в минимальной степени, если концентрации субстратов в клетке равны или ниже  $K_m$ . Однако есть немало метаболических реакций, для которых равновесие достигается лишь при исключительно высоких концентрациях субстрата; в этих случаях возникают проблемы, связанные с растворением субстрата и с его токсическим действием.

Обладая поразительной способностью ускорять химические реакции, ферменты, однако, не могут сдвигать равновесие этих реакций, т. е. влиять на суммарное изменение свободной энергии. Это фундаментальное и непреодолимое ограничение потребовало значительных эволюционных изменений ключевых промежуточных продуктов метаболизма. Как подчеркивал Эткинсон (Atkinson, 1969), нужная скорость метаболической реакции, «невыгодной» с точки зрения изменения свободной энергии, иногда достижима лишь при очень высоких, непереносимых для клетки концентрациях исходных веществ (рис. 10-14). Так,

концентрация субстрата А для его превращения в В в условиях, близких к химическому равновесию, часто должна быть намного выше, чем это допустимо для живой клетки.

Эти трудности преодолеваются путем использования активированной формы субстрата. Общеизвестный пример — активированная форма уксусной кислоты, ее тиоэфир ацетилкофермент А. Это вещество с очень большой отрицательной величиной свободной энергии гидролиза; поэтому реакции, в которых ацетат участвует в форме ацетил-СоА, могут протекать даже при очень низких концентрациях субстрата. Как показано на рис. 10-14, в результате образования таких активированных форм с высокой свободной энергией гидролиза энергетический профиль реакции сглаживается — исчезают глубокие энергетические «ямы», для выхода из которых при низкой свободной энергии реагентов требуются очень высокие их концентрации. Наряду с тиоэфирами в качестве активированных форм часто выступают фосфорилированные производные.

3. *Регуляция активности ферментов: аллостерический контроль.* Большое ускорение работы того или иного метаболического пути, например при интенсивной мышечной работе, не связано со значительным ростом концентраций промежуточных продуктов (хотя анаэробные конечные продукты могут накапливаться в больших количествах, — эта проблема обсуждалась в других разделах книги). Ключевую роль в способности метаболических путей изменять интенсивность потоков без резкого повышения концентраций метаболитов играют так называемые «вентильные» ферменты, выполняющие функцию чувствительных регуляторов. При поступлении сигнала, требующего ускорить работу данного метаболического пути, происходит строго координированная активация надлежащих регуляторных ферментов и тем самым устраняются «узкие места» этого пути. Иногда возникающие при этом небольшие подъемы концентраций некоторых субстратов, как правило, непродолжительны. Способность регуляторных ферментов быстро реагировать на аллостерические модуляторы следует рассматривать как свойство, выгодное для клетки в двух отношениях: с одной стороны, оно облегчает реакцию клетки на то или иное внешнее обстоятельство, когда, например, требуется резко усилить активность; с другой стороны, при этом не происходит накопления интермедиатов, которые могли бы снизить растворяющую способность воды или оказаться токсичными для клетки.

4. *Другие ферментные адаптации, уменьшающие потребность в растворителе.* У ферментных систем известен и ряд других особенностей, которые способствуют экономному использованию внутриклеточной воды. Возможно, что эти особенности не явились итогом специального адаптивного процес-



са, а возникли при решении каких-то иных задач. Например, при появлении в среде нового ценного пищевого субстрата возникает необходимость в новых реакциях, и ферменты нового пути синтезируются одновременно и координированно, что сводит к минимуму накопление промежуточных продуктов. Еще одна особенность многих путей обмена, уменьшающая потребность в воде, — это объединение ферментов какой-то цепи реакций в один структурный агрегат. Примером может служить хорошо известный пируватдегидрогеназный комплекс. В этом случае все промежуточные продукты данной цепи оказываются в ближайшем микроокружении такого комплекса. Если бы те же ферменты были распределены более или менее случайным образом во всем цитозоле, то потребовались бы значительно более высокие концентрации промежуточных субстратов.

### Заключительные замечания

На протяжении всей этой главы мы пытались показать, что свойства биологических растворов сформировались в результате особого рода эволюционных адаптаций, которые часто не привлекают внимания биологов. Было выявлено существование оптимальных для клетки значений рН. Мы показали, что некоторые типы осмотически активных веществ и их комбинации особо благоприятны для поддержания надлежащей структуры и функции макромолекул. Подобные адаптации тесно связаны и со свойствами воды как растворителя, хотя в целом взаимодействия между водой, растворенными веществами и макромолекулами еще недостаточно изучены.

Относительно мало внимания мы уделили водно-солевому балансу на физиологическом уровне. Это не было случайностью: хотя имеется много хороших и достаточно новых источников данных об осмотической и ионной регуляции, например, у животных (Gilles, 1979; Maloiy, 1979; Yancey et al., 1982), вопрос о том, почему некоторые типы растворенных веществ играют особо важную роль в ионной и осмотической регуляции, обсуждался недостаточно. Мы хотели лишь раскрыть перед читателем основные положения, позволяющие понять, почему живые организмы тратят столько усилий на регуляцию состава своих внутриклеточных и внеклеточных жидкостей.

# Адаптация к температуре

## Введение: первичные температурные эффекты

Каждому, кто изучает биологию, известно, насколько зависят от температуры распространение вида, скорость физиологических процессов и в конечном счете само выживание организмов. Зоогеографы, например, давно уже знакомы с изменениями фауны в соответствии с географическими температурными градиентами. Множество физиологических работ посвящено влиянию температуры на скорость метаболических реакций и других важнейших процессов. Биохимики уделяют большое внимание действию температуры на каталитические и регуляторные свойства ферментов, на структуру ферментов и других белков. Таким образом, к какому бы уровню биологической организации мы ни обратились, везде можно увидеть, какую важную, а иногда даже главную роль играет температура во взаимоотношении организма с окружающей средой. В этой главе мы рассмотрим некоторые стороны влияния температуры на биологические процессы, выбирая для анализа явления, особенно важные для понимания тех главных стратегий биохимической адаптации, которым посвящена вся книга. Однако перед этим мы должны сделать краткий обзор первичных эффектов при воздействии температуры на биологические системы. Это позволит нам глубже осознать, насколько велико и многообразно влияние температуры на живые организмы и каковы возможности адаптации организмов к изменениям температуры среды.

Для того чтобы понять влияние температуры на различные структуры и функции живых систем, необходимо сначала четко определить, что такое в нашем понимании *температура* и чем она отличается от *теплоты*. Чтобы разграничить эти два понятия, можно сказать, что температура — это мера интенсивности тепловой энергии системы, кинетической энергии ее компонентов. При температурах биологического диапазона движение этих компонентов в основном поступательное и лишь в меньшей степени — вращательное. Температуру измеряют в градусах Цельсия ( $^{\circ}\text{C}$ ) или в градусах абсолютной температуры. Тепло-

та, в отличие от температуры, — это мера общей энергии системы; ее выражают в калориях или джоулях (1 Дж = 4,18 кал). Для каждого вещества, разумеется, существует определенная связь между температурой и теплотой. Так, при 0°C (273°K) тепловая энергия одного моля воды составляет 2,6 ккал, а при 60°C (333°K) — 3,8 ккал.

Сами по себе эти несколько абстрактные определения, вероятно, мало что говорят читателю о том, как и насколько сильно влияет температура на биологические объекты. Для того чтобы лучше в этом разобраться, необходимо подробнее остановиться на двух типах температурных эффектов, лежащих в основе большинства видов воздействия температуры на биологические процессы. К этим двум типам относятся: а) влияние температуры на скорость реакций и б) влияние на равновесие реакций, особенно тех, которые связаны с образованием или разрывом нековалентных («слабых») химических связей.

*Влияние температуры на скорость реакций.* Все мы знаем, что с повышением температуры скорость химических реакций возрастает. Однако многие читатели, вероятно, не представляют себе, насколько сильно изменяется скорость реакций даже при небольших изменениях температуры, и не знают, что лежит в основе этого явления. В качестве меры влияния температуры на скорость реакций в биологии часто используют показатель  $Q_{10}$  — отношение скоростей реакции при двух температурах, различающихся на 10 градусов С (или К, так как величина градуса в обеих шкалах одинакова). Таким образом,

$$Q_{10} = \frac{\text{Скорость при } (T^{\circ} + 10^{\circ})^1)}{\text{Скорость при } (T^{\circ})}$$

Увеличение скорости реакции вдвое при повышении температуры на 10°C (К) (т. е.  $Q_{10}=2,0$ ), казалось бы, должно быть связано с большим относительным изменением температуры. Однако величины  $Q_{10}$ , близкие к 2, которые характерны для многих физиологических и биохимических процессов, соответствуют повышению абсолютной температуры всего лишь примерно на 3% по сравнению с комнатной  $[10/(273+25)]$ . Почему же такой небольшой в процентном отношении сдвиг абсолютной температуры приводит к ускорению реакций примерно на 100%?

<sup>1)</sup> Существует более общее выражение для  $Q_{10}$ , позволяющее вычислить этот показатель для любого температурного диапазона:

$$Q_{10} = \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{10/(T_2^{\circ} - T_1^{\circ})}$$

где  $k_1$  и  $k_2$  — константы скоростей при температурах  $T_1^{\circ}$  и  $T_2^{\circ}$  соответственно.

На этот вопрос ответил Сванте Аррениус в 80-х годах прошлого века. Согласно его представлениям, ставшим впоследствии одной из догм физической химии и термодинамики, важнейшее значение имеют молекулы, реакционноспособные при данной температуре. Из рис. 11-1 видно, что при той или иной температуре лишь небольшая доля всех молекул обладает до-

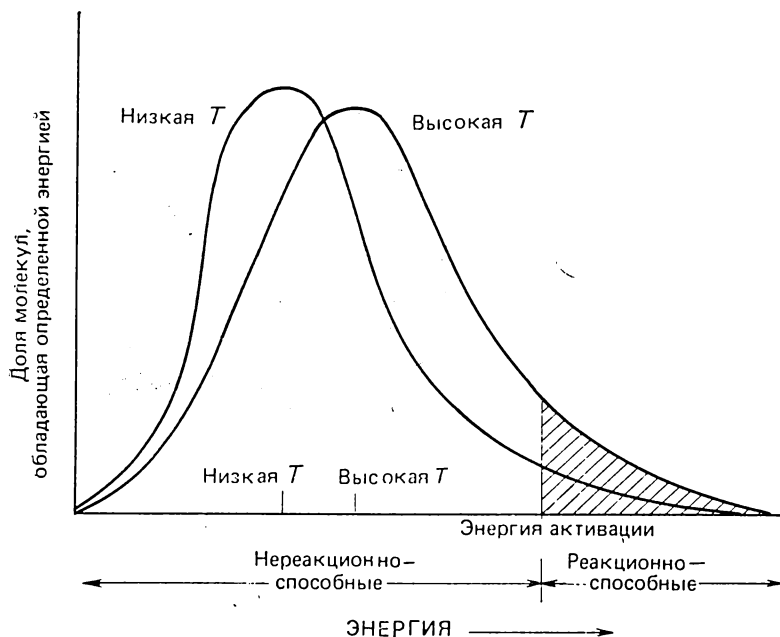


Рис. 11-1. Кривые распределения энергии молекул при двух различных температурах (по уравнениям Максвелла — Больцмана). Средняя энергия молекул равна температуре всей системы в градусах Кельвина. В реакцию могут вступать только те молекулы, энергия которых равна или больше энергии активации.

статочной энергией, чтобы вступить в реакцию, и повышение температуры приводит к существенному увеличению этой доли. Энергия реакционноспособных молекул должна быть равна или больше некоторой минимальной энергии активации для данной реакции. С точки зрения влияния температуры на скорость реакции энергия активации представляет собой энтальпию активации ( $\Delta H$ ), измеряемую в килокалориях на 1 моль. Эта величина входит в уравнение зависимости скорости реакций от температуры:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H^*}{RT},$$

где  $k$  — константа скорости реакции,  $T$  — абсолютная температура и  $R$  — универсальная газовая постоянная. В дальнейшем в полном уравнении свободной энергии активации ( $\Delta G^*$ ) мы столкнемся также с такой величиной, как энтропия ( $\Delta S^*$ ). Однако именно с величиной  $\Delta H^*$  связаны значительные изменения скорости реакции при небольших относительных сдвигах абсолютной температуры. Изменения взаимоотношений между скоростью реакции, сдвигом температуры и  $\Delta H^*$  можно считать одним из важнейших способов биохимической адаптации к температуре.

Таблица 11-1. Изменения энтальпии при образовании слабых связей<sup>1)</sup>

Тип связей	Энтальпия образования, ккал/моль (приближенные значения)
Вандерваальсовы взаимодействия	—1
Водородные связи	—(3—7)
Электростатические (ионные) связи	—5
Гидрофобные взаимодействия	+ (1—3)

<sup>1)</sup> Суммарные изменения энтальпии при образовании слабых связей между участками белковых молекул (или между компонентами нуклеиновых кислот, между белками и липидами и т. п.; см. табл. 11-2) могут включать также изменения энтальпии при разрыве слабых связей между макромолекулами и окружающей водой. В связи с этим суммарные изменения энтальпии могут быть весьма невелики, так как, например, из тепла, выделяющегося при образовании водородных связей между двумя белковыми группировками, может вычитаться тепло, затрачиваемое на разрыв водородных связей между белком и водой.

*Влияние температуры на равновесие реакций.* Изменения температуры не только сильно влияют на константы скоростей химических реакций, но часто вызывают также существенный сдвиг их равновесия. Это касается в особенности тех реакций, в которых происходит обратимое образование нековалентных («слабых») связей (табл. 11-1). Ковалентные связи, с помощью которых соединяются аминокислотные остатки в белках или основания в ДНК или РНК, — это относительно прочные связи, и в отсутствие ферментов, катализирующих их гидролиз, они не особенно чувствительны к изменениям температуры в биологическом диапазоне. Напротив, водородные, электростатические, вандерваальсовы и гидрофобные связи, лежащие в основе множества биологических функций (табл. 11-2), легко разрываются при небольших изменениях температуры. Равновесие реакций, в которых образуются или разрываются «слабые» связи, и будет в центре нашего внимания, так как это равновесие, как уже говорилось, очень чувствительно к температуре и чрезвычайно важно для множества различных биологических структур и процессов.

Здесь необходимо несколько подробнее рассмотреть роль слабых связей и их энергетические характеристики. Это поможет нам понять одну очень важную особенность макромолекулярных систем, в том числе ферментов, нуклеиновых кислот и мембран. Пользуясь удачным термином Александрова (1977), эту особенность можно назвать «полустабильностью». Для всех биологических структур, стабилизируемых слабыми связями, характерна общая черта: они не жестки и неизменны, а, напротив, изменяются в процессе своего функционирования. Поэтому таким структурам должна быть внутренне присуща гиб-

Таблица 11-2. Биологические структуры и процессы, сохранение или эффективность которых зависит от слабых химических связей (см. табл. 11-1)

---

Структура белка
Вторичная структура (альфа-спирали, бета-слои)
Третичная структура (конформация)
Четвертичная структура (агрегация субъединиц)
Надмолекулярные связи белка (например, в мембранах)
Структура нуклеиновых кислот (например, двойная спираль и структура тРНК)
Комплексы фермент-лиганд
Физическое состояние (вязкость) липидов
Связывание гормонов с рецепторами
Структура воды

---

кость, и она достигается благодаря использованию слабых связей при образовании структуры высшего порядка (табл. 11-2). Например, конформация ферментов часто изменяется при связывании ими лигандов или при катализе. Такого рода конформационные изменения могут требоваться для точной «подгонки» активных участков к реактивным группам субстратов и кофакторов. Фермент с жесткой структурой, не способный претерпевать такие конформационные изменения, был бы исключительно стабильным и долговечным, но бесполезным с функциональной точки зрения. Мы подробнее рассмотрим взаимоотношения между гибкостью и функциональными свойствами ферментов в последующих разделах этой главы, а также в главе 12 при анализе эффектов давления. Здесь же достаточно будет подчеркнуть, что очень многие биологические системы (особенно ферменты и мембраны) могут оптимально функционировать лишь тогда, когда они находятся в состоянии тонко сбалансированного равновесия между гибкостью и стабильностью.

Особое значение для температурных эффектов имеет еще одна особенность слабых связей — то, что *знак* изменения энтальпии при образовании различных видов этих связей не оди-

наков (см. табл. 11-1). Возникновение водородных связей, электростатических и вандерваальсовых взаимодействий сопровождается отрицательным изменением энтальпии, а гидрофобных — положительным. Значит, повышение температуры будет расшатывать первые три вида слабых связей и стабилизировать гидрофобные взаимодействия. В связи с этим влияние температуры на систему, включающую слабые связи, частично зависит от того, какая разновидность этих связей играет главную роль в стабилизации системы в целом.

*Проблемы, возникающие в связи с влиянием температуры.* В первой главе книги мы указывали, что три главные «консервативные» цели биохимической адаптации состоят в сохранении надлежащей структуры макромолекул, поддержании нужных метаболических потоков и точной регуляции метаболизма. Отсюда становится ясным круг проблем, возникающих в связи с температурными воздействиями. Поскольку многие биологические структуры зависят от слабых химических связей, температура сильно влияет на метаболический аппарат и его регуляцию. Точно так же влияние температуры на скорость реакций отражается на величине метаболического потока. В связи с этим эволюционные изменения, направленные на адаптацию к температуре, весьма широко распространены, так же как и фенотипические изменения у организмов, сталкивающихся с кратковременными колебаниями температуры.

Для того чтобы справиться с этими проблемами, живые организмы использовали два совершенно разных способа адаптации. У многих животных выработалась способность поддерживать температуру тела в узких пределах (*гомойотермия*). К таким животным относятся прежде всего птицы и млекопитающие, однако гомойотермия встречается и у беспозвоночных. Преимущества этой стратегии совершенно очевидны, однако поддержание постоянной температуры тела не дается даром, и поэтому (а в некоторых случаях в связи с определенным строением тела) у большинства организмов температура тела довольно близка к температуре окружающей среды. Такие организмы называют *эктотермными*. Именно у эктотермных животных мы находим многообразные биохимические приспособления, направленные на компенсацию (или даже использование) эффектов, вызываемых изменениями температуры. У гомойотермных животных, особенно у тех, которые способны вырабатывать тепло с целью терморегуляции (эндотермные организмы), специальные биохимические адаптации гораздо менее развиты и преследуют две главные цели: а) обеспечить большую выработку метаболического тепла в ответ на охлаждение и б) изменять теплообмен, когда нужно повысить или понизить температуру тела. Ниже мы рассмотрим особенности эндотермных и гомойо-

термных животных, уделяя особое внимание адаптации ферментных систем, благодаря которой животные приобрели способность в высокой степени регулировать температуру тела — способность, позволяющую им избегать температурных стрессов.

### Эндотермия и регуляция температуры тела

*Преимущества и цена эндотермии.* Поскольку изменения температуры оказывают столь многостороннее влияние на структуры и функции живых организмов, способность поддерживать температуру тела независимо от колебаний температуры среды дает много преимуществ. У животных, регулирующих температуру тела путем выработки тепла клетками (эндотермных организмов), интенсивность жизненно важных процессов поддерживается на относительно постоянном уровне даже при резких изменениях окружающей температуры. Особенно важным преимуществом постоянной температуры тела, возможно, является стабильность деятельности нервной системы. Благодаря постоянству температуры мозга у них нет таких периодов оцепенения, как, например, у большинства рептилий. при низкой температуре среды. Постоянство температуры тела у млекопитающих имеет далеко идущие экологические последствия. Так, способность к активному образу жизни ночью, когда температура среды обычно ниже, чем днем, позволяет млекопитающим осуществлять важную деятельность (например, поиск пищи) в часы, когда их конкуренты или потенциальные враги спят. Может быть, именно поэтому большинство млекопитающих активно в ночное время или в сумерки.

Еще одно преимущество эндотермных животных состоит в том, что в выборе местообитания они меньше зависят от температуры. Яркий пример такого экологического преимущества — животные, обитающие в морях высоких широт: они могут жить в воде, температура которой ниже точки замерзания крови млекопитающих, и для некоторых китов и тюленей в антарктических морях важным источником пищи служат скопления криля. Еще один пример — теплокровные рыбы вроде голубого тунца (*Thunnus thynnus*). Благодаря высокой интенсивности обменных процессов и большой массе тела эти животные (по крайней мере крупные взрослые рыбы) могут в значительной мере поддерживать температуру тела выше температуры окружающей среды. В связи с этим взрослые особи голубого тунца могут проводить большую часть жизни в холодных, но богатых пищей морях высоких широт, хотя рождаются в тропических морях, где происходит нерест. Таким образом, эндотермия обеспечивает млекопитающим, птицам и даже некоторым ры-



бам и насекомым значительную свободу в выборе мест обитания независимо от температурных условий.

За преимущество эндотермии приходится расплачиваться довольно дорогой ценой. Даже в том случае, если эндотермное животное обладает хорошей теплоизоляцией (как многие птицы или млекопитающие), уровень основного обмена, необходимый для возмещения потери тепла при высокой температуре тела, примерно в 10 раз выше, чем у эктотермного животного таких же размеров (Bennett, Ruben, 1979). Соответственно эндотермные животные должны потреблять и перерабатывать во много раз больше пищи. В связи с этим плотность популяций эндотермных животных не может быть такой же большой, как у эктотермных. Это очевидно даже при поверхностном ознакомлении с природными пищевыми цепями.

Но если эндотермия дает важные преимущества, то почему она не распространена в животном царстве гораздо шире? Для ответа на этот вопрос нужно учитывать множество анатомических, физиологических и экологических факторов. У многих животных отношение поверхности тела к объему слишком велико для того, чтобы они могли сохранять значительную часть метаболического тепла. Например, очень мелкие животные могут оказаться неспособными к эндотермной регуляции температуры тела, хотя, впрочем, это зависит также от температуры окружающей среды (Трасу, 1977). При небольшой разнице между температурами тела и среды эндотермная регуляция значительно облегчается. Возможность эндотермной регуляции зависит также от способа дыхания. Животные, дышащие воздухом, обладают в этом отношении явным преимуществом по сравнению с теми, которые дышат жабрами в воде: в воздухе кислорода гораздо больше, чем в воде, а вода служит прекрасным проводником тепла. В связи с этим эндотермных животных, извлекающих  $O_2$  из воды, очень немного. Кроме того, способность к эндотермии зависит от общего уровня активности животного, который в свою очередь часто определяется способом добывания пищи. В этом отношении очень показателен яркий контраст между тунцом и глубоководным морским чертом. Обе рыбы обитают в холодной воде, однако тунец, для того чтобы сохранить плавучесть и обеспечить вентиляцию жабр, должен все время быстро плавать. В связи с этим интенсивность метаболизма у него высока, и образующегося при этом тепла достаточно для терморегуляции. Напротив, морской черт — малоподвижная рыба, уровень обмена у него на 2—3 порядка ниже, чем у тунца (см. гл. 12), и выработка тепла недостаточна для эндотермной регуляции температуры тела.

Разделение животных на эндотермных и эктотермных или на гомойотермных и пойкилотермных (с непостоянной темпера-

турой тела), как и многие другие разграничения, которые мы пытаемся навязать природе, не абсолютно. Многие животные бывают эндотермными и гомойотермными лишь тогда, когда это возможно, например при подходящей температуре среды и (или) при достаточном количестве пищи, но при неблагоприятных для гомойотермии условиях температура тела резко снижается. Хорошо известный пример — животные, впадающие в зимнюю спячку. Так, у суслика нормальная температура тела составляет 37—39°C, однако во время спячки она колеблется в пределах нескольких градусов около 0°C. Существуют эндотермные животные со значительными суточными изменениями температуры тела. У колибри, например, температура тела ночью такая же, как у окружающей среды. Эти маленькие птички способны к очень интенсивному дыханию, поэтому их организм может быстро согреваться. Напротив, если в спячку впадает очень крупное животное (например, медведь) и организм его может прогреваться лишь очень медленно, то температура его тела не снижается до уровня окружающей среды. Такую стратегию, при которой температура тела поддерживается на постоянном уровне, когда это возможно, но может снижаться, когда условия неблагоприятны, обычно называют «гетеротермией». Гетеротермия широко распространена у млекопитающих и птиц, особенно у обитателей высоких широт.

*Биохимические предпосылки для эндотермной регуляции.* Хотя у низших позвоночных (рыб, амфибий и рептилий) эндотермия встречается редко, условия для эндотермии у них в принципе существуют, так же как и у любых других живых организмов. Любые обменные процессы связаны с выработкой тепла, но главная особенность эндотермных животных состоит в том, что у них имеются механизмы усиления этих процессов для целей терморегуляции. (Есть еще одно условие эндотермной гомойотермии — тонкая регуляция теплообмена между организмом и окружающей средой; примеры такой регуляции мы рассмотрим несколько позже.)

Главное, о чем необходимо помнить при анализе механизмов выработки тепла у эндотермных животных, — это то, что *независимо от вида животного, субстратов катаболизма или соотношения между аэробными и анаэробными процессами примерно 75% энергии, заключенной в химических связях питательных веществ, рассеивается при их распаде в виде тепла.* Убедительные данные на этот счет содержатся в табл. 11-3 (Prusiner, Poe, 1968). Это означает, что для эндотермии не нужны какие-то особые метаболические механизмы. Задача эндотермного организма состоит в том, чтобы использовать уже имеющиеся обменные реакции, в ходе которых всегда вырабатывается тепло. Иными словами, необходимо просто увеличить

поток вещества в уже имеющихся путях катаболизма и по возможности найти способы, позволяющие в особых случаях (при острой нужде в дополнительной выработке тепла) использовать для теплопродукции также и те 25% энергии, которые запасаются в химических связях (например, в АТФ). Эти простые принципы характерны для всех известных нам эндотермных животных, и теперь мы рассмотрим некоторые примеры эндотермной регуляции у позвоночных и беспозвоночных животных. Как мы увидим, у совершенно разных организмов для дости-

Таблица 11-3. Изменения энтальпии при окислении различных субстратов

Окислительная реакция	$\Delta H$ сгорания (окисления), ккал/моль	$\Delta H$ после синтеза АТФ, ккал/моль	Доля тепла, % <sup>1)</sup>
$\text{NADH} + \frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$	—62	—48	77
Сукцинат + $\frac{1}{2}\text{O}_2 =$ фумарат + $\text{H}_2\text{O}$	—36	—27	74
Олеиновая кислота + $25\frac{1}{2}\text{O}_2 =$ $= 18\text{CO}_2 + 17\text{H}_2\text{O}$	—2,657	—1,994	75
Уксусная кислота + $2\text{O}_2 = 2\text{CO}_2 +$ $+ 2\text{H}_2\text{O}$	—209	—162	78
Молочная кислота + $3\text{O}_2 =$ $= 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$	—326	—264	81
Глюкоза + $6\text{O}_2 = 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	—673	—519	77

<sup>1)</sup> «Доля тепла» — это та часть теплоты реакции, которая не запасается в высокоэнергетических связях АТФ. Она равна отношению изменения энтальпии после синтеза АТФ к общему изменению энтальпии при полном сгорании или окислении данного субстрата (в первых двух реакциях имеет место полное окисление, а в остальных — полное сгорание до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). Значения «доли тепла» получены по расчетам Prusiner, Pore, 1968; по данным этих авторов, изменения энтальпии при гидролизе (или синтезе) АТФ составляют около 4,7 ккал/моль.

жения одной и той же приспособительной цели могут использоваться сходные механизмы.

**Бурая жировая ткань.** Анализ механизмов эндотермии мы начнем с рассмотрения ткани, служащей только для термогенеза, — бурой жировой ткани. Это единственная ткань, функция которой заключается только в выработке тепла. Однако и здесь действует указанный выше принцип, согласно которому основой эндотермии служит использование уже существующих биохимических систем. В самом деле, сегодня известен только один белок, отличающий митохондрии (главный источник тепла) бурой жировой ткани от митохондрий других тканей. Как и следовало ожидать, этот белок ответствен за регуляцию интенсивности реакций в тех метаболических путях, которые характерны для большинства (если не всех) митохондрий вообще.

Прежде чем перейти к биохимическим деталям, необходимо рассмотреть общую роль этой уникальной теплотворной ткани

и ее распространенность в животном мире. Бурая жировая ткань есть только у млекопитающих; ее нет у других эндотермных животных (птиц или теплокровных рыб). Млекопитающие тоже не все обладают ею. Обычно эта ткань имеется: 1) у животных, впадающих в зимнюю спячку (усиленная теплопродукция у них используется при пробуждении); 2) у новорожденных млекопитающих, у которых часто нет иных эффективных источников теплопродукции или достаточной теплоизоляции, и 3) у некоторых млекопитающих, адаптированных к холоду. Количество бурой жировой ткани в организме непостоянно; оно может изменяться в зависимости от этапа онтогенеза и степени холодовой адаптации. У многих млекопитающих эта ткань появляется лишь незадолго до рождения (Brooks et al., 1980); у некоторых животных (например, у крысы) при холодовой акклимации ее количество заметно возрастает и в ней усиливается функция механизмов, участвующих в выработке тепла и в ее регуляции.

Главное отличие бурой жировой ткани от других тканей, в которых тепло служит лишь побочным продуктом метаболических реакций, состоит в том, что энергия химических связей питательных веществ используется здесь только для теплопродукции. Иными словами, все 100% этой энергии могут «теряться» в виде тепла. В этом случае в митохондриях бурой жировой ткани энергия не сохраняется в какой-либо обычной биологически полезной форме (например, в форме АТФ или восстановительной силы). Механизм этого явления был раскрыт лишь в последние годы (Nicholls, 1976, 1979), а механизмы регуляции такого термогенеза еще во многом не ясны. В основе процессов теплопродукции здесь лежит (и это неудивительно) шунт в цепи синтеза АТФ в митохондриях. Изучение этого шунта и возможных механизмов его регуляции позволит нам разобраться не только в деятельности бурой жировой ткани, но и в основных принципах синтеза АТФ в митохондриях.

На рис. 11-2 представлен хемиосмотический механизм синтеза АТФ в обычных митохондриях (Mitchell, 1979) и показан путь утечки протонов в случае полностью термогенного функционирования бурой жировой ткани (по Nicholls, 1976). В обычных митохондриях, активно синтезирующих АТФ с помощью митохондриальной АТФ-синтетазы (F<sub>1</sub>-АТФазы), энергию для этого синтеза доставляет различие в активности протонов по обе стороны внутренней митохондриальной мембраны. Поток протонов по градиенту активности сопровождается отрицательным изменением свободной энергии, с которым сопряжен эндотермический синтез АТФ (Mitchell, 1979). Как видно из верхней части рис. 11-2, важную особенность этого хемиосмотического механизма составляет замкнутая цепь переноса протонов. :

В бурой жировой ткани эта цепь закорочена. Здесь во внутренней мембране митохондрий имеется шунт, по которому протоны могут идти в обход АТР-синтазы. Благодаря этому вся энергия, выделяющаяся при перемещении протонов между различными компартментами митохондрий, рассеивается в виде тепла. Таким образом, клеткам не нужны механизмы, обеспе-

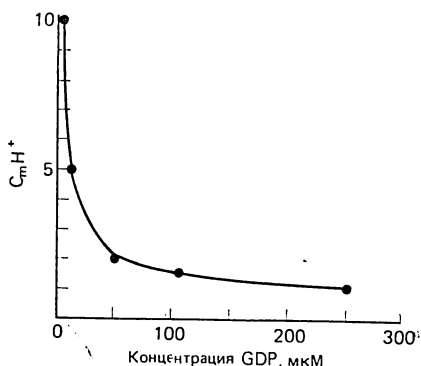
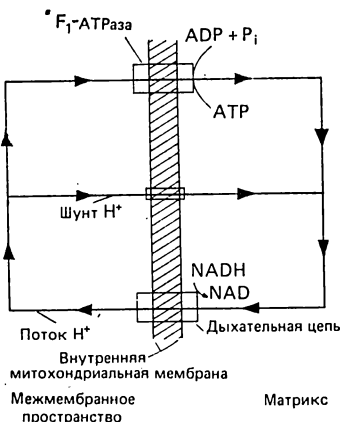


Рис. 11-2. Слева: пути переноса протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Показаны путь через  $F_1$ -АТРазу (с синтезом АТР) и «протонный шунт» в бурой жировой ткани. При окислении  $NADH$  в дыхательной цепи протоны перемещаются из внутренней среды (матрикса) митохондрий в межмембранное пространство. Обратный поток протонов в матрикс сопровождается отрицательным изменением энергии, и это может приводить либо к синтезу АТР при участии  $F_1$ -АТРазы, либо (при термогенезе в бурой жировой ткани) к рассеиванию энергии в виде тепла. Справа: влияние  $GDP$  на протонную проводимость ( $C_m H^+$ ) внутренней митохондриальной мембраны. (Nicholls, 1976.)

чивающие расщепление больших количеств АТР для поддержания высокой теплопродукции (как мы увидим позже, все остальные механизмы термогенеза связаны с гидролизом АТР). В бурой жировой ткани единственными продуктами распада питательных веществ (например, жиров) служат вода,  $CO_2$  и тепло.

Как и следовало ожидать, бурая жировая ткань отличается большей интенсивностью аэробных процессов, высоким содержанием триглицеридов и высокой активностью ферментов  $\beta$ -окисления, необходимых для расщепления этих богатых энергией веществ. Поэтому конечные продукты обмена здесь сравнительно нетоксичны, что и должно быть свойственно ткани, где чрезвычайно интенсивный метаболизм часто поддерживается несколько часов или суток.

С точки зрения регуляции бурая жировая ткань представляет для организма такую же опасность, как ядерный реактор для электростанции. В обоих случаях имеется огромная способность к выработке тепла, и при потере контроля над ней возможны серьезные последствия для всей системы в целом. Нерегулируемая активация бурой жировой ткани могла бы привести к перегреванию организма или, во всяком случае, к потере ценной энергии, если бы вырабатывалось больше тепла, чем это необходимо для эндотермной регуляции. Поэтому неудивительно, что обменные процессы здесь строго контролируются с помощью механизма, который, по-видимому, имеется только в митохондриях бурой жировой ткани. Единственный специфический белок, обнаруженный в этих митохондриях (мол. вес 32 000), локализован на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны и способен связывать пуриннуклеотиды (наиболее эффективно GDP, в меньшей степени ADP). Функция этого белка состоит в изменении протонной проводимости внутренней митохондриальной мембраны, особенно проводимости шунта, через который проходят протоны во время термогенеза. Связывание GDP с этим белком приводит к резкому снижению протонной проводимости (рис. 11-2, *справа*). Содержание этого регуляторного белка в ткани варьирует в зависимости от стадии развития и от холодовых воздействий (Brooks et al., 1980). При этом одновременно изменяется как способность ткани к термогенезу, так и регуляция этого процесса. Именно такими свойствами и должна обладать «хорошо сконструированная» метаболическая система.

Механизм, регулирующий активность бурой жировой ткани на системном и клеточном уровнях, до конца не ясен. Возможно, в основе этого механизма лежит сопряжение между внешними сигналами (например, изменением температуры среды) и проводимостью внутренней мембраны митохондрий. Это сопряжение могут обеспечивать а) гормональные сигналы (норадреналин уже через минуту после связывания бурой жировой тканью может вызывать значительное ускорение липолиза и потребления кислорода в этой ткани); б) модуляция ряда ферментов, в том числе липаз, протеинкиназ и ферментов обмена пуриннуклеотидов (Nicholls, 1976, 1979).

Итак, бурая жировая ткань среди термогенных систем уникальна в том отношении, что а) ее единственная функция состоит в выработке тепла и б) это единственная ткань, в которой вся энтаλπия ковалентных связей питательных веществ полностью превращается в тепло без промежуточного синтеза и расщепления АТФ. В других термогенных системах, которые будут рассмотрены ниже, обычно происходит синтез и распад

АТР, и для этого дополнительного механизма необходимы новые типы регуляции ферментов.

*Термогенез, связанный с дрожью.* Многим организмам бывает необходимо разогреться, прежде чем приступить к деятельности. Обычно это достигается путем расщепления АТР до АДФ с помощью ферментов, имеющихся в мышечных клетках; при этом ускоряется расщепление субстратов и возрастает теплопродукция. Наиболее обычный способ выработки тепла мышцами — дрожь. Во время дрожи под влиянием нервных импульсов усиливается деятельность АТРаза сократительной системы (актомиозина), однако это приводит не к координированной мышечной активности, а лишь к особым движениям малой амплитуды. Выработка тепла с помощью дрожи широко распространена у млекопитающих и встречается у некоторых насекомых, например у шмелей (Heinrich, 1974a, 1979), у которых часто наблюдается дрожь в покое. Это необходимо либо для того, чтобы температура летательных (грудных) мышц поддерживалась на уровне, необходимом для их активности (около 30°C), либо для согревания их до этой температуры, если мышцы были охлаждены.

*Термогенез без дрожи.* Выработка тепла в «холостых циклах». Термогенез без дрожи может обеспечиваться разными механизмами, действующими в разных тканях (в печени, мышцах, жировой ткани). Регуляция его может быть либо гормональной (например, путем воздействия тироксина на АТРазные ионные насосы), либо ионной (например, в случае «холостых циклов»). В холостых циклах, как следует из их названия, одновременно действуют ферменты, катализирующие противоположные реакции. Суммарный эффект таких циклов сводится к расщеплению АТР. Холостые циклы могут заключаться в одновременном синтезе и гидролизе триацилглицеролов, распаде и ресинтезе гликогена и глюкозы и одновременном действии фосфофруктокиназы (ФФК) и фруктозобисфосфатазы (ФБФазы). Последний механизм мы рассмотрим подробнее.

У шмелей (*Bombus*) летательные мышцы прогреваются перед полетом за счет одновременной работы ФФК и ФБФазы (рис. 11-3), приводящей в конечном итоге к гидролизу АТР. ФФК катализирует один из ключевых регуляторных этапов гликолиза, управляя тем самым скоростью расщепления гликогена (или глюкозы), в то время как ФБФаза участвует в процессе глюконеогенеза. В связи с противоположной ролью этих ферментов в метаболизме они, как правило, не содержатся оба в одной и той же клетке в больших количествах. Активность ФФК обычно выше всего в тканях с высокой способностью к гликолизу (например, в скелетных мышцах), а ФБФазы — в тканях, где идут процессы глюконеогенеза (в печени, в кор-

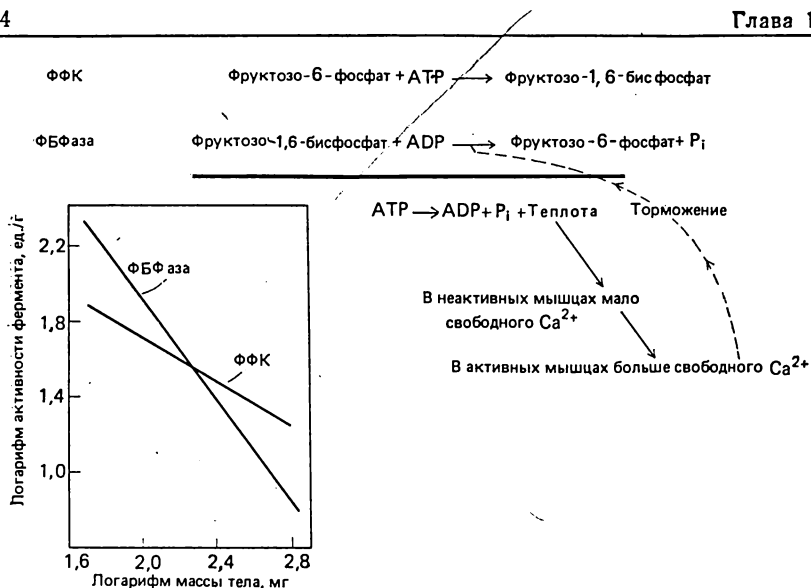


Рис. 11-3. Холостой цикл фосфофруктокиназы — фруктозобисфосфатазы в грудных (летательных) мышцах шмеля (*Bombus*). Одновременная активация этих ферментов во время разогрева мышц перед полетом приводит к гидролизу АТФ и выделению тепла. Этот процесс регулируется, по крайней мере частично, ионами Ca<sup>2+</sup>. Когда достигается температура, необходимая для полета (около 30 °C), начинаются сокращения мышц с одновременным высвобождением Ca<sup>2+</sup>. Ионы кальция оказывают сильное ингибирующее действие на фруктозобисфосфатазу, но не влияют на фосфофруктокиназу. Таким образом, эти ионы выключают холостой цикл, и поток вещества направляется по одностороннему гликолитическому пути. (Модель регуляции по Clark et al., 1973.) На графике показана зависимость активности двух ферментов в мышцах шмеля от размеров тела по данным Newsholme et al., 1972. Видно, что способность к холостым циклам у более мелких шмелей больше, так как отношение поверхности к объему тела у них менее благоприятно для сохранения тепла.

ковом веществе почек). В связи с этим данные Ньюсхолма и его сотрудников (Newsholme et al., 1972) о том, что в летательных мышцах шмеля чрезвычайно высок уровень ФБФазы, вначале казались парадоксальными. В этих мышцах ее активность была примерно в 30 раз выше, чем в любых других животных тканях, включая печень млекопитающих. ФБФаза летательных мышц в отличие от ФБФаз других тканей не ингибировалась АМР. Кроме того, между количеством этого фермента (а также ФФК) и массой тела шмеля наблюдалась обратная корреляция (рис. 11-3). Для вдумчивого физиолога такая зависимость послужила бы ключом к разгадке роли этих ферментов.

В модели, разработанной Ньюсхолмом с сотрудниками и в дальнейшем усовершенствованной (Clark et al., 1973), под-



черкивается потенциальное значение данного холостого цикла для выработки тепла и отмечаются возможные регуляторные механизмы. То, что уже говорилось о теплопродукции, связанной с катаболизмом, позволяет заключить, что расщепление АТР при одновременном функционировании ФФК и ФБФазы может служить мощным механизмом термогенеза. Этот механизм особенно хорошо действует в мышцах насекомых, так как благодаря эффективному газообмену через трахеи мышцы насекомых всегда работают в аэробных условиях. Как видно из табл. 11-3, аэробный метаболизм служит особо действенным способом превращения энтальпии химических связей в теплоту. К этой модели оставалось лишь добавить механизм, включающий холостой цикл при необходимости и полностью выключающий его во время полета. Это и было сделано в работе Кларка и др. (Clark et al., 1973), описанной ниже.

Исследования проводились на летательных мышцах шмеля *in vivo*. Авторы тщательно изучили возможные регуляторные эффекторы, способные включать или выключать функцию ФБФазы. Оказалось, что во время полета холостой цикл не действует и, следовательно, ФБФаза полностью выключена. Однако в покое, особенно при низкой температуре, оборот субстратов в цикле становился в два раза выше, чем чистый поток вещества в цепи гликолиза. Основным регуляторным сигналом для ФБФазы шмеля оказались свободные ионы кальция. Биологический смысл этого легко понять, если вспомнить, что ионы кальция высвобождаются из саркоплазматического ретикулума мышцы во время ее сокращения. Это позволяет выдвинуть следующую гипотезу о регуляции холостого цикла: в покое, когда температура мышц опускается ниже 30 °С, мышцы не сокращаются и концентрация свободного кальция в миоплазме падает; при этом может действовать холостой цикл, связанный с активностью ФБФазы и ФФК. Когда мышцы согреваются до минимальной температуры, необходимой для их работы, они начинают сокращаться, в миоплазму переходят свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и ФБФаза ингибируется. Гликолиз при этом становится односторонним, и синтезируется достаточно АТФ для осуществления полета. Такое представление о регуляции согласуется с полученными недавно данными о фруктозобисфосфатазе и ФФК шмеля. Оказалось, ФФК не тормозится ионами  $\text{Ca}^{2+}$  в физиологических концентрациях. Почти наверное будут открыты и другие регуляторные механизмы. Например, пока неясно, как регулируется соотношение между термогенезом за счет дрожи и за счет холостого цикла. Возможно, что холостой цикл подавляется ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , выбрасываемыми во время дрожи. Возникают и другие вопросы: каковы температурные характеристики взаимодействия между

ФБФазой и  $\text{Ca}^{2+}$ ? Связывает ли фермент ионы кальция более прочно при более высоких температурах, обеспечивая тем самым более жесткую регуляцию? Какими бы ни оказались неясные пока детали этого интересного механизма теплопродукции, очевидно, что холостой цикл, действующий в летательных мышцах шмеля благодаря высокому содержанию ФФК и ФБФазы, может служить важным способом термогенеза. Кроме того, у данного холостого цикла и бурой жировой ткани есть одна общая особенность, характерная для термогенных систем. Эта особенность состоит в том, что для повышения их эффективности очень важны две основные стратегии биохимической адаптации: 1) повышение содержания катаболических ферментов и 2) добавление к уже существующим метаболическим системам тонких регуляторных механизмов (в бурой жировой ткани — это функция пуринсвязывающего белка с мол. массой 32 000, а в летательных мышцах шмеля — чувствительность ФБФазы к  $\text{Ca}^{2+}$ ). Регуляция термогенеза, связанного с дрожью, носит обычно системный характер: в ней участвует нервная модуляция расщепления АТФ, причем важным посредником здесь тоже служат ионы  $\text{Ca}^{2+}$ .

И наконец, тот факт, что у более мелких шмелей содержание ФФК и ФБФазы в летательных мышцах выше, можно связать с тем, что у мелких шмелей потери тепла больше, чем у крупных. Для того чтобы компенсировать эти потери, у мелких шмелей увеличено содержание обоих ферментов, участвующих в холостом термогенном цикле.

*Регуляция теплоотдачи у эндотермных животных: адаптивные особенности кровообращения и теплоизоляции.* Для того чтобы эндотермия была эффективной, необходима не только достаточная выработка тепла, но и способность регулировать теплообмен между организмом и окружающей средой. Хотя регуляция теплоотдачи, строго говоря, относится к области анатомии и физиологии, а не биохимической адаптации, мы коротко рассмотрим несколько примеров такой регуляции, на которых хорошо видно адаптивное взаимодействие анатомического, физиологического, биохимического и поведенческого уровней организации у эндотермных животных. Благодаря биохимическим реакциям создается основная предпосылка для эндотермии — вырабатывается тепло. Системам более высоких уровней остается лишь обеспечить его надлежащее использование.

*Теплоизоляция.* У большинства эндотермных животных — птиц, млекопитающих и некоторых насекомых — сохранению метаболического тепла способствует наружный теплоизолирующий покров. У птиц и млекопитающих имеются образования из кератина — волосы и перья. У морских млекопитающих во время пребывания в воде теплоизоляцию не могут обеспечивать

воздушные пространства между волосками, но у них есть хорошо развитый подкожный слой жира (ворвани). У насекомых тоже иногда имеется поверхностный теплоизолирующий покров. В качестве примера можно привести эндотермного бражника *Manduca sexta* (Heinrich, 1971), у которого тело покрыто чешуйками. Однако сама по себе теплоизоляция — это в основном пассивное приспособление для сохранения тепла, хотя у млекопитающих есть эффективный механизм, позволяющий изменять теплоизолирующие свойства волосаного покрова — пилоэрекция. Главным же способом управления теплообменом между организмом и средой у млекопитающих и многих других эндотермных животных служит регуляция кровообращения.

*Роль кровеносной системы в регуляции теплоотдачи.* У большинства эндотермных животных постоянство температуры тела в значительной мере зависит от регулируемой отдачи тепла при участии крови (у насекомых — гемолимфы). Регуляция такой теплоотдачи у разных животных имеет несколько общих особенностей. Во-первых, в некоторых участках тела (таких, как брюшко эндотермных насекомых типа *Manduca sexta* и шмелей, плавники тюленей и живот у собак, где волос сравнительно мало) теплоизолирующий слой выражен очень слабо. Такого рода «голые» участки служат для организма эффективной теплоизлучающей поверхностью. Во-вторых, регуляция кровотока во многих таких участках точно регулируется. Например, у эндотермных насекомых передача тепла от груди (где благодаря активности летательных мышц как в покое, так и во время полета вырабатывается много тепла) к брюшку, где теплопродукция значительно меньше, регулируется путем изменений циркуляции гемолимфы. Если температура среды невысока, большая часть вырабатываемого в груди тепла не переходит в брюшко. Если же насекомое активно летает в теплой среде, тепло отводится к брюшку путем усиления тока гемолимфы. Такая способность регулировать теплообмен между грудью и брюшком особенно хорошо видна на примере шмелей во время выведения потомства (Heinrich, 1974b). Матка в этот период поддерживает температуру яиц, личинок и куколок в поразительно узких пределах, несмотря на большие колебания внешней температуры. Это связано с тем, что брюшко матки, играющее в обогреве расплода главную роль, получает значительное количество тепла от груди. У шмеля *Bombus vosnesenskii* температура грудного и брюшного отделов поддерживается в пределах 35—38°C при колебаниях температуры окружающей среды между 3 и 33°C (Heinrich, 1974b). Такое же постоянство температуры летательных мышц (но не брюшка) наблюдается во время полета у эндотермных насекомых. Бражник *Manduca sexta* способен поддерживать темпера-

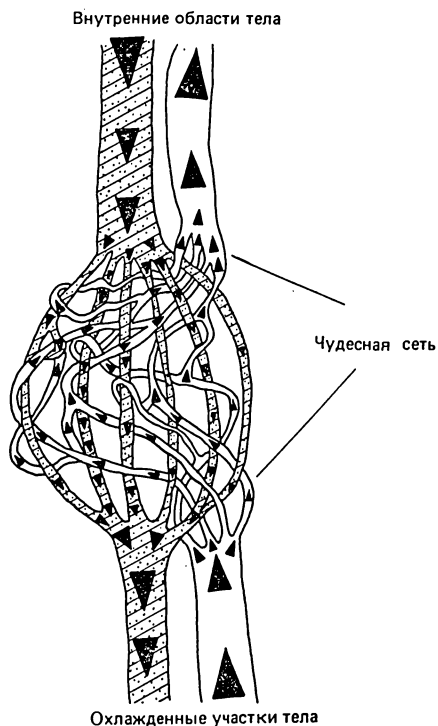


Рис. 11-4. Взаимоотношения кровеносных сосудов в противоточном теплообменнике. Нагретая кровь (например, от глубинных тканей) обменивается теплом с охлажденной кровью (например, от жабр у тунца, от периферических участков плавников у тюленя или от лап у морских птиц) в области плотной сети капилляров, называемой чудесной сетью (*rete mirabile*).

ны ли они в плавниках тюленя, лапе птицы или локомоторной мускулатуре тунца (это лишь три примера использования теплообменников). В противоточных теплообменниках нагретая кровь тесно контактирует с охлажденной кровью в так называемой *чудесной сети* (*rete mirabile*, рис. 11-4). Теплообменники, расположенные в ногах ржанки или плавниках тюленя, способствуют тому, чтобы тело сохраняло больше тепла, образующегося при обменных процессах. На пути к периферическим придаткам (к оголенным частям ног у птиц или к кончикам плавников, лишенным теплоизоляции, у тюленей) кровь в таких теплообменниках ох-

туру груди на уровне 32—33°C при колебаниях окружающей температуры в пределах от 9 до 24°C (Heinrich, 1974, а).

У млекопитающих действуют сходные механизмы регуляции теплоотдачи путем изменения кровотока и расширения капилляров; во многих случаях эти механизмы дополняются выделением и испарением пота.

*Теплоотдача через кровеносную систему: противоточные теплообменники.* Теплообмен между внутренними и периферическими областями тела часто бывает двусторонним. Мы рассмотрели механизмы, ответственные за рассеяние тепла, когда температура тела угрожает чрезмерно повыситься. Во многих других случаях (особенно у водных или земноводных животных) действуют сложные механизмы, направленные на ограничение теплоотдачи. С этой точки зрения чрезвычайно важны так называемые противоточные теплообменники (рис. 11-4).

Принцип устройства таких теплообменников одинаков независимо от того, расположе-

лаждается. У тунцов кровь, выбрасываемая сердцем, охлаждается в жабрах до температуры окружающей среды (температурное равновесие в жабрах устанавливается быстрее, чем газовое), а затем эта артериальная кровь снова нагревается при контакте с венозной кровью, оттекающей от локомоторной мускулатуры. Благодаря сочетанию высокой интенсивности мышечного метаболизма с эффективным сохранением тепла в противоточных теплообменных системах температура глубинных мышц тунца может превышать окружающую температуру на 10—15°C. У некоторых видов тунцов теплообменники были найдены также в головном мозге и кишечнике (см., например, Stevens, Fry, 1971; обзор: Carey et al., 1971). Остается неясным, насколько эффективно эти эндотермные костистые рыбы могут регулировать температуру тела (т. е. в какой мере их можно считать гомойотермными). В исследованиях на самых крупных тунцах — голубых (*Thunnus thynnus*) — были получены данные, определенно позволяющие предполагать гомойотермию, а у более мелких видов (например, у *Thunnus albacares*) тоже была обнаружена по меньшей мере некоторая способность к эндотермному поддержанию температуры тела (Dizon, Brill, 1979; Graham, Dickson, 1982).

*Происхождение эндотермной гомойотермии.* Какие животные впервые приобрели это свойство? Возникла ли эндотермия, какой мы ее знаем у современных видов, в прямой связи с преимуществами высокой или постоянной температуры тела? Или же она появилась как «побочный продукт» более фундаментальных адаптаций? Были ли динозавры «теплокровными»? Эти вопросы вызывали в последние годы повышенный интерес, так как и биологи, и небиологи любят иногда рассуждать о важнейших проблемах эволюции; к тому же речь в данном случае идет о необычных животных. Мы не будем отвечать на эти вопросы, так как нам здесь не на что опереться ни в эмпирическом, ни в логическом плане. В то же время полезно обсудить некоторые стороны этих вопросов, так как это поможет нам сформировать такие представления, которые будут полезны для понимания проблем и возможностей эктотермии.

Рассмотрим сначала, что необходимо для того, чтобы древнее эктотермное животное могло превратиться в эндотермное. Возможно, главной эволюционной «добавкой» к биохимическим системам эктотермных животных должна быть способность к *более интенсивному* аэробному катаболизму. Поскольку при аэробном распаде может выделяться очень большое количество тепла (см. Prusiner, Poe, 1968, а также табл. 11-3), любое значительное повышение потенциала аэробного метаболизма могло бы стать главной предпосылкой для возникновения эндотермии. Означает ли это, что появление в процессе эволюции

животных с повышенной способностью к аэробному катаболизму было связано с преимуществами эндотермии? Беннетт и Рубен (Bennett, Ruben, 1979) придерживаются иного мнения. Согласно их точке зрения, основанной на данных об энергетической «стоимости» поддержания позы и передвижения у эктотермных и эндотермных животных, преимущества высокого аэробного потенциала у млекопитающих и птиц связаны с увеличением способности к длительному передвижению за счет аэробного источника энергии. Для низших позвоночных очень важны процессы анаэробного гликолиза, так как это позволяет им совершать очень быстрые короткие передвижения, чтобы поймать жертву или скрыться от хищника. Напротив, у млекопитающих и птиц локомоция обеспечивается главным образом аэробными процессами (хотя эти животные, разумеется, должны быть способны и к интенсивному анаэробному гликолизу). Из этого Беннетт и Рубен заключают, что необходимость аэробного обеспечения локомоции была главным фактором, который в процессе эволюции привел к увеличению потребления  $O_2$  эндотермными животными примерно в 10 раз по сравнению с эктотермными. Интересно, что плотность расположения митохондрий у млекопитающих на порядок выше, чем у пресмыкающихся (Bennett, 1972). Развитие высокой способности к аэробному метаболизму у предков современных эндотермных птиц и млекопитающих (по всей вероятности, у каждой из этих современных групп был свой эктотермный предок) позволило в дальнейшем использовать аппарат аэробного метаболизма для эндотермии.

Хотя гипотеза Беннетта и Рубена вполне логична и согласуется с большинством имеющихся данных об эволюционной истории и современных особенностях эктотермных и эндотермных животных, она все же не позволяет ответить на некоторые дополнительные вопросы. Например, даже если высокий аэробный потенциал создал у эктотермного животного предпосылки для эндотермии, то какие факторы отбора будут благоприятствовать ее развитию? Далее, какие селективные факторы будут способствовать тому, что у большинства эндотермных птиц и млекопитающих температура тела окажется почти одинаковой — около 37—39 °C? Ответы на эти вопросы будут в значительной степени умозрительными. На основании всего сказанного мы могли бы представить себе некоторые из причин, способствовавших развитию эндотермии. Так, способность к активному ночному образу жизни могла бы привести к выработке механизмов, позволяющих сохранять ночью такую же температуру тела, как и днем. Дрожь — реакция, известная как у млекопитающих, так и у эндотермных беспозвоночных, могла бы быть ранним и очень простым шагом по направлению к

эндотермии, так как эта реакция связана с нервным контролем вездесущих мышечных АТФаз. Можно представить себе и более длительно действующие факторы, способствующие развитию эндотермии. Заселение более холодных мест или глобальное похолодание могло бы привести к выработке механизмов, направленных на сохранение такой температуры тела, к которой уже приспособился биохимический аппарат будущих эндотермных животных. Так как речь здесь идет о генетических адаптациях, возникают два важных соображения. Во-первых, сохранение температуры тела у большинства птиц и млекопитающих (а также у некоторых эндотермных насекомых во время активности) на уровне примерно 37—39°C может быть отражением типичной температуры тела у каких-то древних *эктотермных* животных. Когда произошло всемирное похолодание, у этих животных возникла потребность сохранить в организме ту температуру, к которой были приспособлены биохимические системы (ферменты, мембраны и др.), т. е. 37—39°C. Второй момент касается того, что мы понимаем под «оптимумом», когда говорим о влиянии температуры на биохимические процессы, на строение и функции макромолекул. Для того чтобы разобраться в этом важнейшем вопросе, необходимо подробно исследовать влияние температуры на макромолекулы, а также те механизмы, благодаря которым оптимальные структурные и функциональные особенности этих макромолекул соответствуют строго определенному диапазону температур.

### Эктотермия

*Общие соображения.* У эктотермных животных нет физиологических или биохимических механизмов, поддерживающих постоянно температуры тела, и поэтому она изменяется у них в довольно близком соответствии с температурой окружающей среды. Однако многим из таких животных свойственны выраженные терморегуляторные поведенческие реакции: чтобы удерживать температуру тела в оптимальном диапазоне, они находят подходящую микросреду. Поведенческая регуляция температуры тела обычно играет важную роль при кратковременных (например, суточных) колебаниях температуры среды. Что же касается сезонных колебаний, а тем более изменений, обусловленных долговременными климатическими колебаниями и заселением новых мест, то здесь одной лишь поведенческой регуляции мало. Такие изменения температуры слишком длительны для того, чтобы животные могли приспособиться к ним путем адаптации биохимических систем, например ферментов и мембран. К подобным адаптивным изменениям относятся: а) фенотипическая регуляция экспрессии генов, т. е. изменения

количеств и состава клеточных белков; б) генетические изменения, происходящие на протяжении многих поколений и приводящие к созданию новых вариантов макромолекул, приспособленных к новому тепловому режиму. В дальнейшем мы будем рассматривать как фенотипические изменения (при акклимации и акклиматизации), так и генетические, связанные с длительными процессами эволюции видов. При этом перед нами будет стоять ряд важных вопросов. Какие особенности биохимических систем играют роль в установлении *температурных оптимумов* и *температурной толерантности* организмов? Какие биохимические адаптации имеют в этом смысле наибольшее значение — как организмы поддерживают те показатели, постоянство которых наиболее важно? В какой степени адаптация к температуре обеспечивается макромолекулами (например, ферментами) и какую роль здесь играют так называемые «микромолекулы»? И наконец, насколько сходны между собой процессы акклиматизации (акклимации) и эволюционной (генетической) адаптации? Иными словами, можно ли сравнить фенотипические приспособительные изменения, происходящие в течение жизни эктотермного животного, с теми, которые возникают у различных видов в связи с изменениями в их генетической информации? Для того чтобы подойти к решению всех этих вопросов, нам удобнее будет выделить в биохимическом аппарате клеток отдельные компоненты (в частности, белки и системы, образованные в основном липидами, т. е. мембраны) и сначала рассмотреть каждый из них в отдельности. Такой анализ покажет нам, что, хотя для каждого компонента характерны свои специфические реакции на температуру, разным биохимическим системам свойственны некоторые общие особенности температурных нарушений и способов адаптации.

### Адаптивные изменения белков

*Компенсация влияния температуры на катализ.* Рассматривая влияние температуры на эктотермные организмы, обычно прежде всего ставят вопрос: каким образом животным с весьма различной температурой тела удастся поддерживать сравнимую интенсивность метаболизма (рис. 11-5)? Такая компенсация температурных влияний на метаболизм наблюдается как при акклимации (или акклиматизации), так и в процессе эволюционных изменений (рис. 11-5). Уместно задаться вопросом: связана ли адаптация метаболических процессов с фундаментальными различиями в ферментных системах эктотермных животных, приспособленных к теплу или к холоду, и если да, сходны ли между собой механизмы, действующие при сезонной



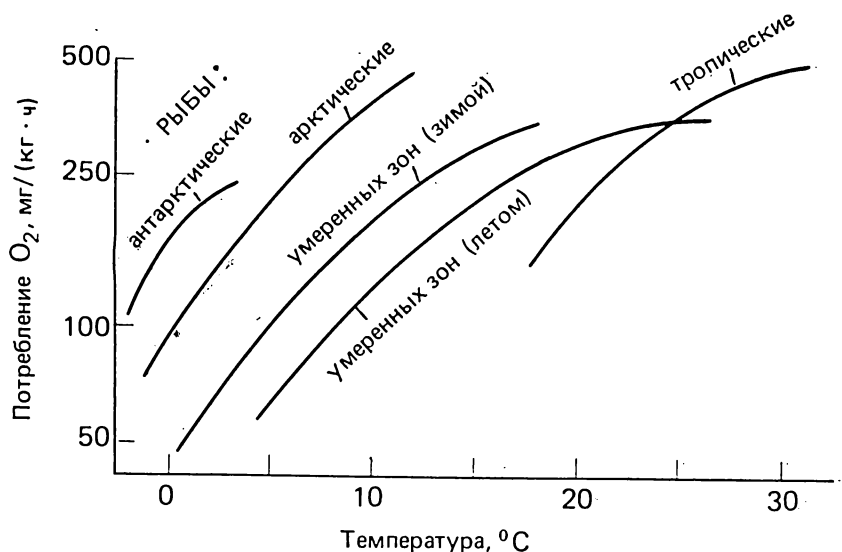


Рис. 11-5. Компенсация влияния температуры на потребление кислорода у рыб при различной температурной адаптации. Видно, что в подходящем физиологическом диапазоне температур интенсивность метаболизма у животных, адаптированных или акклиматизированных к разным температурам, остается постоянной. Для подобных сравнений необходимо строго учитывать образ жизни исследуемых животных: их локомоторная активность и способность к плаванию должны быть сходными. (По Brett, Groves, 1979, с изменениями.)

адаптации и при эволюционных изменениях? Возможны, по-видимому, два способа компенсации температурных влияний: 1) изменение содержания ферментов в клетках и 2) изменение каталитической эффективности<sup>1</sup> ферментов. Сначала мы рас-

<sup>1</sup> Существует несколько определений «каталитической эффективности». Однако во всех случаях это мера скорости, с которой фермент может превращать субстрат в продукт (в расчете на одну молекулу фермента). Одним из показателей каталитической эффективности служит число оборота субстрата, которое часто выражают в молях субстрата, превращенных в продукт на 1 моль фермента за единицу времени (обычно за 1 мин). Другой показатель — «каталитическая константа» ( $k_{cat}$ ), отражающая оборот субстрата на один активный центр фермента. Оба этих показателя отражают активность фермента при максимально возможной скорости реакции ( $V_{max}$ ). Существует и еще один показатель каталитической способности фермента — отношение  $k_{cat}$  к  $K_m$ . Эта константа скорости первого порядка позволяет более реально оценить каталитическую активность при концентрациях субстрата, встречающихся *in vivo*, которые обычно ниже уровня насыщения. В то же время для того, чтобы оценить каталитическую эффективность как свойство самого фермента при оптимальных условиях ( $V_{max}$ ), удобнее первые две величины, так как их можно непосредственно вывести из свободной энергии активации (которая служит прямым термодинамическим показателем того, насколько эффективно фермент снижает энергетический барьер реакции).

смотрим этот второй механизм, так как он более универсален и имеет большее значение для эволюционной адаптации к температуре.

Перед тем как приступить к анализу каталитической эффективности ферментов, полезно рассмотреть так называемую «первичную компенсацию». В биологическом диапазоне температур — примерно от  $-1,9^{\circ}\text{C}$  (точка замерзания морской воды) до  $100^{\circ}\text{C}$  (точка кипения воды, при которой еще могут выживать термофильные прокариоты) — реакции, связанные с образованием или разрывом *ковалентных* химических связей, протекают крайне медленно по сравнению с ферментативными превращениями в организме. «Первичная компенсация», благодаря которой их скорости стали такими высокими, как в живых организмах, была достигнута в результате возникновения и развития белкового катализа. Обычно ферменты способны увеличивать скорость химических реакций *на 6—10 порядков*, что свидетельствует об их чрезвычайно высоких каталитических способностях. Рассмотрим вкратце, каким образом достигается такая эффективность: это поможет нам понять некоторые из ключевых особенностей ферментативного катализа и представить себе, как могла бы идти дальнейшая эволюционная адаптация к различным температурам.

При обсуждении энтальпии активации мы уже фактически подошли к вопросу о том, почему в биологическом диапазоне температур химические реакции протекают столь медленно. Мы отмечали, что лишь у малой доли молекул кинетическая энергия равна или больше пороговой энергии активации (энтальпии активации), а если энергия молекул ниже, они не могут вступить в реакцию. Теперь мы подробнее рассмотрим энергию активации, ее компоненты и влияние на скорость каталитических реакций. На рис. 11-6 схематически показаны различия в энергии активации для химического превращения  $S \rightarrow P$  в трех случаях: 1) без катализатора, 2) при наличии неэффективного фермента и 3) в присутствии высокоэффективного фермента. По вертикальной оси отложена свободная энергия активации ( $\Delta G^*$ ), равная  $\Delta H^* - \Delta S^*$ . Видно, что изменения свободной энергии активации зависят как от энтальпии, так и от энтропии (точно так же, как и изменения свободной энергии при установлении химического равновесия). Вклад  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  в  $\Delta G^*$  различен для разных химических реакций и, что особенно интересно, для одних и тех же реакций, катализируемых несколькими различающимися ферментами (этот последний факт дает некоторые указания относительно природы механизмов, определяющих каталитическую эффективность гомологичных ферментов). Однако наибольшее значение всегда имеют изменения  $\Delta G^*$ , так как скорость реакции находится в экспо-

ненциальной зависимости от этих изменений:

$$\text{Скорость реакции} = \frac{kKT}{h} e^{-\Delta G^*/RT},$$

где  $k$  — переходный коэффициент (обычно принимаемый равным 1),  $K$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $h$  — постоянная Планка и  $R$  — универсальная газовая постоянная.

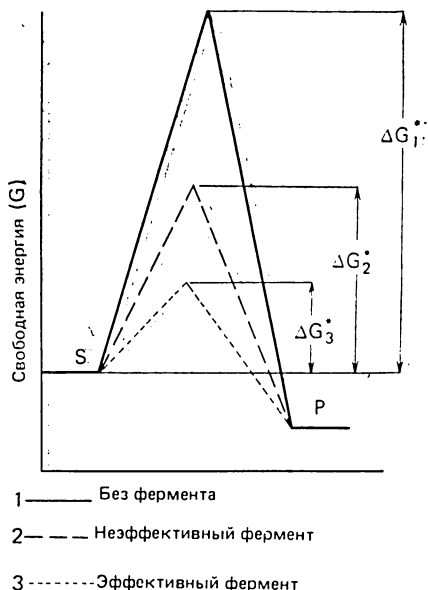


Рис. 11-6. Изменения энергии при одной и той же химической реакции (превращение S в P), протекающей тремя различными путями. Сплошная кривая (1) — без катализа; прерывистая линия (2) — при участии малоэффективного фермента; пунктир (3) — при участии высокоэффективного фермента. Вертикальные отрезки справа соответствуют свободной энергии активации  $\Delta G^*$  в этих трех случаях.

При обсуждении межвидовых различий  $\Delta G^*$  для одной и той же ферментативной реакции нас будут интересовать три вопроса. Во-первых, каковы различия в изменении свободной энергии активации для одной и той же реакции у разных видов? Направлены ли эти различия на компенсацию эффектов температуры, так что у животных, адаптированных к холоду, гомологичные ферменты более эффективны? Во-вторых, какие механизмы могут способствовать изменению  $\Delta G^*$  для осуществления такой компенсации? В-третьих, чем приходится «платить» за высокую эффективность ферментов, или, иными словами, почему все ферменты не обладают максимальной каталитической эффективностью? При попытке ответить на последний вопрос мы убедимся, что между различными функциональными и структурными особенностями ферментов существует тесная взаимосвязь, и оптимизация одного свойства

Таблица 11-4. Параметры активации реакций, катализируемых гомологичными ферментами животных с различной температурной адаптацией (указанной в скобках)

	$\Delta H^*$ , ккал/моль	$\Delta S^*$ , ед. эн- тропии (кал моль <sup>-1</sup> град <sup>-1</sup> )	$\Delta G^*$ , ккал/моль	Скорость реакции <sup>1)</sup>
<b>Лактатдегидрогеназа<sup>2)</sup></b>				
<i>Pagothenia borchgre- vinki</i> (рыба) (-1,9 °C)	10,467	-12,7	14,000	1,00
<i>Sebastolobus alascanus</i> (рыба) (4-12 °C)	10,515	-12,6	14,009	0,98
<i>Thunnus thynnus</i> (ры- ба) (15-30 °C)	11,384	-10,0	14,152	0,76
Кролик (37 °C)	12,550	-6,4	14,342	0,54
<b>Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-зависимая миофибриллярная АТРаза<sup>3)</sup></b>				
<i>Champsocephalus gun- nari</i> (рыба) (от -1 до +2 °C)	7,400	-31,0	15,870	1,00
<i>Nothothenia neglecta</i> (рыба) (0-2 °C)	11,300	-17,8	16,130	0,62
<i>Cottus bubalis</i> (рыба) (3-12 °C)	13,550	-9,9	16,290	0,45
<i>Dascyllus carneus</i> (ры- ба) (18-26 °C)	23,350	+25,1	17,540	0,05
<i>Pomatocentrus unioce- latus</i> (рыба) (18- 26 °C)	26,500	+32,5	17,620	0,04
<i>Carassius auratus</i> (зо- лотая рыбка)				
при акклимации к 2°C	11,804			
при акклимации к 31 °C	20,454			
<b>Глутаматдегидрогеназа<sup>4)</sup></b>				
<i>Urticinopsis antarcticus</i> (актиния) (-1,9 °C)	13,990			
<i>Metridium senile</i> (ак- тиния)				
северные популяции (8-13 °C)	14,661			
южные популяции (12-18 °C)	16,361			
<i>Anthopleura elegantis- sima</i> (актиния) (15- 35 °C)	19,479			
<b>D-Глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа<sup>5)</sup></b>				
Кролик	18,450	11,4	15,300	
Омар	13,950	-2,2	14,550	
Треска	13,900	-2,6	14,700	

Продолжение

	$\Delta H^*$ , ккал/моль	$\Delta S^*$ , ед. эн- тропии (кал моль <sup>-1</sup> град <sup>-1</sup> )	$\Delta G^*$ , ккал/моль	Скорость реакции <sup>1)</sup>
Мышечная гликогенфос- форилаза <i>b</i> <sup>6)</sup>				
Кролик	20,650	17,2	15,950	
Омар	15,350	1,1	15,050	

<sup>1)</sup> В относительных единицах; за 1 принимается скорость для наиболее эффективного фермента.

<sup>2)</sup> По данным Somero, Siebenaller (1979), пересчитанным для 5 °С.

<sup>3)</sup> По данным Johnston, Walesby (1977), полученным при 0 °С; а также Johnston (1979) (для золотой рыбки).

<sup>4)</sup> По данным Walsh (1981), пересчитанным для 0 °С.

<sup>5)</sup> Вычислено по данным Cowey (1967).

<sup>6)</sup> Вычислено по данным Assaf, Graves (1969).

может препятствовать поддержанию на должном уровне другого свойства. Здесь, как и в случае анатомических пропорций, ни один признак не может эволюционировать независимо от других; напротив, адаптация должна идти с учетом взаимодействия большинства (если не всех) элементов данной системы.

**Каталитическая эффективность ферментов и адаптация к температуре.** Каковы различия в способности разных гомологов одного и того же фермента снижать энергетический барьер для той или иной реакции? В табл. 11-4 приведены соответствующие данные для нескольких ферментов у животных с весьма различной температурой внутриклеточной среды. Как видно из таблицы, общая тенденция заключается в том, что у животных, адаптированных к холоду, каталитическая эффективность гомологичных ферментов выше, чем у животных, приспособленных к теплу. Такая тенденция отмечается не только при общем сравнении эктотермных животных с эндотермными, но и при сравнении ферментов эктотермных животных с разной температурой тела. Таким образом, главный фактор, от которого зависит каталитическая эффективность ферментов, — это, по-видимому, не место животного в филогенетической системе, а температура его организма. Например, эффективность  $M_4$ -лактатдегидрогеназы у теплокровной рыбы голубого тунца (*Thunnus thynnus*), температура мышц которого может достигать примерно 30 °С, сравнительно мала по сравнению с эффективностью этого фермента у антарктической костистой рыбы *Pagothenia borchgrevinki* (у которой она наиболее высока). Такие же большие различия в каталитической эффективности были обнаружены и при изучении актомиозиновых АТФаз эктотермных животных (табл. 11-4).

Эти данные однозначно свидетельствуют о том, что за длительные периоды, достаточные для перестройки аминокислотных последовательностей белков, самые различные ферменты претерпевают адаптивные изменения, направленные на компенсацию температурных эффектов сдвигами каталитической эффективности. Исключений из этого общего правила не было обнаружено. Отсюда можно сделать вывод, что свободная энергия активации для той или иной метаболической реакции не есть постоянная величина — она может изменяться в соответствии с температурными условиями обитания животных. Такой вывод приводит, однако, к определенным трудностям, так как возникает вопрос: почему ферменты у животных, приспособленных к теплым местообитаниям, менее эффективны, чем они могли бы быть?

*Конформационные основы различий в эффективности ферментов.* Для того чтобы подойти к выяснению поставленного выше вопроса, нужно рассмотреть, каким образом величина  $\Delta G^*$  могла бы изменяться с целью компенсации влияний температуры. Некоторые пути такой адаптации, по-видимому, исключены. Например, субстраты и кофакторы у всех животных одинаковы, поэтому изменяться должна структура самого фермента. Активные участки ферментов, взаимодействующие с субстратами и кофакторами, обычно одинаковы у гомологичных ферментов разных видов. Отсюда можно заключить, что химизм реакции (т. е. взаимодействия между ферментом и лигандами, типы образующихся или распадающихся ковалентных связей, природа доноров или акцепторов протонов) в гомологичных ферментативных реакциях разных животных, по-видимому, одинаков. Что *может быть различным*, так это изменения конформации ферментов, происходящие в процессе катализа. Поэтому для того, чтобы понять различия в  $\Delta G^*$  между гомологичными ферментами, нам необходимо рассмотреть, как изменения энергии, связанные с изменением конформации белков, могут способствовать повышению или понижению энергетического барьера для катализируемой реакции.

В ранних теоретических работах, посвященных ферментативному катализу, ферменты и их субстраты рассматривались как «замки» и «ключи». При этом считалось, что фермент — это жесткая структура, в которой содержится особый участок («скважина»), а субстрат соответствует этому участку наподобие ключа. Сегодня такое сравнение представляется не совсем верным. Геометрическое соответствие между участком связывания и лигандом (с учетом их зарядов и полярности) иногда не существует заранее, а появляется лишь в момент присоединения лиганда к ферменту. Кошленд (Koshland, 1973) удачно назвал такое явление индуцированным соответствием.

Лиганд и фермент правильнее было бы сравнить с рукой и перчаткой: свою окончательную форму «перчатка» (фермент) принимает лишь после того, как она будет надета на «руку» (лиганд). Таким образом, обязательным условием многих (а может быть, и всех) реакций связывания лиганда является гибкость структуры фермента. Более того, в ходе самих каталитических реакций, следующих за связыванием (например, во время образования активированного комплекса), тоже могут происходить конформационные изменения (Fersht, 1977). А поскольку эти изменения сопровождаются разрывом или образованием слабых химических связей, они происходят с затратой или высвобождением энергии. Именно эти энергетические сдвиги, связанные с изменениями конформации, возможно, и приводят к упомянутым различиям в  $\Delta G^*$ . Поэтому нам нужно будет рассмотреть «энергетическую стоимость» различных конформационных изменений ферментов у разных видов животных.

Для объяснения энергетических затрат на конформационные изменения ферментов при катализе у животных, адаптированных к разным температурам, были предложены две тесно связанные друг с другом модели. Первая модель носит более общий характер, в ней подчеркивается значение общей стабильности белков для температурной адаптации. Предположим, что для приспособления к более высоким температурам необходимо повышение структурной стабильности белка (это предположение будет подробнее обсуждаться несколько позже). Такое повышение стабильности могло бы быть достигнуто путем образования дополнительных ковалентных связей, прежде всего дисульфидных ( $-SS-$ ). Однако при сравнении белков различных организмов, включая термофильных бактерий (они живут при температурах, близких к точке кипения воды), не было получено данных в пользу широкого распространения такого способа стабилизации. Вспомним, что молекулы белков должны быть гибкими, а добавочные ковалентные связи могли бы препятствовать той гибкости, которую допускают слабые (нековалентные) связи. Другая стратегия стабилизации может быть связана с изменением числа (или типа) слабых взаимодействий. К чему могло бы привести образование одной или нескольких дополнительных слабых связей в структуре белка, который должен функционировать при повышенной температуре? Одним из возможных последствий может быть повышение термостабильности и снижение каталитической эффективности (увеличение  $\Delta G^*$ ). Если во время активации конформация фермента должна измениться таким образом, чтобы стал возможен катализ, и для этого необходимо разрушить добавочную слабую связь, то энергетический барьер реакции повысится. В соответствии с такой моделью чем жестче структура фермента, тем

вероятнее, что  $\Delta G^*$  в катализируемой им реакции будет выше. Как мы увидим, между температурой тела и термостабильностью белков действительно существует тесная корреляция, а  $\Delta G^*$  изменяется в прямой зависимости от температуры. Согласно изложенной здесь гипотезе, между двумя этими зависимостями существует причинная связь.

Еще одна группа фактов, свидетельствующих в пользу тесной зависимости между каталитической эффективностью и числом образующихся или распадающихся при катализе слабых связей, касается совместных изменений энтальпии и энтропии активации, обнаруженных при сравнении гомологичных ферментов разных животных (табл. 11-4, рис. 11-7). Во всех группах ферментов, в которых производилось сравнение, между энтальпией и энтропией активации была обнаружена тесная корреляция. Она особенно хорошо видна, если представить ее в виде «графиков компенсации» (рис. 11-7). Название этих графиков связано с тем, что из них видно, как одновременное увеличение  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  оказывает компенсирующий эффект с точки зрения изменений  $\Delta G^*$  ( $\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$ ). Наклон кривой компенсации выражают в градусах Кельвина и называют «температурой компенсации». При измерении температур компенсации (см., например, рис. 11-7) было обнаружено, что они лежат в том узком диапазоне, в котором обычно происходит образование и распад слабых связей в водных растворах (Lumry, Biltonin, 1969)<sup>1</sup>. Поэтому компенсация, обнаруженная при сравнении гомологичных ферментов, служит еще одним подтверждением того, что эти ферменты различаются числом слабых связей, образующихся или разрушающихся во время катализа (Low, Somero, 1974). Разумеется, термодинамические данные еще не позволяют судить о деталях механизма. Различия в энергии активации могут быть, например, связаны с разным числом связей, разрывающихся или образующихся на этапе активации. Высокая энергия активации может быть обусловлена либо сравнительно большой затратой энергии на разрыв связей, либо малым высвобождением энергии при их образовании. Имеются данные в пользу обоих механизмов измене-

---

<sup>1</sup> Ламри и его сотрудники (Lumry, Biltonin, 1969) полагают, что температура клеток у птиц и млекопитающих имеет особое значение. Дело в том, что при температурах около 37°C изменения энтальпии и энтропии почти полностью компенсируют друг друга в своем влиянии на свободную энергию реакций, связанных с образованием или распадом слабых связей в водных растворах. По мнению этих ученых, температура тела у птиц и млекопитающих установилась в процессе эволюции не «случайно» (например, не просто в соответствии с той температурой среды, при которой возникли первые эндотермные позвоночные): отбор закрепил ее именно на таком уровне, при котором образование и распад слабых связей может происходить с минимальным изменением свободной энергии.



ния энергии активации (см. Greaney, Somero, 1979), однако важную роль в энергетике активации должна играть необходимость удерживать лиганды в местах их связывания. Этот процесс может требовать больших энергозатрат и существенно влиять на изменение энергии в ходе катализа.

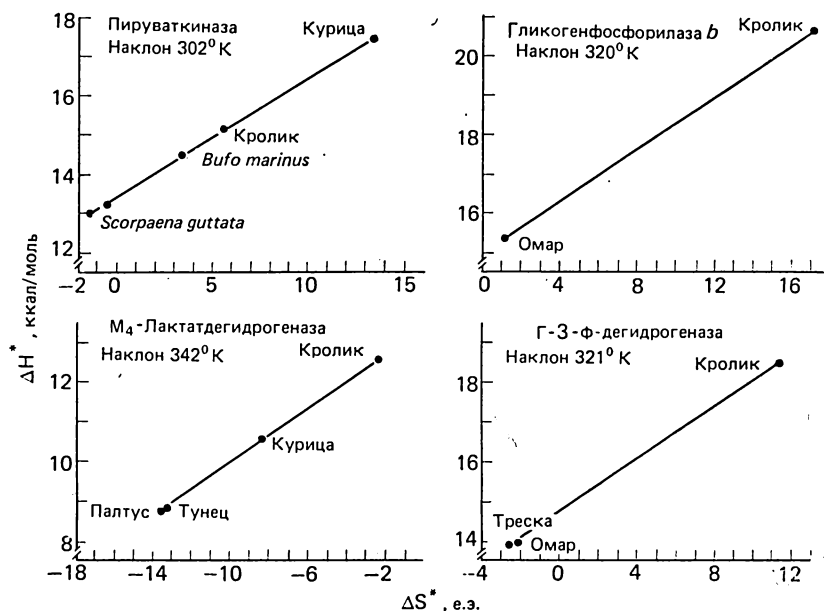


Рис. 11-7. Кривые компенсации (зависимости  $\Delta H^*$  от  $\Delta S^*$ ), отражающие связь между энтальпией и энтропией активации реакций, катализируемых гомологичными ферментами животных разных видов. Наклон кривых выражается в градусах Кельвина (°K). Представлены кривые для пируваткиназы скелетных мышц, M<sub>4</sub>-лактатдегидрогеназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и гликогенфосфорилазы. (По Somero, Low, 1976, с изменениями.)

**Связь между энергией связывания и энергией активации.** Мы неоднократно подчеркивали, что биохимические адаптации следует рассматривать в их взаимосвязи. Изменения одного какого-либо параметра часто приводят к перестройкам других особенностей системы в целом, и поэтому для понимания эволюционных процессов необходим системный подход. Здесь мы должны рассмотреть два отдельных, но энергетически сопряженных этапа ферментативной реакции: связывание и активацию. В работах ряда энзимологов (см. Fersht, 1977) подчеркивалось, что стабильность комплекса фермент-субстрат, зависящая от  $\Delta G^*$  связывания субстрата, может существенно влиять на энергетический барьер активации. Это относится, конечно, и

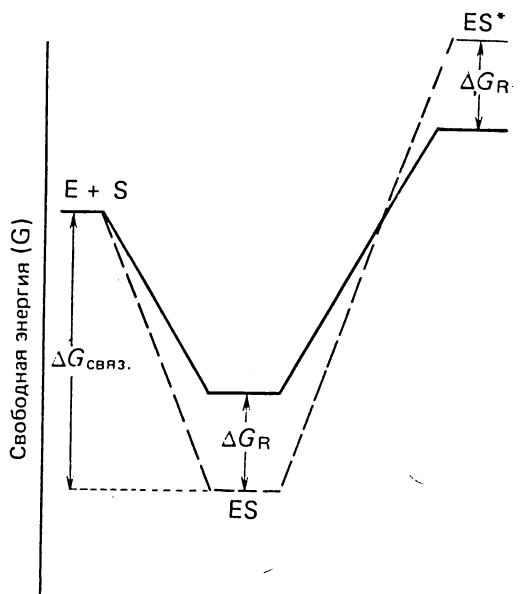


Рис. 11-8. Энергетические профили двух реакций, катализируемых двумя формами одного фермента, которые различаются по изменениям энергии при связывании субстрата и активации. В первом случае (прерывистая линия) участок фермента, связывающий субстрат (S), высококомплементарен по отношению к субстрату (по конфигурации и зарядам), и поэтому при связывании субстрата выделяется большая энергия. При этом комплекс ES попадает в глубокую «энергетическую яму». Во втором случае (сплошная линия) конфигурация и заряды фермента в меньшей степени соответствуют субстрату, поэтому при связывании выделяется меньше энергии и энергетический уровень комплекса ES выше. Та энергия, которая не выделяется в случае более слабого связывания субстрата ( $\Delta G_R$ ), высвобождается в дальнейшем при активации. При этом конфигурация участка, связывающего субстрат, изменяется таким образом, что этот участок становится комплементарным промежуточной форме субстрата. Благодаря выделению  $\Delta G_R$  в случае менее прочного связывания субстрата энергия переходного комплекса ( $ES^*$ ) меньше, и поэтому реакция облегчается. Из такого анализа видно, что выделение большого количества энергии во время первой фазы реакции (связывание субстрата) может приводить к повышению энергетического барьера активации. Таким образом, от перераспределения внутренней энергии связывания ( $\Delta G_{\text{связ}}$ ) (т. е. общей энергии связывания, выделяющейся при взаимодействиях фермента с исходной и промежуточной формами субстрата) между стабилизацией комплекса ES и снижением  $\Delta G^*$  зависит, будет ли ферментативная реакция характеризоваться соответственно высокостабильным комплексом ES или высокой скоростью. (Из Somero, Yancey, 1978, с изменениями.)

к связыванию кофакторов. Как видно из рис. 11-8, из-за большого снижения свободной энергии при связывании субстрата или кофактора комплекс фермент-лиганд попадает в глубокую энергетическую «яму». Поэтому для преодоления энергетического барьера необходимо затратить еще большую энергию. Таким образом, каталитическая эффективность фермента может находиться в обратном отношении к прочности связывания его с лигандом.

Какое же значение имеет все это для адаптации ферментов к температуре? Важнейший факт, позволяющий понять взаимоотношения между энергией связывания и энергией активации, заключается в том, что при повышении температуры комплекс фермент-лиганд обычно «расшатывается». Таким образом, связывание ферментов с субстратами, кофакторами и модуляторами обычно сопровождается отрицательным изменением энтальпии. Это становится понятным, если вспомнить о роли ионных взаимодействий и водородных связей в стабилизации комплекса фермент-лиганд. Следовательно, если фермент функционирует при относительно высоких температурах, для стабилизации его комплекса с лигандом необходимо затратить больше энергии, чем при низкой температуре. Таким образом, модель, приведенная на рис. 11-8, вполне может описывать различия между ферментативными реакциями у теплокровных и у холоднокровных животных. У теплокровных для стабилизации комплекса фермент-лиганд необходимы одна или несколько дополнительных слабых связей, и поэтому энергетический барьер у них выше. Были получены (Börgmann, Moon, 1975) убедительные данные в пользу того, что именно с этим связаны различия в свободной энергии активации между гомологичными  $M_4$ -лактат-дегидрогеназами (см. табл. 11-4). Принципиально этот механизм сходен с тем, который обуславливает различия в изменениях энергии при перестройке конформации (см. выше), а процессы компенсации здесь тоже согласуются с обеими моделями.

Важный вывод из всего сказанного выше состоит в том, что каталитическая эффективность фермента может лимитироваться структурными факторами. В свое время мы ставили вопрос: почему ферменты теплокровных животных, например млекопитающих, при одной и той же температуре менее эффективны, чем ферменты холоднокровных? Приведенный здесь анализ помогает ответить на этот вопрос: дело в том, что структурная стабильность и способность к связыванию лиганда (т. е. стабильность комплекса фермент-лиганд) имеет большее значение для эволюции ферментов, чем достижение максимального каталитического потенциала. Когда в ходе эволюции птиц и млекопитающих от эктотермных предков эффективность

ферментов снижалась, то это компенсировалось и определенным выигрышем. Теперь мы посмотрим, что это за выигрыш, и в результате сможем оценить некоторые молекулярные факторы, определяющие температурный оптимум для живых организмов и их ферментов.

*Постоянство кажущейся  $K_M$ .* Даже простейшая ферментативная реакция включает по меньшей мере три отдельных этапа: связывание субстрата (и кофакторов, если они имеются), химическое превращение субстрата в продукт и отделение продукта с освобождением фермента, способного снова участвовать в катализе. При насыщающих концентрациях субстрата скорость процессов в такой простой цепи обычно лимитируется вторым или третьим этапом. Для реакции восстановления пирувата, катализируемой  $M_4$ -ЛДГ, лимитирующим звеном, по-видимому, служит высвобождение окисленного кофактора ( $NAD^+$ ) на конечном этапе (Everse, Kaplan, 1973). Таким образом, для изменения каталитической активности может быть достаточно изменить энергетические отношения лишь в одном звене всей последовательности катализа (см. выше). Однако любое изменение фермента, способное повлиять на энергетику освобождения продукта (как, например, при адаптивных перестройках ЛДГ), может затрагивать также и энергетику связывания субстрата (или кофактора). Поэтому, как уже говорилось, нельзя изменить какой-либо один компонент ферментной системы, не оказав влияния на целый ряд других ее элементов. Значит, для различных свойств ферментов должны быть установлены своего рода приоритеты, благодаря которым сохранялись бы наиболее важные из таких свойств даже за счет каких-то «уступок» со стороны других, менее важных характеристик.

Одно из важнейших свойств ферментов заключается в их способности поддерживать кажущуюся константу Михаэлиса ( $K_M$ ) для субстрата в пределах, соответствующих нужной эффективности катализа и чувствительности к регуляторным воздействиям. Взаимоотношения между каталитическими и регуляторными свойствами ферментов показаны на рис. 11-9. Если  $K_M$  для фермента очень низка (кривая 1), то уже в условиях покоя он будет функционировать почти с максимальной скоростью. Если на этапе, катализируемом этим ферментом, понадобится увеличить метаболический поток, это окажется невозможным. Поскольку скорость реакции уже близка к  $V_{max}$ , повышение концентрации субстрата не повлияет на работу фермента (многие ферменты, например ЛДГ, даже ингибируются субстратом в концентрациях, в несколько раз превышающих  $K_M$ ). Активация фермента путем регуляторных сигналов, вызывающих снижение  $K_M$ , тоже будет неэффективной. Так, например,



Рис. 11-9. Кривые насыщения субстратом для трех вариантов одного фермента с различными значениями кажущейся  $K_m$ . У фермента 1 эта константа очень мала, и поэтому во всем физиологическом диапазоне концентраций субстрата скорость реакции равна  $V_{\max}$  или близка к ней. Резервы катализа в этом случае минимальны. Напротив, у фермента 3  $K_m$  для субстрата очень велика, поэтому при физиологических концентрациях субстрата значительная часть потенциальных возможностей фермента никогда не используется. Что касается фермента 2, то у него соотношение между  $K_m$  и физиологической концентрацией субстрата оптимально. В этом случае повышение концентрации субстрата может приводить к значительному ускорению реакции, однако насыщение фермента субстратом никогда не наступит (при таком насыщении могло бы происходить неконтролируемое накопление промежуточных продуктов метаболизма; подробнее см. в тексте).

снижение рН в мышцах во время интенсивной нагрузки способно активировать  $M_4$ -ЛДГ путем снижения  $K_m$  для пирувата, и если где-либо  $M_4$ -ЛДГ уже действует с  $V_{\max}$ , то этот важный регуляторный механизм не может привести к увеличению скорости восстановления пирувата и регенерации окисленного кофактора. Из такого рода соображений вытекает, что «хороший» фермент обычно не будет работать в режиме, близком к  $V_{\max}$ , а будет сохранять резерв для ускорения реакции в ответ на регуляторные сигналы (изменения рН или концентрации модуляторов) или на повышение концентрации субстрата. По мнению Эткинсона (Atkinson, 1969), этот последний эффект может служить важным способом стабилизации концентраций субстратов ферментами. Если скорость реакции достигла  $V_{\max}$ , то дальнейшее поступление субстрата может привести к его быстрому накоплению и к катастрофическим последствиям для

клетки в тех случаях, когда субстрат обладает высокой химической активностью или нарушает другие ферментативные процессы.

Если же фермент обладает очень высокой  $K_M$  для субстрата (кривая 3 на рис. 11-9), то такие проблемы не возникают. Однако в этом случае никогда не сможет использоваться значительная часть каталитического потенциала фермента, т. е.

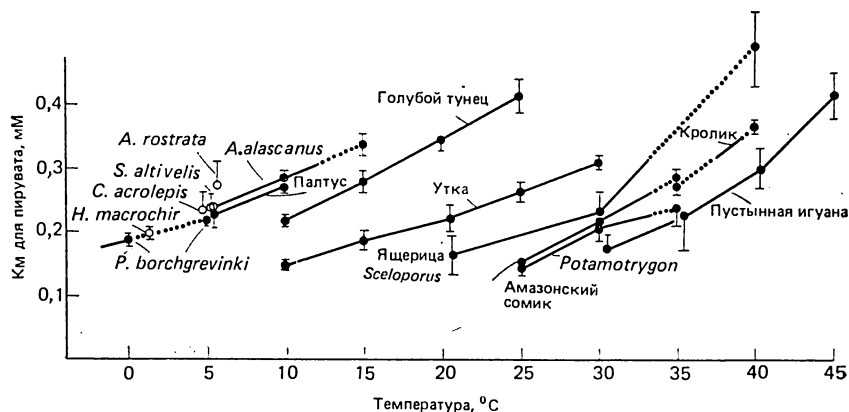


Рис. 11-10. Зависимость кажущейся  $K_M$  для пирувата от температуры у  $M_4$ -ЛДГ позвоночных, адаптированных к разным температурным условиям. Сплошные линии соответствуют физиологическому диапазону температур для того или иного вида. Вертикальными отрезками указаны доверительные интервалы  $K_M$  для уровня достоверности 0,95. Были исследованы представители млекопитающих (кролик), пресмыкающихся (пустынная игуана *Dipsosaurus dorsalis*) и различные рыбы. (По Somero et al., 1983, с изменениями.)

скорость реакции будет далека от  $V_{\max}$ . Даже воздействие регуляторных факторов, снижающих  $K_M$ , может не привести к достаточной активации такого фермента.

Идеальный «компромисс», по нашему мнению, соответствует кривой 2 на рис. 11-9: фермент с такими свойствами обладает достаточным резервом активности, и в то же время при физиологических концентрациях субстрата и модуляторов скорость реакции не будет очень малой по сравнению с  $V_{\max}$ . Строго говоря, следует учитывать не только свойства ферментов, но и внутриклеточную концентрацию субстрата  $[S]$ : для адаптации необходимо надлежащее соотношение между  $K_M$  и  $[S]$ . Каким образом такое соотношение достигается у животных, адаптированных к разным температурам? Варьируют ли концентрации субстратов при неизменных свойствах ферментов или, наоборот, концентрации субстратов остаются постоянными, а свойства ферментов изменяются таким образом, чтобы величины

$K_M$  были равны этим концентрациям или несколько превышали их (рис. 11-9)?

Для того чтобы выяснить это, мы в качестве примера вновь рассмотрим изозим  $M_4$  лактатдегидрогеназы (ЛДГ), так как для этого фермента существует больше всего данных о  $K_M$  и концентрациях субстрата (пирувата) у различных позвоночных. На рис. 11-10 показано влияние температуры на соответствующую  $K_M$  у большого числа позвоночных, в том числе од-

Таблица 11-5. Содержание пирувата в скелетных мышцах различных позвоночных (п — в покое)<sup>1)</sup>

Животное и условия измерения	Концентрация пирувата, ммоль/кг ткани
Собака (п)	0,33
Крыса (п)	0,18
Лягушка (п; 20 °C)	0,11
Форель (п; 12 °C)	0,11
Карп (п; 8—14 °C)	0,12
Угорь (п; 15 °C)	0,14
Золотая рыбка (п; 5 °C)	0,06
Золотая рыбка (п; 25 °C)	0,33
Бычок (п; 15 °C)	0,02
Бычок (п; 25 °C)	0,04
Бычок (после интенсивной работы; 25 °C)	0,33

<sup>1)</sup> Данные для бычка *Gillichthys mirabilis* — из Walsh, Somero (1982); другие данные из различных источников (обзор: Yancey, Somero, 1978).

ного эндотермного животного (кролика) и ряда эктотермных, адаптированных к температурам от  $-1,86^{\circ}\text{C}$  (антарктическая костистая рыба *Pagothenia borchgrevinki*) до  $35-47^{\circ}\text{C}$  (пустынная ящерица *Dipsosaurus dorsalis*). Во всех случаях при повышении температуры  $K_M$  для пирувата увеличивается; наклон кривой для разных ЛДГ несколько различен. В то же время в физиологическом диапазоне температур для каждого животного (на графике — сплошные линии)  $K_M$  варьирует очень незначительно. Во всех случаях при нормальных температурах тела  $K_M$  для пирувата изменялась в пределах  $0,15-0,35$  мМ. На биологическое значение такого постоянства  $K_M$  указывают данные, приведенные в табл. 11-5. В покое концентрации пирувата у разных позвоночных различаются очень незначительно (хотя при интенсивной нагрузке, разумеется, могут повышаться, и во всех случаях  $M_4$ -ЛДГ, по-видимому, обладает доста-

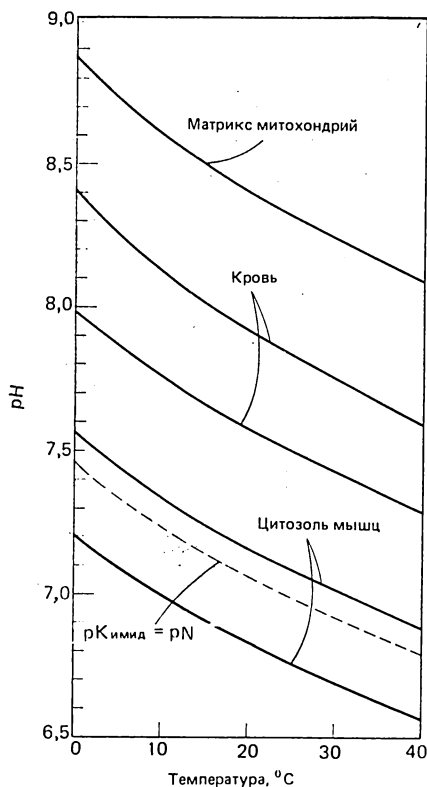


Рис. 11-11. Зависимость pH крови, цитозоля мышечных клеток и матрикса митохондрий, а также рК имидазола (рК<sub>имид</sub>) от температуры тела у животных. На нейтральную точку воды (рN) температура влияет так же, как и на рК<sub>имид</sub>. Указаны пределы для pH крови и цитозоля мышц и предположительные значения pH для матрикса митохондрий (в последнем случае значения pH при различных температурах не измерялись). (По Somero, 1981, с изменениями.)

точными резервами, чтобы «справиться» с этим повышением). Есть тенденция к небольшому подъему концентрации пирувата при повышении температуры тела (мы будем обсуждать это явление несколько позже при анализе значений  $Q_{10}$  in vivo и зависимости  $K_M$  от температуры), однако большое сходство в концентрациях пирувата у разных животных не подлежит сомнению.

Итак, концентрации субстратов у различных животных, по-видимому, удивительно сходны, и ясно, что к ним приспособлены и величины  $K_M$  гомологичных ферментов. Благодаря этим двум консервативным тенденциям сохраняется оптимальное соотношение между  $K_M$  и концентрацией субстрата, и это позволяет ферментам функционировать при скоростях реакций, не слишком далеких от  $V_{max}$ , и в то же время сохранять способность к значительному изменению скорости реакции под действием модулирующих факторов.

*Связь между температурой,  $K_M$  и pH: поддержание постоянства  $K_M$  путем изменения pH.* До сих пор мы не говорили о том, зависит ли сходство  $K_M$  М<sub>4</sub>-ЛДГ и других изученных ферментов у разных жи-

вотных (Somero, 1978) от изменений в первичной структуре ферментов или же от изменений той микросреды, в которой эти ферменты действуют. Теперь мы увидим, что для поддержания  $K_M$  М<sub>4</sub>-ЛДГ на оптимальном уровне используются оба способа адаптации. Изменения микросреды играют большую роль в процессах адаптации в любом временном масштабе!



Микромолекулой, ответственной за адаптацию  $K_M$  для пирувата, служит протон. Нам необходимо подробно рассмотреть связь между рН, температурой тела и функциональными свойствами ферментов, так как эта связь имеет значение для многих биохимических систем, а не только для взаимодействия ферментов с субстратами. На рис. 11-11 представлена зависимость рН крови и цитозоля от температуры, наблюдаемая у самых различных животных — позвоночных и беспозвоночных, эктотермных и эндотермных (обзор: Reeves, 1977). Как правило (хотя есть и интересные исключения, см. ниже), при повышении температуры рН крови и цитозоля снижается, причем наклон кривой составляет  $-0,017$  единиц рН на  $1^\circ\text{C}$ . Эти температурные изменения рН цитозоля ( $\text{pH}_i$ ) и крови наблюдаются как при акклимации отдельных особей, так и у различных видов, адаптированных к разным условиям. Приведем два крайних примера: в мышцах млекопитающих ( $37^\circ\text{C}$ ) в покое величина рН равна примерно 6,7—6,9, тогда как  $\text{pH}_i$  в мышцах антарктических рыб ( $-1,9^\circ\text{C}$ ) составляет около 7,3—7,5. Каковы последствия столь больших (почти на порядок) различий в активности протонов у разных животных? И к чему приводят кратковременные сдвиги рН у эвритермных эктотермных видов?

*Сохранение степени протонирования имидазола.* Для того чтобы понять некоторые преимущества связи между температурой и рН, мы вновь обратимся к взаимодействиям ЛДГ с пируватом: здесь можно найти хорошие примеры явления, лежащего в основе температурной зависимости рН (см. рис. 11-11), — сохранения заряда имидазола. По мнению Ривса (Reeves, 1972), при температурных изменениях рН остается постоянной степень диссоциации имидазольных групп (например, в гистидиновых остатках белков). Из главы 10 мы знаем, что степень диссоциации имидазольных групп, обозначаемая  $\alpha_{\text{ими́д}}$ , равна  $[\text{ими́д}]/[\text{ими́д}] + [\text{ими́д}-\text{H}^+]$ .

Физической основой постоянства  $\alpha_{\text{ими́д}}$  при изменениях температуры и рН является величина энтальпии диссоциации для реакции протонирования имидазола. Она составляет около 7 ккал/моль, и, как видно из рис. 11-11, этому соответствуют температурные изменения  $\text{pK}$  порядка  $-0,017$  единиц рН на  $1^\circ\text{C}$ . Таким образом, кривая зависимости  $\text{pK}_{\text{ими́д}}$  от температуры идет параллельно кривым температурной зависимости  $\text{pH}_i$  и рН крови. Необходимо подчеркнуть, что эта параллельность кривых получается не автоматически, а благодаря активной регуляции рН в организме. У животных, дышащих воздухом, надлежащая величина рН для данной температуры поддерживается изменением легочной вентиляции и, следовательно, содержания  $\text{CO}_2$  в крови. Что касается животных,

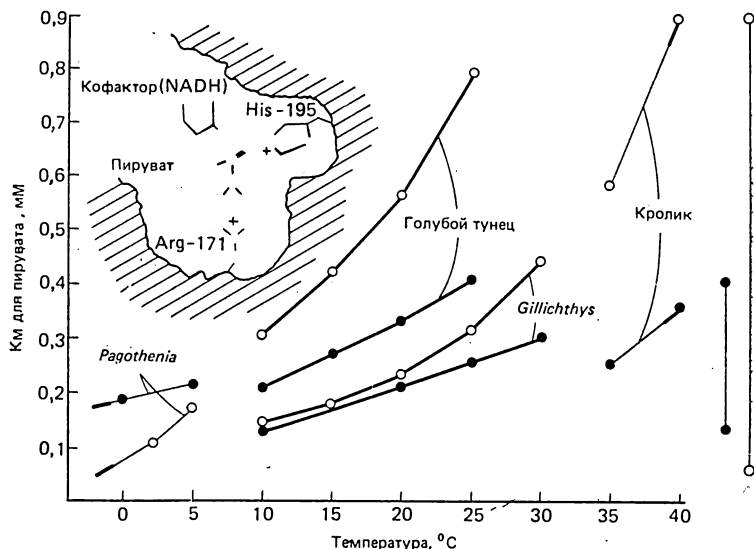


Рис. 11-12. Влияние температуры на кажущуюся  $K_m$  для пирувата у  $M_4$ -ЛДГ трех позвоночных животных, адаптированных к различным температурам. Опыты ставились в двух режимах pH. Первый режим соответствовал температурозависимому pH в присутствии имидазольного буфера (черные кружочки); условия эксперимента при этом были такие же, как в опыте, представленном на рис. 11-9. Второй режим соответствовал постоянству pH (7,4) при любой температуре в среде с фосфатным буфером (светлые кружочки). Вертикальные отрезки справа — диапазоны  $K_m$  в обеих системах при физиологических температурах. Вверху слева — главные аминокислотные остатки связывающего участка ЛДГ. Обратите внимание на стабилизацию связывания пирувата фиксированными зарядами аргинина 171 и протонированной формы гистидина 195. (Somero, 1981.)

дышащих в воде жабрами, то регуляция кислотно-щелочного баланса у них осуществляется путем обмена бикарбонатом с окружающей средой (обзор: White, Somero, 1982). Однако независимо от того, каковы регуляторные механизмы, pH изменяется таким образом, что величина  $\alpha_{\text{имид}}$  остается постоянной. Теперь мы можем рассмотреть значение постоянства этой величины.

Для связывания пирувата с активным центром  $M_4$ -ЛДГ необходима координация с остатком аргинина (Arg-171) и имидазольной группой гистидина (His-195) (рис. 11-12). Остаток аргинина (его гуанидиновая группировка) при физиологических значениях pH несет положительный заряд, так что эта группировка всегда облегчает связывание пирувата. Иначе обстоит дело в случае взаимодействий пирувата с имидазолом

(His-195). Эти взаимодействия служат превосходным примером важности регуляции  $\alpha_{\text{имид}}$  («альфа-статической» регуляции; Reeves, 1972). При физиологических значениях рН имидазольные группы гистидиновых остатков независимо от температуры протонированы примерно наполовину, т. е.  $\alpha_{\text{имид}}$  в цитозоле составляет около 0,5. Это очень важно для функции ЛДГ по меньшей мере в двух отношениях (см. гл. 10). Во-первых, связывание пирувата и лактата очень чувствительно к рН. Для того чтобы к активному центру мог присоединиться пируват, His-195 должен быть протонирован (см. рис. 11-12, вверху слева), а для того чтобы мог присоединиться лактат, — депротонирован. Таким образом, уже в первом приближении можно сказать, что поддержание  $\alpha_{\text{имид}}$  на уровне около 0,5 *позволяет реакции быть обратимой*. Если бы величина рН была очень низкой или очень высокой по сравнению с рК имидазола, равновесие реакции было бы сильно сдвинуто в каком-то одном направлении. Во-вторых, при половинной насыщенности His-195 протонами снижение рН приводит к усилению связывания пирувата и уменьшению связывания лактата. Во время интенсивной физической нагрузки, когда мышцы работают иногда в основном за счет анаэробного гликолиза, снижение рН будет активировать пируватредуктазную функцию ЛДГ путем увеличения связывания пирувата. Здесь мы еще раз убеждаемся, как выгодно сохранять резервы для усиления активности в ответ на регуляторные сигналы (в данном случае  $\text{H}^+$ ).

Возвращаясь теперь к вопросу о постоянстве  $K_M$ , мы видим, что для поддержания этого постоянства как при кратковременных, так и при эволюционных изменениях температуры тела большое значение имеет рассмотренная нами температурная зависимость рН. При постоянном рН (весьма обычном в эксперименте, но не в естественных условиях)  $K_M$  для пирувата у разных гомологов  $\text{M}_4$ -ЛДГ может различаться в 10 раз (см. рис. 11-12, светлые кружочки). Однако при условиях, в отношении рН близких к естественным (буфер имидазол/ $\text{HCl}$  с температурной зависимостью рН, представленной на рис. 11-11 прерывистой линией),  $K_M$  для пирувата удерживалась на относительно постоянном уровне и различалась у ферментов разных животных не более чем в 2 раза. Следует также отметить, что температурные изменения  $K_M$  для отдельно взятого гомолога  $\text{M}_4$ -ЛДГ значительно уменьшаются, когда условия рН близки к естественным. Таким образом, альфа-статическая регуляция обладает преимуществами как при кратковременной, так и при эволюционной температурной адаптации; сходные явления наблюдаются при акклимации и акклиматизации.

Какую роль играют в поддержании постоянства  $K_M$  замены аминокислот в ферментах? Из рис. 11-10 и 11-12 видно, что

гомологичные  $M_4$ -ЛДГ у разных животных имеют внутренние различия и что постоянство  $K_M$  нельзя объяснить одним лишь влиянием рН. Рассмотрим, например, данные, полученные при использовании имидазольного буфера (см. рис. 11-10). Даже в том случае, когда  $\alpha_{\text{ими}}д$  постоянна и, следовательно, влияние His-195 на связывание пирувата ферментами всех животных одинаково, между гомологами все же имеются различия. Так, например, если экстраполировать  $K_M$  кроличьей  $M_4$ -ЛДГ для пирувата на область более низких температур (например, характерных для антарктической рыбы *Pagothenia*), то окажется, что у ЛДГ млекопитающих  $K_M$  значительно ниже. Это может указывать на более высокое сродство к субстрату, присущее самому ферменту. Таким образом, для поддержания постоянства  $K_M$  ЛДГ (и других ферментов) необходимы замены аминокислот: изменения рН могут лишь способствовать стабилизации  $K_M$ . Такой вывод непосредственно следует из того, что для стабилизации комплекса ЛДГ-пируват (и большей части других фермент-субстратных комплексов) недостаточно тех взаимодействий, в которых участвуют имидазольные группы. Например, если субстрат данного фермента вообще не взаимодействует с имидазолом, то альфастатическая регуляция может иметь разве только очень небольшое значение для величины  $K_M$  (или для ее стабилизации при изменениях температуры). В таких случаях постоянство  $K_M$ , возможно, достигается только за счет аминокислотных замен. Эволюционные изменения первичной структуры ферментов, направленные на создание подходящих значений  $K_M$ , могут сопровождаться существенным «побочным влиянием» на каталитическую эффективность. Как уже говорилось, энергетический барьер может зависеть от количества энергии, необходимого для стабилизации комплекса фермент-лиганд. Платой за такую стабилизацию у теплокровных животных может быть снижение каталитической эффективности.

*Пороги температурного стресса: с какого момента изменения температуры тела становятся существенными для организма? Вряд ли можно сомневаться в том, что у животных, обитающих в самых различных температурных условиях (например, в арктических или тропических морях), ферменты по своим свойствам приспособлены к тем температурам, при которых должны осуществляться катализ и его регуляция. Постоянство  $K_M$  у гомологичных  $M_4$ -ЛДГ и других семейств гомологичных ферментов (Somero, 1978) позволяет нам с уверенностью говорить о температурах, оптимальных для их функции. Это те температуры, при которых  $K_M$  (или, точнее, соотношение между  $K_M$  и концентрацией субстрата) поддержива-*

ется на нужном уровне. Теперь нам необходимо выяснить, при каких минимальных сдвигах средней температуры тела возникают приспособительные изменения ферментов.

Для того чтобы разобраться в этом вопросе, лучше всего исследовать близкие виды одного рода, сходные по своим анатомическим и экологическим особенностям, но обитающие в местах с несколько различной температурой. Это позволяет свести к минимуму трудности, возникающие при сравнении, например, рыбы *Pagothenia* с кроликом: при таком несходстве объектов нелегко сказать, что связано непосредственно с различиями в температуре тела, а что — с общими особенностями соответствующих групп животных.

Мы рассмотрим четыре близких вида, температурные условия обитания которых различаются не более чем на 6—8°C. Представители рода барракуда (*Sphyræna*), живущие в восточных районах Тихого океана, встречаются в умеренно холодных зонах по обе стороны от экватора, более теплых водах Калифорнийского залива и в жарких тропических областях (рис. 11-13, вверху слева). Все они относятся к пелагическим стайным рыбам, сходны по форме тела и по экологии (Graves, Somero, 1982). Таким образом, есть веские основания полагать, что любые различия в кинетических свойствах гомологичных ферментов у четырех рассматриваемых видов, приспособленных к трем различным температурным режимам (рис. 11-13, табл. 11-6), обусловлены адаптацией к температуре.

Все данные, полученные при сравнении очищенных гомологичных  $M_4$ -ЛДГ этих четырех видов рыб, подкрепляют изложенные выше соображения о значении различий в свободной энергии активации для температурной адаптации, а также о важности постоянства  $K_m$ . Особенно существенно то, что даже у рыб, температура в местах обитания которых различается всего лишь на несколько градусов, имеются определенные различия (рис. 11-13, табл. 11-6). Интересно также, что у двух видов, обитающих в умеренных зонах (северного *S. argentea* и южного *S. idiaestes*), кинетические свойства ферментов одинаковы. Кроме того,  $M_4$ -ЛДГ у них оказались идентичными и при обычном электрофоретическом анализе, тогда как у двух других видов подвижность гомологичных ферментов иная (рис. 11-13). Поскольку виды *S. argentea* и *S. idiaestes*, обитающие в умеренных зонах, разделились 3—4 млн. лет назад, идентичность их  $M_4$ -ЛДГ ясно показывает, как важно поддержание кинетических свойств ферментов в определенных узких пределах.

У всех четырех видов рыб  $K_m$  для пирувата при средней температуре тела практически одинакова, и величины  $k_{cat}$  тоже весьма постоянны. Эти данные, полученные при сравнении

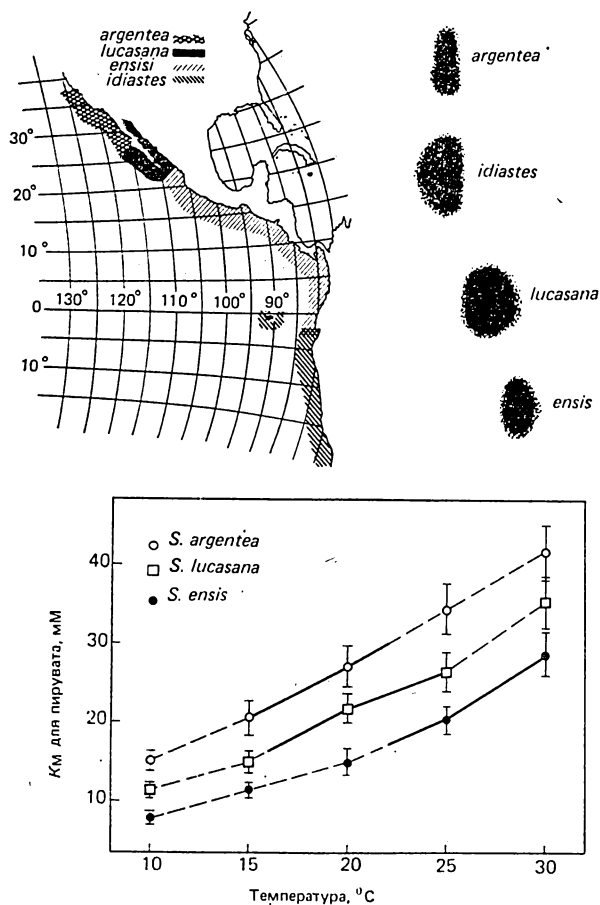


Рис. 11-13. Электрофоретические и кинетические свойства  $M_4$ -ЛДГ четырех видов рыб рода *Sphyræna*, обитающих в восточных областях Тихого океана. Вверху слева: ареалы четырех исследованных видов. Вверху справа: электрофореграммы  $M_4$ -ЛДГ этих видов. Можно заметить, что у обитателей умеренных зон *S. argentea* (северная умеренная зона) и *S. idiaestes* (южная умеренная зона) электрофоретическая подвижность белков одинакова. Внизу: влияние температуры среды на  $K_m$  для пирувата у  $M_4$ -ЛДГ *S. argentea*, *S. lucasana* и *S. ensis*. Значения  $K_m$  для *S. idiaestes* не приведены, так как они те же, что у *S. argentea*. (Graves, Somero, 1982.)

очень близких видов, обитающих в среде с разной температурой, служат убедительным аргументом в пользу того, что и различия между млекопитающими и эктотермными животными, приспособленными к разным температурам, являются важным аспектом биохимической температурной адаптации. Темпера-

турные характеристики ферментов определяются в основном не филогенетическим статусом животного, а температурой тела.

**Температурная зависимость  $K_M$  и значения  $Q_{10}$ .** Практически у всех изученных ферментов повышение температуры приводит к увеличению  $K_M$ . Это может оказывать заметное влияние на  $Q_{10}$  ферментативных реакций. Поскольку концентрации субстратов в клетках ниже насыщающих, изменения  $K_M$  при прочих равных условиях будут влиять на скорость реакций. При повышении температуры величина  $K_M$  может сдвигаться по от-

Таблица 11-6. Кинетические параметры лактатдегидрогеназной реакции у трех рыб рода *Sphyræna*: *S. argentea* (обитатель умеренных зон), *S. lucasana* (субтропический вид) и *S. ensis* (тропический вид). (Graves, Somero, 1982)

	<i>S. argentea</i>	<i>S. lucasana</i>	<i>S. ensis</i>
$K_M$ для пирувата при 25 °C	0,34±0,03 мМ	0,26±0,02 мМ	0,20±0,02 мМ
$k_{cat}$ при 25 °C	893±54 с <sup>-1</sup>	730±37 с <sup>-1</sup>	658±19 с <sup>-1</sup>
Средняя температура (СТ)	18°	23°	26°
$K_M$ для пирувата при СТ	0,24 мМ	0,24 мМ	0,23 мМ
$k_{cat}$ при СТ	667 с <sup>-1</sup>	682 с <sup>-1</sup>	700 с <sup>-1</sup>

ношению к физиологической концентрации субстрата (если одновременно не изменяется и эта концентрация), и в результате  $Q_{10}$  при концентрациях субстрата ниже насыщающих будет значительно меньше, чем при высоких или насыщающих концентрациях. В пользу такого эффекта говорят цифры, приведенные в табл. 11-7. В то же время некоторые данные, приведенные в табл. 11-5, наводят на мысль, что одно из предположений, которые часто принимают при обсуждении влияния  $Q_{10}$  на  $K_M$ , может быть неверным: физиологические концентрации субстрата не всегда остаются постоянными при изменениях температуры, как при кратковременных, минутных колебаниях, так и при процессах акклимации. В качестве примера можно привести реакцию, катализируемую ЛДГ, у костистой рыбы *Gillichthys mirabilis*, обитающей в эстуариях. Температурная зависимость содержания пирувата в скелетных мышцах этой рыбы превосходит температурные изменения  $K_M$  для пирувата. Следовательно, в данной ферментативной реакции увеличение  $K_M$  при повышении температуры не только не приводит к снижению  $Q_{10}$  при ненасыщающих концентрациях пирувата, но, напротив, несколько большее увеличение концентрации пирува-

та по сравнению с повышением  $K_M$  для него сопровождается повышением  $Q_{10}$  до 2,1 — величины большей, чем вычисленная для  $V_{\max}$  (рис. 11-14). Мы полагаем, что сравнительное постоянство отношения концентрации пирувата к  $K_M$  для пирувата играет большую адаптивную роль, чем снижение  $Q_{10}$ , которое могло бы произойти, если бы  $K_M$  увеличивалась значительно быстрее, чем концентрация пирувата. Насколько универсально для различных ферментативных реакций такое соответствие

Таблица 11-7. Влияние концентрации субстрата на  $Q_{10}$  ферментативных реакций, в которых с повышением температуры увеличивается  $K_M$  для субстрата (данные для  $M_4$ -ЛДГ приведены также на рис. 11.10)

Концентрация пирувата, мМ	М <sub>4</sub> -лактатдегидрогеназа <sup>1)</sup>			Пируваткиназа <sup>2)</sup>	
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i> (ящерица) $Q_{10}$	<i>Nezumia bairdii</i> (рыба) $Q_{10}$	<i>Coryphaenoides carapinus</i> (рыба) $Q_{10}$	концентрация ФЕП, мМ	<i>Paralithodes camtschatica</i> (камчатский краб) $Q_{10}$
0,100	1,49	1,28	1,21	0,02	1,6
0,125	1,58	1,40	1,31	0,05	1,9
0,250	1,71	1,42	1,36	0,20	2,2
0,500	1,87	1,50	1,41	0,50	3,0
1,000	1,85	1,63	1,52		
$V_{\max}$ <sup>3)</sup>	2,04	1,70	1,72		

<sup>1)</sup>  $Q_{10}$  для 20—30 °С (Somero, неопубликованные данные).

<sup>2)</sup>  $Q_{10}$  для 5—15 °С (Somero, 1969).

<sup>3)</sup> Величины  $Q_{10}$  для теоретической  $V_{\max}$ .

между  $K_M$  и концентрацией субстрата, мы не знаем. Кроме того, не ясно, насколько велик вклад температурозависимого повышения  $K_M$  в снижение биологических величин  $Q_{10}$  («положительная температурная модуляция» по Hochachka, Somero, 1973). Более очевидным представляется неблагоприятное влияние на метаболизм повышения  $K_M$  при *снижении* температуры («отрицательная температурная модуляция»). Если такое повышение происходит резко, то величина  $Q_{10}$  при ненасыщающих концентрациях субстрата становится чрезмерно высокой. Это связано 1) с уменьшением кинетической энергии, ведущим к замедлению катализа, и 2) со снижением функциональных возможностей ферментов при низких концентрациях субстратов. Подобные эффекты отмечены у нескольких ферментов, в том числе у ацетилхолинэстеразы (рис. 11-15). Особенности изозимов этого фермента, по-видимому, препятствуют отрицательной температурной модуляции (высоким значениям  $Q_{10}$  при низких температурах) и поэтому полезно было бы выяснить, насколько различны ацетилхолинэстеразы у разных видов, а



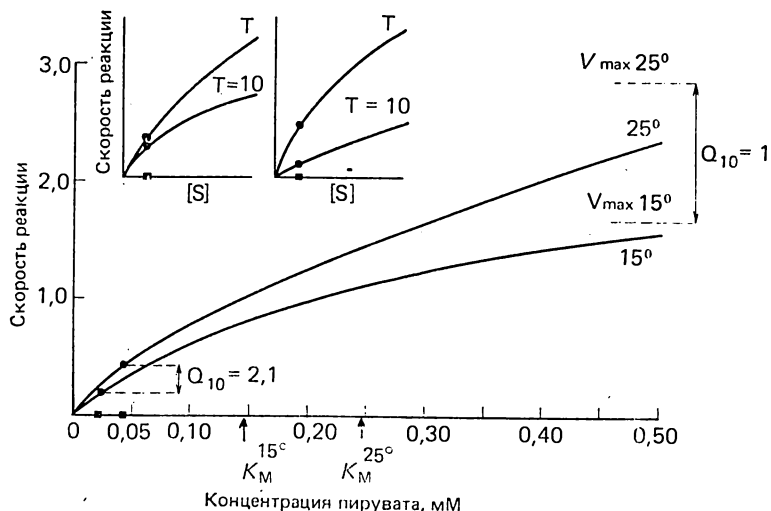


Рис. 11-14. Влияние зависящих от температуры изменений  $K_M$  и концентрации субстрата на температурные коэффициенты ( $Q_{10}$ ) ферментативных реакций. На основном рисунке приведены кривые влияния изменений  $K_M$  для пирувата и концентрации пирувата на реакцию, катализируемую  $M_4$ -ЛДГ *Gillichthys mirabilis* (по данным Walsh, Somero, 1982). Квадратики на оси абсцисс соответствуют концентрациям пирувата в скелетных мышцах особей, акклимированных к 15 и к 25 °C, а кружочки на кривых насыщения — скоростям реакции при этих концентрациях и соответствующих температурах. Поскольку с повышением температуры акклимации (или экспериментальной среды) увеличивается как  $K_M$  для пирувата, так и концентрация пирувата,  $Q_{10}$  при ненасыщающих его концентрациях не уменьшается. В физиологическом диапазоне концентраций пирувата  $Q_{10}$  даже несколько выше, чем при  $V_{max}$  (т. е. при таком значении  $Q_{10}$ , которое было бы при всех концентрациях пирувата, если бы  $K_M$  не зависела от температуры).

Кривые сверху слева иллюстрируют уменьшение  $Q_{10}$  под влиянием уменьшения  $K_M$  при снижении температуры в условиях постоянства физиологических концентраций субстрата. Такие изменения соответствуют «положительной температурной модуляции» (Hochachka, Somero, 1973). Кривые сверху справа иллюстрируют повышение  $Q_{10}$  в том случае, когда при снижении температуры  $K_M$  увеличивается (концентрация субстрата здесь тоже постоянна и не зависит от температуры). Эти изменения соответствуют «отрицательной температурной модуляции» (Hochachka, Somero, 1973). Физиологическая концентрация субстрата  $[S]$  указана квадратиком на горизонтальной оси, а физиологические скорости реакции — кружочками на кривых.

также (на примере радужной форели *Salmo gairdneri*) у особей одного вида при различной акклимации.

**Изозимы и температурная акклимация.** Из раздела, посвященного ферменту  $M_4$ -ЛДГ у разных видов барракуды, мы узнали, что новые наследственные разновидности фермента с кинетическими свойствами, соответствующими температуре среды, могут возникать даже тогда, когда эта температура

различается всего лишь на 6—8°C. Поскольку многие эвритермные эктотермные животные обитают в среде, где сезонные и даже суточные колебания температуры превышают 6—8°C, весьма вероятно, что фермент, представленный только одной формой, не мог бы нормально функционировать во всем диапазоне температур. Правда, температурные изменения  $K_M$  в некоторых случаях (например, при взаимодействиях ЛДГ с пируватом) смягчаются благодаря альфастатической регуляции, однако этот механизм, связанный с адаптивными изменениями внутриклеточной микросреды, может не действовать в отношении других ферментов. В таких случаях для приспособления к широкому диапазону температур будут нужны две или несколько разновидностей фермента. Это могут быть изозимы, кодируемые разными генными локусами, либо аллельные варианты («аллозимы»).

Примером того, какую роль в температурной акклимации могут играть изозимы, кодируемые разными локусами, служат ацетилхолинэстеразы (АХЭ) рыб. На рис. 11-15 показано влияние температуры на  $K_M$  АХЭ для субстрата (ацетилхолина) у разных видов рыб, в том числе у радужной форели (*Salmo gairdneri*) при акклимации к разной температуре. Межвидовые сравнения здесь выявляют такую же картину, как и в случае лактатдегидрогеназы (см. выше). У форели же сходную картину можно наблюдать в пределах одного вида, если сравнивать рыб, акклимированных к 2°C и к 18°C. И у тех и у других  $K_M$  АХЭ в условиях привычной температуры одинакова, однако температурная зависимость этой величины у них различна. Самое существенное отличие состоит в резком увеличении  $K_M$  для ацетилхолина при температурах ниже 15°C у особей, акклимированных к теплу. Возможно, биологическое значение такого резкого повышения связано с тем, что снижение температуры и увеличение  $K_M$  влияют на скорость реакций сходным образом. Понижение способности связывать субстрат ( $K_M$  служит мерой этой способности) одновременно с уменьшением кинетической энергии для преодоления энергетического барьера может приводить к тому, что при физиологических концентрациях субстрата  $Q_{10}$  превысит 10 (Hochachka, Somero, 1973). Таким образом, необходимо не только поддерживать надлежащую величину  $K_M$  для субстрата в определенном диапазоне температур, но и предотвращать резкое повышение этой величины при снижении температуры. У радужной форели обе эти задачи решаются благодаря наличию двух изозимов АХЭ. Пока не выяснено, каким образом достигается нужное соотношение содержания этих двух изозимов. Возможно, что важную роль играют сезонные различия в их синтезе, хотя при изучении другого фермента форели — изоцитратдегидрогеназы — было об-

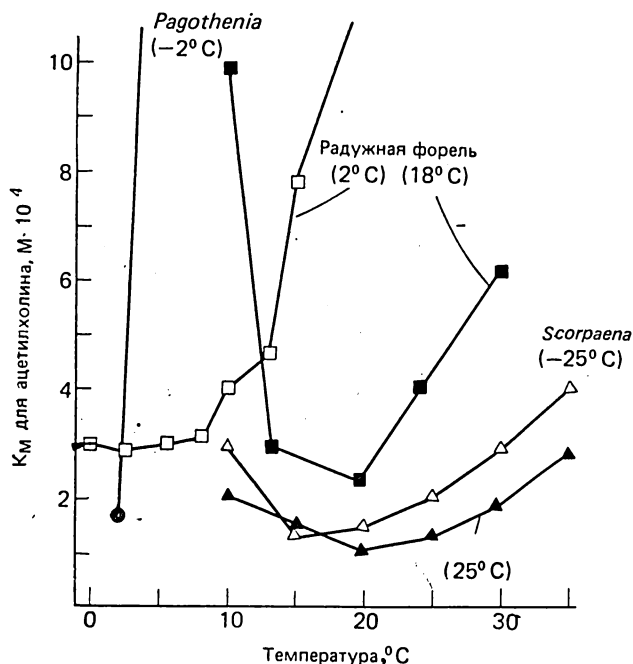


Рис. 11-15. Влияние температуры на кажущуюся константу Михаэлиса ( $K_m$ ) для ацетилхолина у ацетилхолинэстераз рыб, адаптированных или акклиматизированных (в случае радужной форели) к различным температурам. Температура адаптации или акклиматизации приведена в скобках под названиями рыб. Электрофоретическая подвижность изоформ ацетилхолинэстеразы у форелей, акклиматизированных к холодной ( $2^{\circ}\text{C}$ ) и теплой ( $18^{\circ}\text{C}$ ) среде, различна. [По данным Baldwin, 1971 (с разрешения Pergamon Press, Ltd, Copyright 1971) и Baldwin, Hochachka, 1970 (с разрешения The Biochemical Society, Copyright 1970).] Нижняя кривая относится, по-видимому, к рыбе из сем. элопсовых (ladyfish).

наружено, что в любое время года в организме присутствует целое семейство изоформ с различной температурной зависимостью  $K_m$  (Moon, Hochachka, 1971). В этом отношении изоцитратдегидрогеназа, возможно, сходна с системой гемоглобинов (см. гл. 9): в такого рода сложных системах имеются «аварийные» разновидности молекул на случай изменения условий среды.

Насколько обычна стратегия множественных изоформ как механизм температурной адаптации у эвритермных эктотермных животных? Судя по имеющимся данным, у большинства таких животных не вырабатываются специальные «холодовые» и «тепловые» изоформы, подобные вариантам АХЭ у радужной форели (см. Somero, 1975; Shaklee et al., 1977).

Почему такой способ адаптации не встречается чаще? Возможно, это частично связано с важной особенностью некоторых видов, у которых используется эта стратегия. Оказалось, что радужная форель обладает тетраплоидным набором хромосом (Ohno, 1970). Таким образом, у этой рыбы и у многих родственных ей видов имеется по сравнению с «нормальными» диплоидными животными вдвое больше генетической информации, позволяющей приспосабливаться к различным условиям среды. Возможно, что именно эта избыточная информация позволяет радужной форели и другим тетраплоидным видам синтезировать особые «сезонные» формы ферментов (Somero, 1975). Что касается животных с диплоидным набором, то у них адаптацию ко всем возможным условиям обитания обеспечивает лишь один генный локус. Поэтому не исключено, что стратегия множественных изозимов доступна только тем животным, у которых число генных локусов позволяет вырабатывать специфические формы различных белков при разных внешних условиях.

Здесь необходимо подчеркнуть один важный момент. Обычно изозимы специфичны для определенных тканей или даже клеточных органелл. Такие системы вариантов — результат дубликации генов и последующей эволюционной дивергенции образовавшейся пары (или нескольких пар) локусов. Что касается радужной форели и других тетраплоидных животных, то у них, очевидно, произошло удвоение генома, уже содержащего информацию для кодирования всего комплекса тканеспецифических изозимов. Таким образом, дополнительная генетическая информация у них может использоваться не для выработки ферментов, специфичных для разных тканей или органелл, а для синтеза таких вариантов, которые будут действовать при разных внешних условиях.

*Температурная адаптация и аллозимы.* Значение аллельных вариантов ферментов (аллозимов) для акклимации (или акклиматизации) к температуре так же неясно, как и роль вариантов, кодируемых разными локусами. Хотя вопрос о роли аллозимов в адаптации к факторам внешней среды исследовался многими учеными (обзор: Neichrick et al., 1976), известно очень мало четких примеров аллозимов с различными функциональными или структурными особенностями, соответствующими разным условиям среды. Возможно, такая ситуация связана в какой-то мере с методами, которые обычно используются при изучении аллозимов. Многие из таких методов достаточно грубы, как, например, измерение термостабильности на тканевых гомогенатах. Лишь в очень немногих работах использовались полностью очищенные ферменты, а условия опытов *in vitro* (например, pH) соответствовали естественным условиям *in vivo*.

В качестве работы, в которой использовались вполне адекватные методы и были получены убедительные данные в пользу приспособительного значения разных аллозимов, можно привести исследование лактатдегидрогеназы (ЛДГ) у костистой рыбы *Fundulus heteroclitus* (Place, Powers, 1979). Изучался изозим сердечного типа (В) в печени у представителей популяций *Fundulus*, обитающих в различных условиях в водах восточного побережья США от штата Мэн до Флориды. Были обнаружены два аллозима ЛДГ-В (ЛДГ-В<sup>а</sup> и ЛДГ-В<sup>б</sup>). Ген *b* преобладал в северных популяциях, а по мере продвижения к югу он постепенно заменялся геном *a* (в этом районе при уменьшении широты на 1° средняя температура воды повышается на 1°C). Различия в кинетических характеристиках очищенных аллозимов ЛДГ-В соответствовали температурному градиенту среды обитания. Измеряя  $k_{cat}/K_M$  (этот показатель служит мерой катализа при физиологических концентрациях субстрата), исследователи нашли, что при 10°C аллозим *b* в большей степени ускоряет реакцию, чем аллозим *a*; при температуре 25°C наблюдалось обратное соотношение. Для «холодового» аллозима (*b*) максимальное значение  $k_{cat}/K_M$  соответствовало 20°C, а для «теплового» (*a*) — примерно 30°C. Таким образом, хотя в этой работе изучался всего один фермент у представителей одного вида, здесь были получены веские данные в пользу гипотезы, согласно которой аллельный полиморфизм может играть роль тонкого приспособительного механизма, с помощью которого ферментные системы разных популяций одного вида могут адаптироваться к разной температуре среды.

Есть и другие, хотя и несколько менее четкие данные в пользу такой гипотезы. При изучении эстераз (Koehn, 1969), лактатдегидрогеназ (Merriitt, 1972), фосфоглюкоизомераз (Watt, 1977) и алкогольдегидрогеназ (см. Malpica, Vassallo, 1980) были получены результаты, в основном согласующиеся с данными Плейса и Пауэрса. Особый интерес представляет последняя из упомянутых работ (Malpica, Vassallo, 1980). В ней изучались приспособительные различия в аллозимах, обусловленные не только кодирующими их генами, но и генетическим фоном, определяющим фактическую активность данного аллозима *in situ*. Определяли активность «быстрого» (F, от fast) аллозима алкогольдегидрогеназы (АДГ) в популяциях *Drosophila melanogaster*, обитающих при разных температурах. Удельная активность у этого аллозима выше, чем у «медленного» (S, от slow). F чаще встречается у особей, живущих в холодной среде. Поскольку различия в ферментативной активности у разных особей могут быть связаны как с каталитической эффективностью ( $k_{cat}$ ), зависящей от структурного гена, так и с генетическим фоном (например, с факторами, влияющими на

концентрацию фермента), авторы работы высказали мысль, что в температурной адаптации важную роль могут играть не только сами по себе разновидности ферментов, но и особенности генетического фона. Более того, по мнению этих ученых, корреляция между эффектами генетического фона и температурой может убедительно свидетельствовать об адаптивном значении различий в типах аллозимов. В их работе было обнаружено, что влияние генетического фона, направленное на поддержание высокой активности ЛДГ, более выражено в условиях холода. Эти данные указывают на то, что активность аллозимов может значительно изменяться под влиянием генетического фона, на котором они функционируют. Возможно (в свете нашего анализа адаптивных изменений кинетических свойств ферментов, см. выше), эти результаты можно истолковать так, что изменения первичной структуры ответственны за оптимальные кинетические свойства фермента, фактическая же его активность в ткани в значительной части регулируется путем изменения его концентрации (общая активность =  $k_{cat} \cdot [\text{фермент}]$ ). Это подводит нас к необходимости рассмотреть еще одну сторону температурной адаптации ферментов — приспособительные изменения их концентрации, которые могут играть важную роль в компенсации температурных влияний на метаболизм у животных одного и того же вида.

*Компенсация температурных эффектов путем изменения концентраций ферментов.* До сих пор мы рассматривали лишь качественные изменения ферментных систем, направленные на температурную адаптацию; при этом обсуждались приспособительные изменения таких кинетических свойств изо- или аллозимов, как  $K_M$  и  $k_{cat}$ . Однако существует и «количественный» способ температурной адаптации метаболизма — изменения концентраций одних и тех же ферментов. Подобный способ адаптации, очевидно, особенно важен при сезонных изменениях интенсивности обмена, направленных на компенсацию температурных эффектов (см. рис. 11-5 и 11-7). Экотермные животные (рис. 11-5) и растения (рис. 11-17) часто обладают способностью компенсировать влияние низкой температуры на метаболизм и тем самым поддерживать относительно постоянную скорость биохимических реакций в различное время года. При изучении температурной адаптации в большинстве случаев оказывалось, что «сезонных» изоформ, по-видимому, нет, а адаптация достигается путем изменения концентраций многих ферментов, в первую очередь тех, которые лимитируют скорость определенных процессов (Hazel, Prosser, 1974; Shaklee et al., 1977). У животных температурно-компенсаторные изменения часто бывают особенно выражены у ферментов аэробного метаболизма (Hazel, Prosser, 1974; Sidell et al., 1973). Что каса-

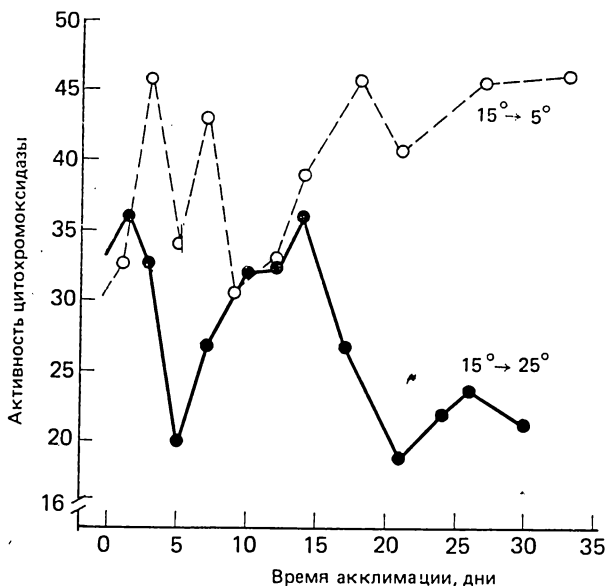


Рис. 11-16. Временной ход изменений активности цитохромоксидазы в скелетных мышцах золотой рыбки при акклимации к различным температурам. Особей, акклимированных к 15°C, переносили в среду с температурой 5°C (светлые кружки) или 25°C (темные кружки). Активность цитохромоксидазы выражена в микромолях цитохрома с, окисленных за 1 с в расчете на 1 мг белка гомогената мышц. (По данным Sidell et al., 1973.)

ется гликолитических ферментов (например, лактатдегидрогеназы), то у них таких изменений может не быть, а иногда происходят даже «антикомпенсаторные» изменения. У животных, дышащих жабрами (например, рыб) такие различия между аэробными и анаэробными ферментами могут быть связаны с тем, что от содержания  $O_2$  в воде зависит метаболический баланс организма. Поэтому организму нужно не только компенсировать влияние температуры, но и приспосабливаться к различному снабжению кислородом. Увеличение количества  $O_2$  при низких температурах облегчает аэробный метаболизм, тогда как у особей, акклимированных к теплу, должна быть повышена способность к гликолизу, особенно при кратковременной интенсивной мышечной работе. Тем не менее изменения ряда ферментных систем [по крайней мере таких аэробных ферментов, как цитохромоксидаза (рис. 11-16) и сукцинатдегидрогеназа (Sidell et al., 1973)], по-видимому, направлены на то, чтобы при изменениях температуры тела скорость метаболических процессов не становилась чрезмерно высокой или низкой. Изменения в количествах аэробных ферментов хорошо объясняют сопут-

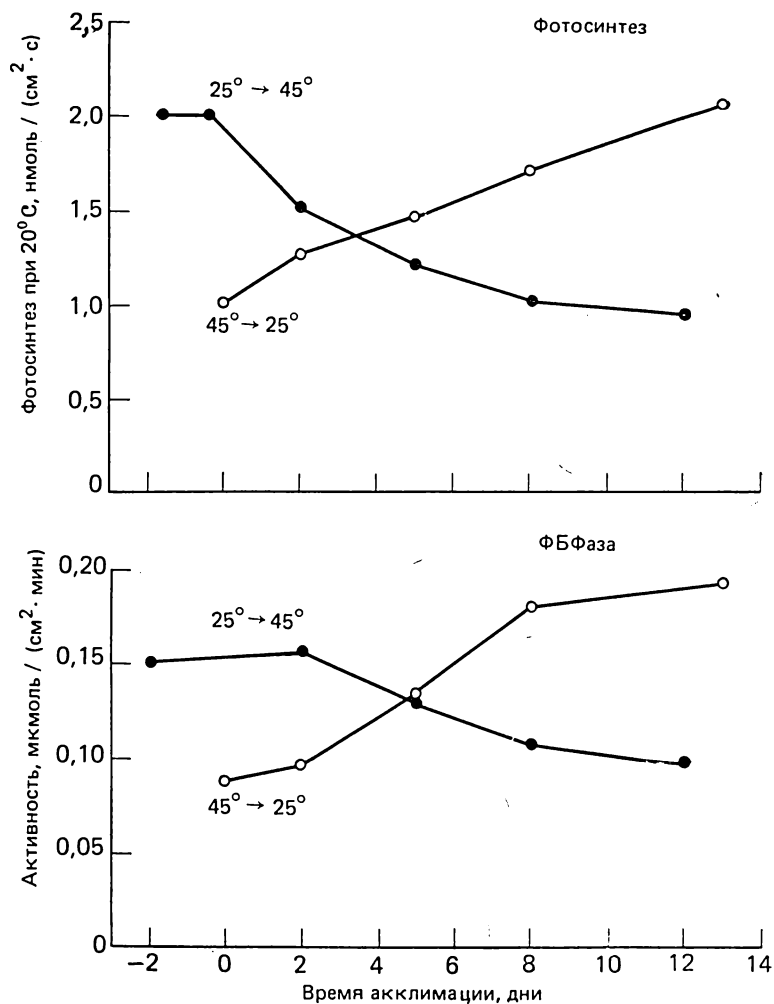


Рис. 11-17. Временной ход изменений максимальной интенсивности фотосинтеза (вверху) и активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФаза) (внизу) в зрелых листьях *Nerium oleander* в период акклимации к различным температурам. Фотосинтез измеряли в наномолях чистого поглощения  $\text{CO}_2$  на 1 см<sup>2</sup> поверхности листа в 1 с при достаточной освещенности и 20 °C. Одну группу растений, акклимированную к 25 °C, переносили в среду с 45 °C, а другую — наоборот. (По Bjorkman et al., 1980, с изменениями.)



ствующие изменения в потреблении кислорода (см. рис. 11-5).

Для анализа сдвигов в концентрациях ферментов при акклимации важно рассмотреть как кинетику ферментативного процесса, так и конечное равновесие. В качестве примера можно привести кривые, представленные на рис. 11-16 и 11-17. У золотой рыбки (Sidell et al., 1973) перед достижением нового устойчивого состояния происходят значительные колебания содержания ферментов. Это наблюдалось при переходе от 15 к 5 и от 15 к 25°C. Механизмы и значение таких колебаний не ясны. У растений (рис. 11-17) были обнаружены более регулярные изменения фруктозобисфосфатазы — одного из ферментов цикла Кальвина — Бенсона. Активность этого фермента плавно изменяется при быстром повышении или понижении температуры, и с этими изменениями удивительно точно совпадают изменения в интенсивности фотосинтеза. Высказано предположение (Bjorkman et al., 1980), что активность фруктозобисфосфатазы является главным лимитирующим фактором в температурной компенсации фотосинтеза у олеандра (*Nerium oleander*). Приспособительные изменения ферментативной активности у олеандра происходили значительно быстрее, чем у золотой рыбки (см. выше).

Следует подчеркнуть, что в большинстве работ, где были обнаружены изменения ферментативной активности в ходе акклимации, не было получено четких данных о фактических концентрациях ферментов. В этих работах обычно изучалась ферментативная активность тканевых гомогенатов. Лишь в немногих случаях были все же измерены фактические концентрации ферментов (Sidell, 1977). В других случаях, где различия в активности ферментов не сопровождались какими-либо изменениями в электрофоретической картине (см., например, Shaklee et al., 1977), можно было заключить, что адаптивные изменения активности обусловлены не особыми изозимами, а просто изменениями концентраций ферментов.

Каков же вклад приспособительных изменений содержания ферментов в компенсацию температурных эффектов у животных разных видов? Ответить на этот вопрос чрезвычайно трудно, так как межвидовые метаболические различия могут быть связаны, например, с большей или меньшей подвижностью животных, и это затемняет влияние собственно температуры (Sullivan, Somero, 1980). Мы неоднократно указывали, что лучшим подходом к данной проблеме могло бы быть исследование очень близких видов. В этом отношении показательна работа Уилсона и др. (Wilson et al., 1974). В этой работе изучались два вида рыб, принадлежащих к роду *Sebastes*. *Sebastes miniatus* летом обитает ниже слоя температурного скачка при сравнительно невысоких температурах (10—12°C). Напротив, *S. auriculatus*

живет выше этого слоя при температуре примерно от 12 до 22 °C. Активность цитохромоксидазы в мышцах свежевывловленных *S. miniatus* на 70% выше, чем у *S. auriculatus*. В опытах с перекрестной акклимацией (рыбы *S. miniatus* адаптировались к 20 °C, а *S. auriculatus* к 10 °C) были обнаружены компенсаторные изменения активности цитохромоксидазы: у *S. auriculatus* она повышалась, а у *S. miniatus* падала. Напротив, активность лактатдегидрогеназы и пируваткиназы у этих видов была одинакова и не изменялась при акклимации. Из этих данных можно сделать два вывода. Во-первых, приспособленность к различным температурам у этих двух видов рыб обусловлена различиями в содержании аэробных ферментов в мышцах. Эти различия не являются жестко закрепленными, так как перекрестная акклимация может их значительно сгладить. Во-вторых, общая картина изменений аэробных и анаэробных ферментов при акклимации может быть различной.

Наконец, нужно остановиться еще на одном моменте, касающемся роли количественных изменений ферментов в компенсации температурных эффектов у животных разных видов. Если под влиянием температуры кинетические свойства фермента изменяются настолько, что оказываются уже неоптимальными (например, при температурных изменениях  $K_M$ ), «количественный» способ компенсации, видимо, нецелесообразен. Наверное, было бы бессмысленно вырабатывать большие количества плохо работающего фермента (например, при холодовой адаптации). В этих случаях (если времени достаточно для того, чтобы могла измениться первичная структура белка) лучше было бы синтезировать новые варианты ферментов с такими  $K_M$  и  $k_{cat}$ , которые соответствуют новым температурным условиям.

**Термостабильность белков.** Что приводит к гибели организма при экстремальных температурах? При попытках ответить на этот вопрос часто ссылаются на термостабильность белков (обширный обзор: Alexandrov, 1977). Для того чтобы выяснить, соответствуют ли пределы выносливости данного организма к перегреву той температуре, при которой наступает денатурация белков, были исследованы самые различные белки животных, растений и прокариот. Почти во всех случаях была обнаружена интересная прямая связь между температурной адаптацией и температурой денатурации  $T_d$ : у организмов, адаптированных к более теплой среде, денатурация белков происходила при более высокой температуре, однако эта температура всегда была на несколько градусов выше, чем верхний предел выживания организма (возможно, единственное исключение — мономеры коллагена; см. ниже). Эти данные приведены в табл. 11-8. Указывает ли такая корреляция между температурой тела и  $T_d$  на какую-либо причинную связь? Или белки просто

Таблица 11-8. Термостабильность гомологичных белков животных, адаптированных к разным температурам

Вид; температура тела, °C (в скобках)	Показатель
Актин скелетных мышц <sup>1)</sup>	Постоянная времени денатурации $k$ ( $\cdot 10^3/\text{мин}$ ) <sup>1)</sup>
Ящерица <i>Dipsosaurus dorsalis</i> (30—47)	0,00
Кролик (37)	1,76
Курица (39)	1,60
<i>Cyprinodon macularius</i> (10—40)	4,45
<i>Thunnus alalunga</i> (15—25)	5,74
<i>Sebastolobus alascanus</i> (3—10)	4,78
<i>Sebastolobus altivelis</i> (3—10)	4,70
<i>Pagothenia borchgrevinki</i> (—1,9)	9,20
<i>Lychnodraco acuticeps</i> (—1,9)	4,66
Пируваткиназа <sup>2)</sup>	Температура тепловой инактивации, °C <sup>2)</sup>
Курица	60
Кролик	62
Костистая рыба <i>Mugil cephalus</i> (18—30)	58
Жаба <i>Bufo marinus</i> (25—32)	57
<i>Sebastes paucispinus</i> (8—17)	55
<i>Sebastes serriceps</i> (8—17)	55
<i>Scorpaena guttata</i> (8—17)	55
<i>Salmo gairdneri</i> (4—15)	56
<i>Pagothenia borchgrevinki</i> (—1,9)	42
Коллаген <sup>3)</sup>	Температура теплового перехода спирали — клубок, °C <sup>3)</sup>
Кожа трески	12
Плавательный пузырь трески	16
Кожа акулы	16
Кутикула дождевого червя	22
Плавательный пузырь карпа	29
Плавательный пузырь окуня	31
Кожа теленка	39
Кутикула аскариды	52

<sup>1)</sup> По данным Swezey, Somero, 1982a. Постоянную времени денатурации вычисляли, исходя из скорости денатурации актина во время инкубации при 38 °C; эта величина тем меньше, чем выше тепловая устойчивость актина. Так, актин ящерицы *Dipsosaurus dorsalis* за 3 ч инкубации не денатурировался вовсе.

<sup>2)</sup> По данным Low, Somero, 1976. Для измерения температуры тепловой инактивации фермент инкубировали 3 мин при различных высоких температурах и определяли наименьшую температуру, при которой каталитическая активность ферментов уже начала снижаться.

<sup>3)</sup> По данным Bailey, 1968.

достаточно устойчивы для того, чтобы во всем диапазоне температур, в котором может существовать организм, они могли сохранять нормальную структуру и, следовательно, функцию?

Ответить на этот вопрос в значительной мере поможет тот факт, что грубая денатурация (диссоциация субъединиц, разрушение третичной структуры и существенное изменение вторичной структуры) служит лишь очень приблизительным показателем состояния белков и не может достоверно отражать температурную устойчивость таких функций, как, например, ферментативный катализ. Каталитические и регуляторные свойства белков могут утрачиваться при более низких температурах, когда еще нет грубой денатурации. Например, как мы уже отмечали, при повышении температуры кажущаяся  $K_M$  обычно возрастает, и поэтому, если температура намного выше нормальной для данного животного, уровень  $K_M$  для той или иной системы фермент—субстрат может становиться существенно выше оптимального (см. рис. 11-10 и 11-15). Ясно, что при этом структура фермента остается «нативной» — сохраняется и агрегация субъединиц, и третичная структура. В то же время страдает реакция, катализируемая этим ферментом, — например, нарушаются регуляторные механизмы. В связи с этим мы полагаем, что значительные и даже, возможно, смертельно опасные изменения ферментативных реакций могут происходить при температурах более низких, чем те, при которых происходит денатурация фермента. Важно помнить, что для организма имеет значение не сам фермент, а та реакция, которую он катализирует и регулирует, а эта реакция может существенно нарушаться задолго до того, как наступит необратимое повреждение фермента в результате перегрева.

Все сказанное еще не позволяет объяснить связь между температурой адаптации и  $T_d$ . В какой-то мере мы касались возможных механизмов этой связи ранее, когда обсуждали взаимоотношения между каталитической эффективностью ферментов и температурной адаптацией. Мы говорили о том, что большая каталитическая эффективность ферментов холоднокровных животных частично или полностью объясняется их более гибкой структурой. Благодаря такой структуре для конформационных изменений во время катализа требуется меньше энергии. Если основным способом адаптации ферментов к температуре служат приспособительные изменения  $k_{cat}$  и поддержание постоянства  $K_M$ , то это позволяет понять корреляцию между температурой тела и  $T_d$  белков. Гибкость структуры обеспечивает, во-первых, повышение каталитической эффективности и, во-вторых, снижение потребности в энергии для стабилизации комплексов фермент-субстрат или фермент-кофактор. Тогда различия в  $T_d$  сами по себе не служат механизмом

температурной адаптации — по крайней мере в тех случаях, когда термостабильность всех гомологичных вариантов того или иного фермента выше, чем предельная для данного вида температура тела.

Существует группа организмов, у которых повышенная тепловая устойчивость белков явно необходима для выживания при экстремальных температурах среды. К ним относятся термофильные бактерии, способные жить в воде с температурой, близкой к 100°C. При нормальной температуре роста термофильных бактерий белки других организмов, как правило, денатурируются (см. табл. 11-8). Это заставляет предположить, что аминокислотный состав белков таких бактерий резко отличается от состава гомологичных или аналогичных белков мезофильных и психрофильных (холодолюбивых) видов. Возможно также, что в цитоплазме термофильных бактерий содержатся вещества, предохраняющие белки от тепловой денатурации.

При исследовании многих белков термофильных бактерий было показано, что эти белки действительно необычайно устойчивы к тепловой денатурации (Singleton, Amelunxen, 1973; Singleton et al., 1977). Некоторые из этих белков *in vitro* выдерживают длительный прогрев при температурах около 90°C. Не удивительно, что много внимания было уделено механизмам, ответственным за столь высокую термостабильность. Имеющиеся данные довольно скудны, так как нет сведений о трехмерной структуре гомологичных или аналогичных белков мезофильных и термофильных организмов (см. Argos et al., 1979); но они все же указывают на несколько способов структурной адаптации, играющих, по-видимому, важную роль в стабилизации белков термофильных бактерий. Во-первых, сравнение D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Bacillus stearothermophilus* (сохраняющей структуру и активность при температурах до 60—70°C) и *Thermus aquaticus* (до 95°C) показало, что повышение термостабильности во втором случае обеспечивается лишь одной или двумя добавочными электростатическими связями. Это соответствует свободной энергии 5—10 ккал/моль (Biesecker et al., 1977). Полагают, что увеличение числа электростатических связей (солевых мостиков) служит универсальным механизмом повышения температурной устойчивости (см. Zuber, 1979).

Аргос и др. (Argos et al., 1979) обнаружили дополнительные механизмы повышения термостабильности белков, сравнив данные о трехмерной структуре очищенных ЛДГ, D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферредоксина термофильных и мезофильных организмов. По мнению исследователей, устойчивость этим ферментам придает значительное число малых изменений. Например, гидрофобность поверхности у белков термофильных бактерий меньше, а внутренних частей — больше.

Поскольку при повышении температуры гидрофобные взаимодействия обычно стабилизируются (см. Brandts, 1967), эти отличия, вероятно, способствуют устойчивости. Кроме того, в белках термофильных бактерий были найдены замены аминокислот, повышающие стабильность  $\alpha$ -спиральных участков. Способность к образованию  $\beta$ -слоев тоже несколько повышена. И наконец, размеры боковых цепей некоторых алифатических аминокислот, скрытых в глубине молекулы, оказались увеличенными; это также может способствовать стабилизации гидрофобных взаимодействий.

При рассмотрении механизмов, повышающих термостабильность белков термофильных бактерий, важно подчеркнуть, что суммарная свободная энергия стабилизации, обеспечивающая поддержание нативной структуры белка, составляет лишь около 30—50 ккал/моль (Brandts, 1967). Эта энергия представляет собой алгебраическую сумму ряда величин, в том числе величины снижения энтропии при образовании регулярной «свернутой» белковой структуры, повышения энтропии в результате гидрофобных взаимодействий между глубинными аминокислотными остатками и изменений энергии при образовании межбелковых водородных мостиков вместо водно-белковых. Если сложить все эти изменения энергии, связанные с укладкой пептидной цепи белка и образованием компактной нативной структуры, то окажется, что суммарная свободная энергия стабилизации соответствует энергии лишь нескольких слабых связей. Между тем формирование конечной структуры белка требует образования и разрыва сотен таких связей. Столь малая величина суммарной свободной энергии стабилизации белка означает, что для превращения мезофильного белка в термофильный требуется образование лишь нескольких добавочных слабых связей (или некоторое усиление уже существующих). Действительно, исследования Аргоса и др. (Argos et al., 1979) очень четко показали, насколько незначительны изменения, придающие белку термостабильность. Данные этих авторов свидетельствуют также о том, что для большинства подобных аминокислотных замен, превращающих мезофильный белок в термофильный, достаточно изменить лишь одно основание в триплете. Таким образом, в отношении требуемых мутаций и замен аминокислот образование термофильных белков — сравнительно простая эволюционная задача.

Итак, в большинстве случаев устойчивость белков термофильных бактерий к высоким температурам обусловлена, скорее всего, изменениями первичной структуры. Однако иногда эту устойчивость могут обеспечивать особые защитные вещества. Осима (Oshima, 1979) установил, что аппарат белкового синтеза у термофильной бактерии *Thermus thermophilus* защищен

от тепловой денатурации четырьмя полиаминами. В отсутствие этих полиаминов синтез белков практически полностью подавлялся уже при 50°C, хотя все отдельные компоненты системы трансляции оказались термостабильными. Защитные полиамины облегчали трансляцию при высоких температурах, а их состав и содержание в свою очередь тоже зависели от температуры инкубации. Поскольку белковый синтез особо чувствителен к температурным воздействиям (обзор: Bernstam, 1978), для нормальных взаимодействий между информационной РНК, рибосомами, транспортными РНК и белковыми факторами трансляции необходимы, видимо, дополнительные механизмы типа защитных полиаминов.

Здесь полезно рассмотреть также структурные модификации транспортных РНК (тРНК) у термофильных бактерий. У *T. thermophilus* были обнаружены два механизма, повышающие термостабильность тРНК (Oshima, 1979). В этих РНК, так же как и в рибосомных РНК и тРНК других термофильных бактерий, содержание гуанина и цитозина выше, чем в гомологичных РНК мезофильных организмов. Это легко объяснить тем, что пары оснований G-C, как известно, более термостабильны, чем A-U. Кроме того, в тРНК *T. thermophilus* и некоторых других крайних термофилов содержится 5-метил-2-тиоуридин (S). Установлено, что производные 2-тиоуридина усиливают взаимодействия между основаниями в спиральной структуре нуклеиновой кислоты. Как выяснилось, степень тиолирования зависит от температуры, при которой росли бактерии: содержание S было прямо пропорционально этой температуре. По всей видимости, тиолирование происходит после транскрипции. Как мы уже знаем, для превращения мезофильного белка в термофильный необходимо лишь небольшое число добавочных слабых взаимодействий, и в связи с этим интересно, что при тиолировании, повышающем термостабильность тРНК, в ее молекуле, стабилизированной более чем 60 слабыми связями, тоже добавляются всего только три такие связи (Oshima, 1979).

В то время как белки термофильных бактерий во многих случаях еще могут функционировать при температуре лишь на несколько градусов ниже температуры их денатурации, в животном царстве известен лишь один белок, температура денатурации которого близка к средней температуре тела. Это коллаген — самый распространенный белок большинства животных, составляющий около четверти всего белка тела. Температура его денатурации коррелирует со средней температурой тела и очень близка к верхнему летальному пределу температуры для того или иного вида (Rigby, 1968). Сначала образуется тропоколлаген, который представляет собой спираль, образованную тремя линейными полипептидными цепями. Тропоколлаген слу-

жит структурным элементом для построения коллагена; при этом образуются ковалентные поперечные связи (например, между модифицированными боковыми цепями лизина). Благодаря этим поперечным связям коллаген становится гораздо более термостабильным, чем тропоколлаген. Денатурация тропоколлагена с образованием желатины — вещества с неупорядоченной спиральной структурой — происходит обычно при температурах, очень близких к верхнему летальному пределу для данного вида животных. Этот процесс в значительной степени зависит от содержания пролина и гидроксипролина в молекуле тропоколлагена. У холоднокровных животных гидроксипролина меньше, чем у теплокровных. Полагают, что термостабильность коллагена зависит также от расположения остатков гидроксипролина в спирали.

Отчего белок может быть таким термолабильным? Возможное объяснение метастабильности тропоколлагена состоит в том, что для построения более сложных коллагеновых структур необходимы «гибкие» элементы. Можно предположить, что это связано с особенностями построения коллагена: сначала образуется тройная спираль тропоколлагена, затем от ее обоих концов под действием протеолитических ферментов отщепляются пептиды, а потом происходит сборка коллагеновых фибрилл и образуются ковалентные поперечные сшивки. Когда же формируется «зрелый» коллаген, его термостабильность более чем достаточна для того, чтобы существовать даже при температурах значительно выше нормальной температуры тела. Таким образом, тепловая денатурация опасна для коллагена лишь на стадии построения его молекул; конечная же форма коллагена термоустойчива.

После всех этих рассуждений о стабильности структуры белка у читателя может создаться впечатление, что в процессе эволюции неизменно отбирались долгоживущие белки. На самом же деле период полураспада белков варьирует в пределах от нескольких минут до нескольких недель, а в среднем в печени крысы он составляет 3,5 суток (обзоры: Goldberg, Dice, 1974; Goldberg, St. John, 1976). Быстрее всего обновляются те белки, которые служат ферментами в лимитирующих скорость звеньях различных метаболических путей (Goldberg, St. John, 1976). Полагают, что короткий период полураспада таких ферментов указывает на важную роль кругооборота белков в регуляции активности многоферментных путей. Если, например, синтез лимитирующего фермента прекращается, то благодаря его короткому периоду полураспада активность соответствующего метаболического пути быстро снижается.

Показано, что период полураспада различных белков тесно коррелирует с их устойчивостью к тепловой денатурации (Gold-



berg, Dice, 1974). Очень гибкая структура белка может делать его более чувствительным к протеолитическим ферментам, так как даже при нормальной температуре тела его пространственная структура будет легче «раскрываться». Говоря об эволюционном отборе белков на термостабильность, мы должны учитывать возможность того, что постоянство периода полураспада этих белков в физиологическом диапазоне температур может иметь приспособительное значение. Например, если при низких температурах тела период полураспада лимитирующих ферментов становится слишком большим, то в процессе отбора у холоднокровных животных для сохранения нормальной скорости оборота этих ферментов должны вырабатываться белки с пониженной термостабильностью. Пока не ясно, насколько важна роль таких приспособительных изменений в структуре белков. Влияние температуры на обновление белков еще плохо изучено, и, по-видимому, оно очень сложно (Somero, Doyle, 1973; Gold-berg, Dice, 1974).

*Обратимое влияние температуры и pH на ассоциацию субъединиц.* Сказанное выше о влиянии температуры на период полураспада наводит на мысль, что температурные изменения структуры белков, будучи во многих случаях неблагоприятными, могли бы, с другой стороны, использоваться для тонкой регуляции метаболических процессов. Кроме того, температурные эффекты могут усиливать действие низкомолекулярных модуляторов ферментативной активности. Примером физиологически важных взаимоотношений между структурой белка, температурой и низкомолекулярными модуляторами может служить контроль активности регуляторного фермента, с которым мы уже неоднократно встречались,— фосфофруктокиназы.

На рис. 11-18 приведены кривые, отражающие совместное влияние температуры, pH и концентрации мочевины на активность и структуру фосфофруктокиназы из скелетных мышц суслика *Citellus beecheyi*. Это животное может впадать в зимнюю спячку. Как уже говорилось в главе 7, переход от обычного состояния (с температурой тела 37 °C) к спячке сопровождается резким снижением интенсивности метаболизма и прекращением термогенеза (например, дрожь). Свойства мышечной фосфофруктокиназы *C. beecheyi*, по-видимому, способствуют быстрой и обратимой активации и инактивации гликолиза в мышцах. Если воспроизвести условия, существующие *in vivo* в период спячки,— низкую температуру (6 °C) и ацидоз (у животных в это время pH вне- и внутриклеточной жидкости на 0,2—0,4 меньше, чем можно было бы предположить, исходя из кривой на рис. 11-11), тетрамеры фермента быстро распадаются на димеры. Это сопровождается утратой каталитической активности (рис. 11-18, А) и снижением светорассеяния (рис. 11-18, Б). Рас-

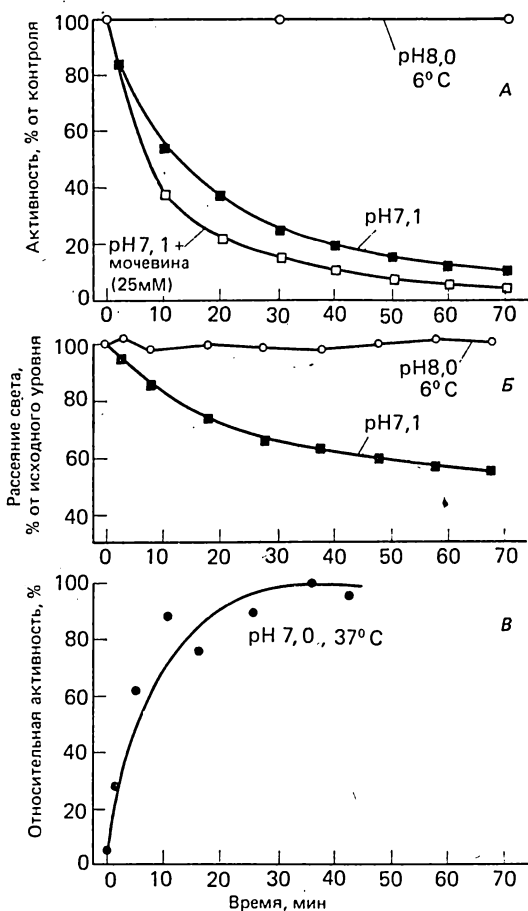


Рис. 11-18. Влияние температуры, pH и концентрации мочевины на активность и ассоциацию субъединиц очищенной фосфофруктокиназы (ФФК) из мышц суслика *Citellus beecheyi*. А. Падение активности ФФК в условиях инкубации при различных pH в присутствии мочевины (25 мМ) и без нее. Контрольное значение активности соответствует исходному уровню; в щелочной среде активность ФФК сохраняется в течение длительного времени. Б. Временной ход изменений светорассеивающей способности ФФК при различных условиях инкубации. Снижение светорассеивания при pH 7,1 отражает распад тетрамеров на димеры. В процентном отношении светорассеивающая способность снижается меньше, чем ферментативная активность (А), так как димеры ФФК в некоторой степени сохраняют эту способность. В. Временной ход реактивации ФФК, инактивированной диализом при низкой температуре и низком pH. (По данным Hand, Somero, 1983a, *Physiol. Zoology*, 56, 380—388. С разрешения Univ. of Chicago Press. Copyright 1983 by the Univ. of Chicago.)

сеяние света служит чувствительным показателем величины молекулярных агрегатов, и его измерение позволяет судить о степени диссоциации функционально активных тетрамеров на неактивные димеры. При указанных выше условиях *in vitro* фосфофруктокиназная активность примерно через час уменьшается в 10 раз. Такая инактивация *in situ* привела бы к практически полному подавлению гликолиза в мышце, прекращению термогенеза, связанного с дрожью, и сбережению мышечных запасов гликогена, которые будут нужны для согревания тела и двигательной активности после пробуждения от спячки.

Влияние температуры и рН на структуру и функцию фосфофруктокиназы не могло бы играть регуляторную роль, если бы оно не было легко обратимым (см. рис. 11-18, В). Если этот фермент, полностью инактивированный диализом при низком рН и низкой температуре, поместить в буферный раствор с такими же условиями, как в мышцах нормально бодрствующего животного (37°C, рН около 7,0), то димеры быстро объединяются в тетрамеры и фермент полностью восстанавливает свою активность. По-видимому, благодаря такому обратимому равновесию между тетрамерным и димерным состояниями фосфофруктокиназы гликолиз в мышцах зимнеспящих млекопитающих может быстро включаться и выключаться.

Учитывая это влияние температуры и рН при анализе температурной адаптации эктотермных животных, можно лучше понять биологический смысл зависимости рН от температуры тела (см. рис. 11-11). Повышение рН при снижении температуры тела, обнаруженное почти у всех исследованных животных (кроме зимнеспящих), препятствует созданию таких условий температуры и рН, при которых утрачивается тетрамерная структура (а потому и активность) фосфофруктокиназы.

Благодаря тому что при изменениях температуры белки становятся лабильными, может повышаться их чувствительность и к другим взаимодействиям, изменяющим их структуру, и это тоже может иметь значение для регуляции. Например (рис. 11-18, А), мочевины в очень малых концентрациях (25 ммоль/л) ускоряет снижение активности фосфофруктокиназы. По-видимому, такое влияние мочевины на активность этого фермента очень широко распространено у самых различных животных (Hand, Somero, 1982, 1983a). У животных с высоким содержанием мочевины в организме (например, у хрящевых рыб и у некоторых костистых рыб и амфибий, впадающих в летнюю спячку) это влияние может иметь физиологическое значение. Здесь нам было бы важно выяснить, может ли мочевина играть роль ингибитора гликолиза в тех условиях, когда такое ингибирование необходимо. У млекопитающих, впадающих в зимнюю спячку, концентрации мочевины во время спячки обыч-

но не повышаются, и поэтому способность этого вещества усиливать эффекты низкой температуры и низкого pH, вероятно, проявляется редко. Однако у некоторых животных, впадающих в летнюю спячку, мочевины может накапливаться в значительных количествах (например, 200—400 ммоль/л у лопатонога *Scaphiopus couchi*; см. McClanahan, 1967). У таких животных мочевины могла бы играть важную роль в подавлении гликолиза. Это было бы возможно и у двоякодышащих рыб, у которых во время летней спячки тоже создаются высокие концентрации мочевины.

Диссоциация фосфофруктокиназы при низкой температуре — это лишь один из примеров холодовой инактивации ферментов (см. Beuer, 1972). Во многих случаях, однако, остается неясным, насколько велико значение совместного влияния температуры и pH, так как в большинстве работ не учитываются физиологические уровни этих величин. В то же время можно привести один хороший пример существенной с физиологической точки зрения инактивации ферментов при низкой температуре. У некоторых  $C_4$ -растений фермент пируват-ортофосфатдикиназа, играющий важную роль в регенерации первичного акцептора  $CO_2$  — фосфоенолпирувата, — при низкой температуре диссоциирует с образованием неактивной формы (Sugiyama et al., 1979). Кинетика инактивации *in vitro* у разных видов различна: у растений, адаптированных к холоду, этот фермент обладает большей холодоустойчивостью, чем у видов, приспособленных к теплу. Сходные взаимоотношения были обнаружены и в исследованиях *in vivo*, в которых интактные листья подвергали воздействию холода, после чего измеряли активность экстрагируемых ферментов.

Итак, обратимое влияние температуры на ферментные комплексы из нескольких субъединиц в некоторых случаях может угрожать интеграции обменных процессов, но в других случаях оно может играть важнейшую роль в регуляции, направленной на быстрое и обратимое изменение активности метаболических путей.

*Температурная адаптация процессов сборки субъединиц на примере мышечного актина.* Обсуждая влияние температуры на агрегацию субъединиц, мы не говорили о возможных межвидовых различиях этого процесса. Однако можно задаться вопросом: одинаковы ли изменения энергии при ассоциации субъединиц у разных животных? Или у различных мультимерных гомологичных белков существуют какие-то адаптивные особенности? В этом отношении был исследован только один белок — актин скелетных мышц (Swezey, Somero, 1982a). Кривые, приведенные на рис. 11-19, показывают, что температура по-разному влияет на энергетические параметры ассоциации субъединиц

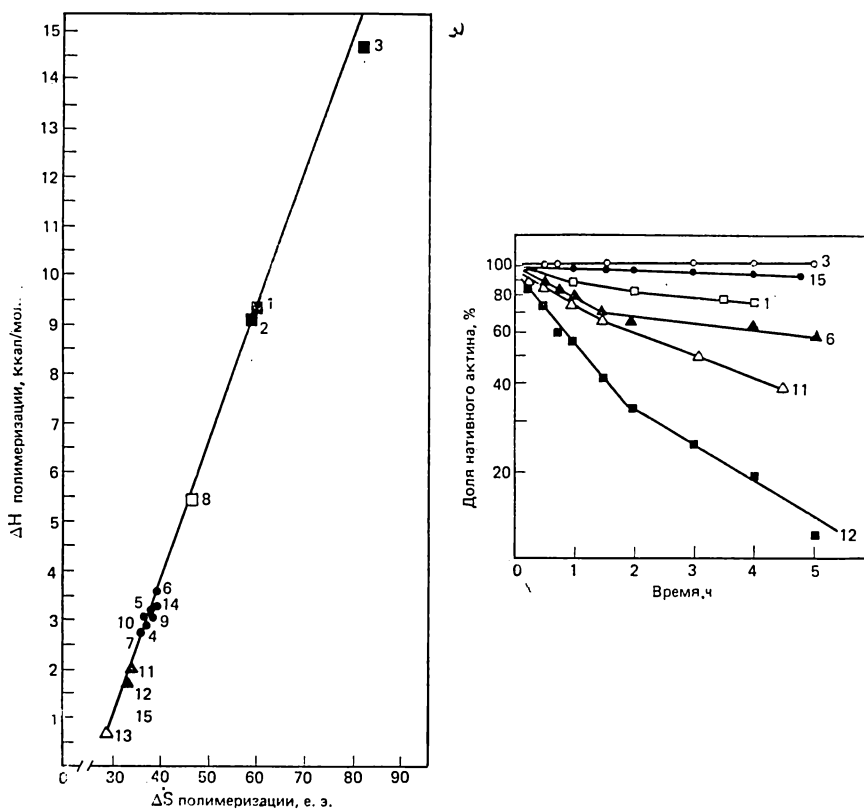


Рис. 11-19. Термодинамические параметры полимеризации (слева) и тепловая денатурация (справа) очищенного актина скелетных мышц животных, значительно различающихся по температуре тела. Слева: кривая компенсации, связывающая изменения энтальпии ( $\Delta H_{пол}$ ) и энтропии ( $\Delta S_{пол}$ ) при соединении мономеров актина в цепь фибриллярного актина. Справа: денатурация мономеров актина во время инкубации при 38°C. Константы скорости денатурации приведены в табл. 11-8. (С разрешения Swezey, Somero, 1982a; Copyright 1982, American Chemical Society.) 1 — кролик, 37°C; 2 — цыпленок, 39°C; 3 — пустынная игуана *Dipsosaurus dorsalis*, 30–47°C; 4 — костистая рыба *Sebastolobus alascanus*, 3–10°C; 5 — *Sebastolobus altivelis*, 3–10°C; 6 — костистая рыба *Caranx hippos*, 25–28°C; 7 — костистая рыба *Cyprinodon macularius*, 10–40°C; 8 — скат *Rhinobatos productus*, 10–20°C; 9 — белая мускулатура тунца *Thunnus alalunga*, 15–25°C; 10 — красная мускулатура *T. alalunga*; 11 — костистая рыба *Gymnodraco acuticeps*, –1,9°C; 12 — костистая рыба *Pagothenia borchgrevinki*, –1,9°C; 13 — костистая рыба *Coryphaenoides armatus*, 2°C; 14 — *C. acrolepis*, 2°C; 15 — костистая рыба *Halosaurus macrochir*, 2°C.

(энтальпию и энтропию) в зависимости от видовой принадлежности актина. Термостабильность актина тоже варьирует в соответствии с температурой, к которой приспособлен тот или иной вид. С повышением температуры местообитания увеличиваются и энтальпия, и энтропия полимеризации актина (единственное и весьма интересное исключение составляют глубоководные рыбы; см. гл. 12). Самые высокие значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  полимеризации обнаружены у пустынной игуаны *Dipsosaurus dorsalis*, а самые низкие — у таких адаптированных к очень холодной воде рыб, как *Pagothenia borchgrevinki* и *Gymnodraco acuticeps*. Эти межвидовые различия по  $\Delta H$  и  $\Delta S$  полимеризации в точности сходны с различиями  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$ , выявленными при сравнительном исследовании изменений реакции активации в ходе ферментативного катализа. Как при ассоциации, так и при катализе изменения энтальпии и энтропии увеличиваются при повышении температуры среды обитания, и, кроме того, в обоих случаях между изменениями этих двух величин существуют выраженные компенсаторные взаимоотношения. Несколько раньше в этой главе мы обсуждали возможные причины межвидовых различий  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$ ; можно ли с этих позиций объяснить биологический смысл различий в  $\Delta H$  и  $\Delta S$  полимеризации актина, при которой изменяется структура белка и (или) состояние молекул воды?

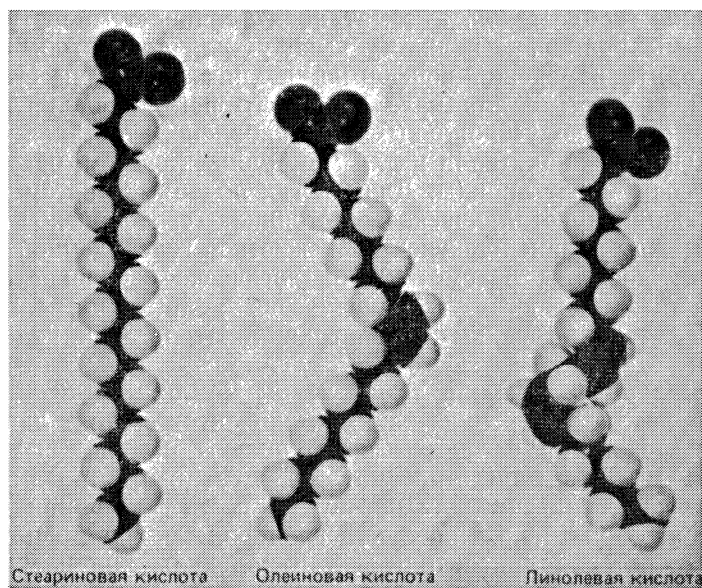
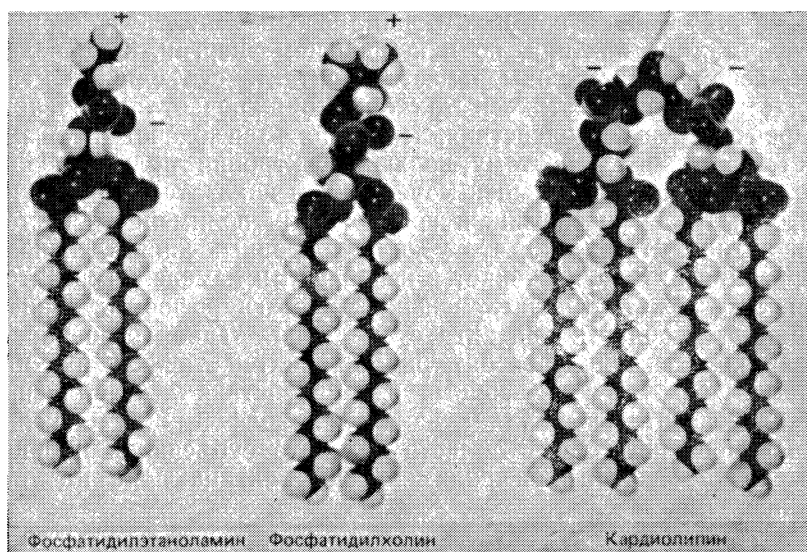
Важной особенностью перехода актина из глобулярного состояния в фибриллярное является изменение конформации мономера (G-актина) при его присоединении к актиновой нити (F-актину). Это изменение конформации — эндотермический процесс. Различия в энтальпии связывания у разных гомологов актина позволяют предположить, что у животных с очень высокой температурой тела (например, у пустынной игуаны *Dipsosaurus dorsalis*, у которой она достигает 47°C) актин обладает более жесткой структурой, и поэтому для изменения конформации необходимо большее повышение энтальпии. У видов, приспособленных к холоду, например у антарктических рыб *Pagothenia borchgrevinki* и *Gymnodraco acuticeps*, актин имеет более гибкую структуру, и для изменения его конформации требуется меньший прирост энтальпии. Положительные изменения энтальпии сопровождаются и увеличением энтропии системы. Это видно из кривой компенсации, представленной на рис. 11-19 (слева). Таким образом, изменение конформации актина может приводить к увеличению энтропии, частично компенсирующему неблагоприятное влияние положительного сдвига энтальпии на изменение суммарной свободной энергии полимеризации. Действительно, различия в свободной энергии полимеризации у гомологичных актинов разных животных невелики (Swezey, Sotero, 1982a). Полимеризация актина сопровождается не только

изменениями энтальпии и энтропии, связанными с перестройкой конформации G-актина, но и изменением энергии, обусловленным перемещением воды в местах контакта субъединиц. Реакция связывания в этих местах обычно включает выраженные гидрофобные взаимодействия. При этих взаимодействиях изменяется энтропия, поэтому величина энтропии полимеризации может служить по меньшей мере грубым показателем роли гидрофобных взаимодействий в поддержании полимерного состояния актина. Интересно, что у холоднокровных животных полимеризация актина протекает с небольшими изменениями энтропии. Это может отражать меньшую роль гидрофобных взаимодействий в области контакта субъединиц. Такая особенность, очевидно, носит приспособительный характер, так как при низкой температуре гидрофобные взаимодействия дестабилизируются. Относительный вклад изменений конформации G-актина и перемещений воды в области контакта субъединиц в общие изменения энергии при полимеризации актина пока не установлен.

### Влияние температуры на липиды

*Общие соображения.* Рассматривая влияние температуры на белки, мы пришли к важному выводу: для того чтобы могли происходить изменения конформации (или агрегации субъединиц), необходимые для катализа и его регулирования, белок должен быть «полустабильным». Установлено, что такая «полустабильность» характерна и для мембранных систем, основу которых составляют липиды. Для многих подобных систем характерно «жидкокристаллическое» состояние — своеобразное равновесие между крайней текучестью и жесткой гелеподобной структурой. Здесь мы рассмотрим биологическое значение такого «гомеостаза вязкости» («homeoviscous adaptation», Sinensky, 1974), а также механизмы, благодаря которым он поддерживается.

При анализе влияния температуры на липиды необходимо прежде всего выяснить, из каких компонентов состоят липидные системы. Некоторые липиды представлены на рис. 11-20. Поскольку мы будем здесь рассматривать главным образом мембраны, особое значение для нас будут иметь фосфолипиды. Эти вещества образованы молекулой глицерола, к двум спиртовым группам которой присоединены две молекулы жирных кислот, а к третьей — сильно полярная группировка. Таким образом, фосфолипиды представляют собой амфифильные вещества: полярная группировка у них обращена к водной фазе, а неполярные гидрофобные радикалы жирных кислот — в противоположную сторону. Благодаря такой амфифильности фосфолипиды





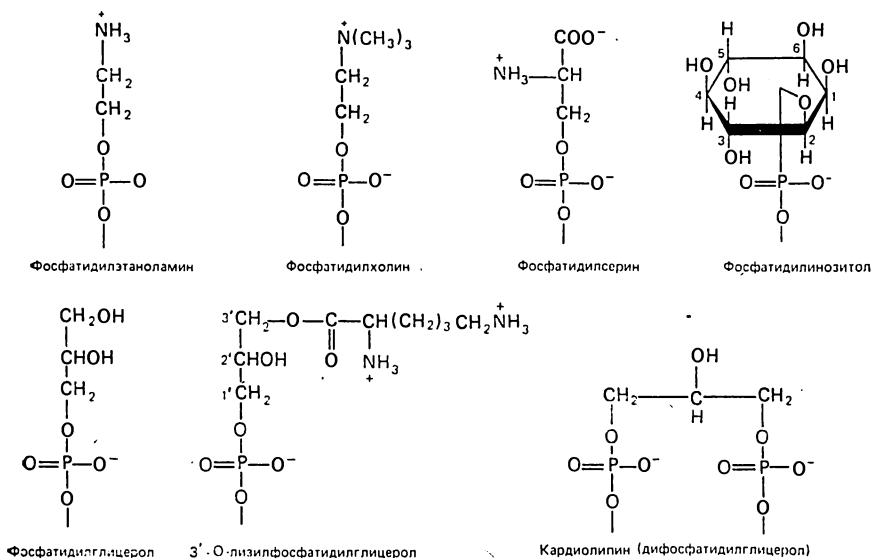


Рис. 11-20. Некоторые из наиболее распространенных липидов биологических мембран. Видно влияние двойных связей на конфигурацию цепей жирных кислот (например, олеиновой и линолевой).

хорошо приспособлены для образования двуслойной мембраны (рис. 11-21). Что касается мембранных белков, то они могут быть расположены на полярной поверхности мембраны («периферические» белки) либо частично или полностью погружены в ее внутренние неполярные слои («интегральные» белки).

Текучесть мембраны определяется рядом физических и химических факторов. Из данных, приведенных в табл. 11-9, видно, что температура плавления жирных кислот различна в зависимости от длины углеродной цепи и числа двойных связей; она ниже у кислот с короткими цепями и существенно понижается с увеличением числа двойных связей. Механизм влияния последних виден из рис. 11-20: двойные связи в *цис*-положении вызывают образование изгибов в цепях, и в результате цепи не могут тесно соприкасаться на всем своем протяжении. Это приводит к уменьшению энергии стабилизации, обусловленной вандерваальсовыми силами. На текучесть мембраны влияет также содержание в ней холестерина и ионный состав окружающей жидкой среды. Кроме того, состояние мембраны существенно зависит от температуры и гидростатического давления. Таким образом, в центре нашего внимания будет совместное влияние различных химических и физических факторов на текучесть мембраны.

*Гомеостаз вязкости: основные механизмы.* В дальнейшем мы рассмотрим различные функциональные сдвиги, происходящие при изменении текучести мембраны; а пока читателю достаточно лишь помнить о том, что поддержание текучести (или вязкости) на определенном уровне может иметь решающее значение для целого ряда функций мембраны, в том числе ферментативного катализа, транспорта ионов и синаптической передачи. Сначала мы рассмотрим, каким образом достигается такой «гомеостаз

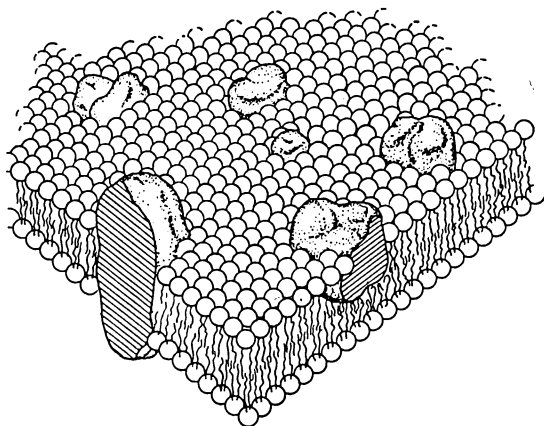


Рис. 11-21. Жидкомозаичная модель биологической мембраны. Показано различное расположение мембранных белков: внутри мембраны (интегральные белки) или на поверхности фосфолипидного бислоя. (По Singer, Nicholson, 1972; Copyright 1972 by the American Association for the Advancement of Science.)

вязкости», а затем подробно разберемся в некоторых последствиях работы этого важного адаптивного механизма.

Основную стратегию адаптации легко понять, исходя из сведений, приведенных в табл. 11-9. Для того чтобы при снижении температуры мембрана не затвердевала, она должна содержать достаточное количество ненасыщенных липидов; увеличение числа двойных связей приводит к понижению температуры, при которой жидкость превращается в гель. Такой способ сохранения текучего состояния мембраны был обнаружен у бактерий, растений и животных (обзоры: White, Somero, 1982; Hazel, 1984). В табл. 11-10 приведены показатели насыщенности различных фосфолипидов в синапсомных мембранах мозга некоторых животных, приспособленных к различным температурам, а также одного вида после акклимации к разным температурным условиям. Обратите внимание на сходство между внутривидовыми и межвидовыми различиями: эти различия од-

нотипны как при сравнении разных видов, обитающих в холодной и в теплой среде (таких, как крючкорог и *Cyprinodon*), так и между особями одного вида (золотая рыбка), акклиматизированными к разной температуре. Сходные результаты были получены при исследовании не только синапсомных мембран мозга, но и других мембранных систем, например митохондрий (Caldwell, Vernberg, 1970), различных мембран инфузории *Tet-*

Таблица 11-9. Строение и температура плавления наиболее распространенных жирных кислот. (По Lehninger, 1975)

Обозначение	Структура	Общепринятое название	Температура плавления, °C
<b>Насыщенные жирные кислоты</b>			
12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Лауриновая	44,2
14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Миристиновая	53,9
16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Пальмитиновая	63,1
18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Стеариновая	69,6
20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Арахидиновая	76,5
<b>Ненасыщенные жирные кислоты</b>			
16 : 1 <sup>9</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Пальмолениновая	-0,5
18 : 1 <sup>9</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Олеиновая	13,4
18 : 2 <sup>9,12</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Линолевая	-5,0
18 : 3 <sup>9,12,15</sup>	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Линоленовая	-11,0
20 : 4 <sup>5,8,11,14</sup>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Арахидоновая	-49,5

*rahymena pyriformis* (Kasai et al., 1976) и тилакоидных мембран хлоропластов (Raison et al., 1982). Таким образом, гомеостаз вязкости, по-видимому, свойствен всем биологическим мембранам.

Для поддержания нужной вязкости мембраны путем изменения характера жирных кислот, входящих в состав полярных липидов (например, фосфолипидов), необходим целый ряд механизмов, регулирующих синтез этих кислот и включение их в липиды. Механизмы эти у разных животных различны. У некоторых из них вязкость мембран, по-видимому, регулируется главным образом путем изменения числа двойных связей в молекулах жирных кислот. У других животных изменяются типы жирных кислот, включающихся в молекулы фосфолипидов во время их синтеза. Существуют также животные, у которых

главным механизмом, регулирующим вязкость мембран, служит активация или инактивация ферментов-десатураз. Этот последний механизм — быстрое изменение активности десатураз в соответствии с температурными условиями — заслуживает особого внимания: здесь можно увидеть, каким образом прямое воздействие температуры на ферменты может приводить к важным адаптивным сдвигам.

Известны два типа влияния температуры на десатуразные системы. У бактерий *Bacillus megaterium* десатураза, действующая при низкой температуре, быстро денатурируется при повы-

Таблица 11-10. Содержание жирных кислот в фосфоглицеридах синапсом из мозга животных, акклиматизированных или постоянно адаптированных к разным температурам. (Cossins, Prosser, 1978)

	Тип фосфоглицеридов	Крюч-корог	Золотая рыба		<i>Cyprinodon</i>	Крыса
		0°C	5°C	25°C	34°C	37°C
Отношение насыщенных жирных кислот к ненасыщенным	Холинфосфатиды	0,593	0,659	0,817	0,990	1,218
	Этаноламинфосфатиды	0,260	0,340	0,506	0,568	0,651
	Серинфосфатиды/инозитолфосфатиды	0,477	0,459	0,633	0,616	0,664

шении температуры (Fujii, Fulco, 1977). Таким образом, благодаря термоллабильности фермента обеспечивается инактивация его при высокой температуре, когда десатуразная активность была бы нежелательной для клетки. При снижении температуры происходит быстрая индукция десатуразы.

Второй механизм регуляции десатуразной активности был описан у *Tetrahymena pyriformis* (Kasai et al., 1976; Kitajima, Thompson, 1977). Авторы полагают, что при изменениях температуры меняется локализация десатуразы в мембране и это приводит к изменению ее активности. При снижении температуры эндоплазматический ретикулум переходит из текучего состояния в гелеобразное, и в результате десатураза, обычно скрытая в глубине липидного бислоя, где она неактивна, «выталкивается» на поверхность этого бислоя в водную фазу клетки (цитозоль). Становится возможным контакт десатуразы с субстратами и кофакторами, и фермент активируется. В результате начинают образовываться ненасыщенные липиды, которые включаются в различные мембранные системы клетки, и текучесть мембран восстанавливается. Интересно, что эндоплазматический ретикулум возвращается в прежнее состояние

не так быстро, как периферические мембраны (например, мембраны пелликулы). Это имеет большое значение: если бы в первую очередь происходила перестройка липидов ретикулума, то десатураза снова погружалась бы в его мембраны, ставшие теперь текучими, и переставала действовать, так и не успев

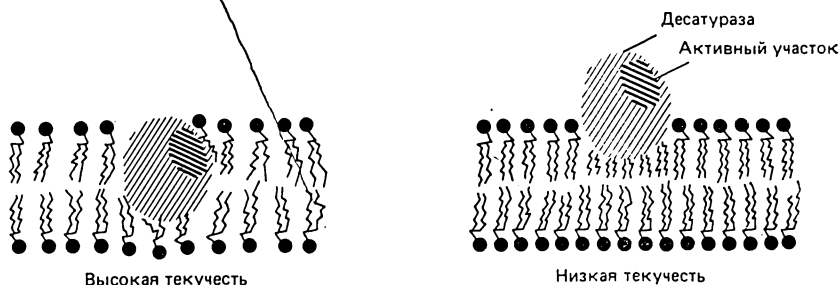


Рис. 11-22. Модель регуляции активности десатуразы в мембране эндоплазматического ретикулума *Tetrahymena*. Регуляция осуществляется благодаря изменениям текучести мембраны. При большой текучести (высокая температура, большое содержание ненасыщенных жирных кислот) десатураза погружена в липидный бислой. Когда же текучесть мембраны уменьшается (низкая температура, высокое содержание насыщенных жирных кислот), десатураза «выталкивается» из бислоя в окружающий раствор. Высвободившись, фермент может катализировать десатурацию жирных кислот, а погруженный в мембрану — неактивен. Эту гипотетическую модель предложили Kasai et al., (1976) и Kitajima, Thompson (1977).

изменить липидный состав других клеточных мембран. Механизм регуляции активности десатуразы у *Tetrahymena* схематически показан на рис. 11-22.

### Функциональное значение гомеостаза вязкости

1. *Поведенческие функции.* К биологическим мембранам, способным играть важную роль в реакциях животных на температуру, относятся мембраны нервных клеток (например, синаптические). В работе Коссинса и др. (Cossins et al., 1977) (рис. 11-23) было показано, что изменения состава жирных кислот в фосфолипидах синапсом при акклимации тесно коррелируют с поведенческими изменениями. В качестве показателя вязкости мембран использовалась поляризация флуоресцирующей метки, введенной в липиды синапсом. Степень поляризации такой метки тем меньше, чем выше текучесть липидной фазы. Это обусловлено большей свободой передвижения метки в жидкой среде. Известно, что показатель поляризации в значительной мере зависит от состава жирных кислот в фосфолипидах мембраны (Cossins, Prosser, 1978).

В экспериментах Коссинса и его сотрудников температуру акклимации золотой рыбки меняли от 5 до 25°C и обратно. Измеряли текучесть мембран (по поляризации) и регистрировали изменения температур, при которых наблюдались холодное оцепенение, утрата равновесия и повышенная возбудимость,

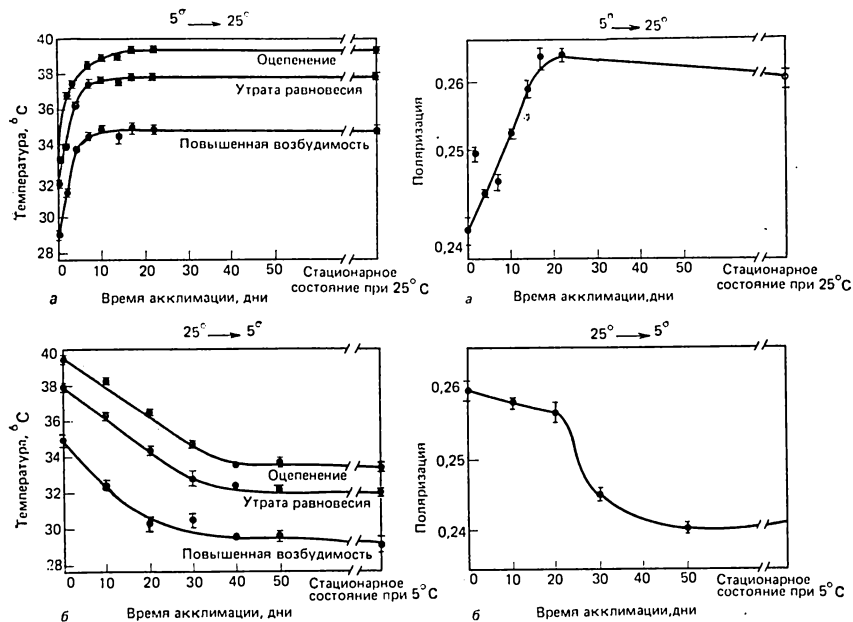


Рис. 11-23. Временной ход акклимационных изменений температурных порогов для трех поведенческих реакций (холодового оцепенения, потери равновесия и повышенной возбудимости) и текучести липидов синапсом (измеряемой по уровню поляризации) у золотой рыбки. В одних опытах особей акклимировали к 25°C, а затем переносили в среду с температурой 5°C, в других — наоборот. (Cossins et al., 1977.)

по мере акклимации. В этой работе был получен ряд важных результатов. Во-первых, изменения текучести липидов и поведенческих особенностей развивались параллельно. Это указывает на возможную причинную связь между изменениями синаптических мембран и поведенческих реакций. Во-вторых, холодовая (5°C) и тепловая (25°C) акклимация развивалась во времени по-разному: адаптация к 25°C достигалась быстрее. В-третьих, независимо от температуры акклимации время, необходимое для перестройки мембраны, было значительно больше того времени, которое, вероятно, требуется для изменения активности десатураз и для синтеза фосфолипидов, соответствующих температуре акклимации. Тот факт, что для полной

акклимации нужно было от 2 до 6 недель, позволяет предполагать, что лимитирующим процессом в гомеостазе вязкости у данных многоклеточных животных является не синтез новых фосфолипидов [который, по крайней мере у одноклеточных (см. выше), происходит очень быстро], а обновление компонентов мембран. Это обновление, особенно при 5°C, может идти настолько медленно, что даже выработка новых фосфолипидов не обеспечивает быструю адаптацию мембранных структур.

2. *Фотосинтез.* Корреляция между изменениями свойств мембранных липидов и функциональной активностью мембран известна не только у животных, но и у растений. Важнейшими структурами, определяющими температурный оптимум и температурные пределы реакций фотосинтеза у растений, могут быть тилакоидные мембраны хлоропластов — участки, где происходят многие процессы переноса энергии, связанные с поглощением света и фиксацией CO<sub>2</sub>.

Потенциальная эффективность и температурные пределы процессов фотосинтеза у зеленых растений компенсаторным образом меняются при изменении температуры. В этом отношении фотосинтез сходен с дыханием животных (см. рис. 11-5). Такие компенсаторные изменения могут происходить как в эволюционном масштабе, так и во время акклимации (рис. 11-24). Изменения фотосинтеза при адаптации к температуре могут быть связаны с двумя важными типами приспособительных механизмов. Как уже говорилось, повышение способности к фотосинтезу у растений, адаптированных (акклимированных) к холоду, особенно при низких температурах, связано, по-видимому, с повышением концентраций одного или нескольких ферментов цикла Кальвина — Бенсона. Что касается повышенной устойчивости к теплу, то она, вероятно, обусловлена адаптивным изменением вязкости липидов (Raison et al., 1980; Pike, Berry, 1980). Главный результат этого изменения — стабилизация взаимодействий между компонентами тилакоидных мембран, ответственными за поглощение света и перенос энергии. Дело в том, что тепловое повреждение этих мембран приводит к «короткому замыканию» в системе фотосинтеза из-за дезорганизации процессов переноса энергии в хлоропластах. В частности, при этом блокируется перенос энергии от хлорофилла *b* к хлорофиллу *a* и изменяется распределение энергии возбуждения между фотосистемами II и I (Armond et al., 1978). Нарушение взаимодействий между пигмент-белковыми комплексами хлоропластов можно проследить, измеряя флуоресценцию хлорофилла (см. Raison et al., 1980, p. 270). Свободный хлорофилл в растворе флуоресцирует очень сильно; в интактных же хлоропластах его флуоресценция значительно подавляется, так как энергия возбуждения улавливается реакционными центрами. Таким образом, усиление флуо-

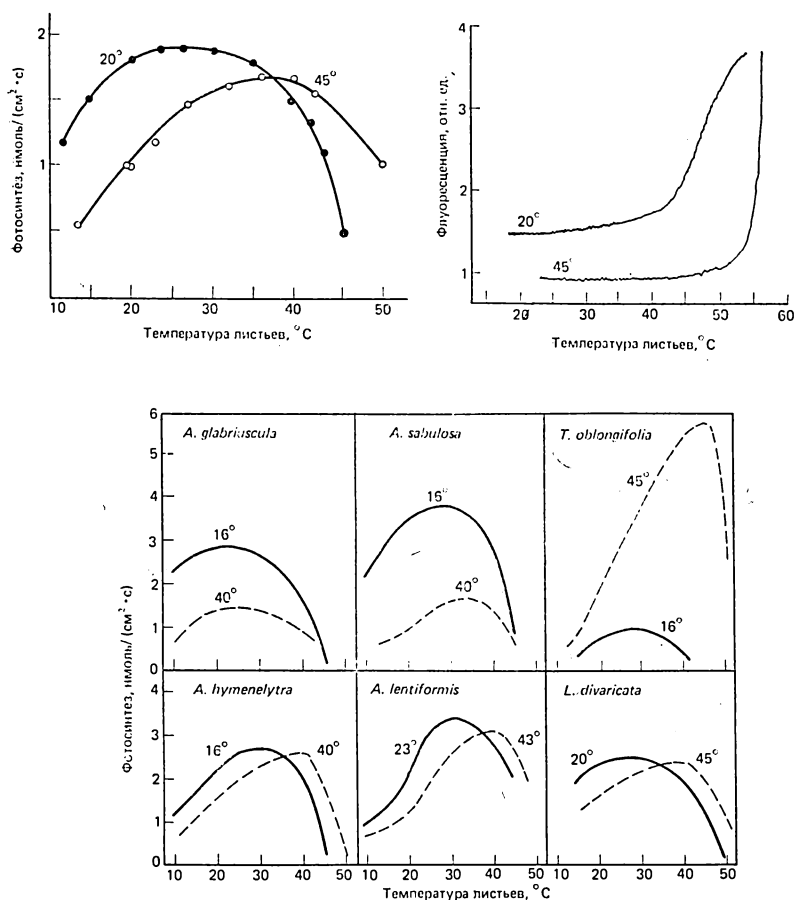


Рис. 11-24. Влияние температуры выращивания и температуры во время эксперимента на интенсивность фотосинтеза (в наномолях углекислоты, фиксированной на 1 см<sup>2</sup> поверхности листа в 1 с) у ряда растений, адаптированных к различным температурам. *Вверху слева*: зависимость поглощения CO<sub>2</sub> от температуры (при достаточной, т. е. не лимитирующей, освещенности) у олеандров *Nerium oleander*, выращенных при различных температурных режимах (20°C днем, 15°C ночью; 45°C днем, 32°C ночью). (Bjorkman et al., 1980.) *Вверху справа*: зависимость флуоресценции хлорофилла (в относительных единицах) в целых листьях *N. oleander* от температуры. (Raison et al., 1980.) *Внизу*: влияние температуры выращивания на скорость и температурную зависимость поглощения CO<sub>2</sub> (при достаточной освещенности) у шести растений из районов с различной температурой. Приведены температуры выращивания (акклимации) для различных видов. *Atriplex glabriuscula* и *A. sabulosa* встречаются на побережье Калифорнии; эти растения не могут акклиматизироваться к дневной температуре 40°C. Хотя при выращивании при 40°C температурный оптимум для фотосинтеза у них смещается вверх, фотосинтез у них, в отличие от термофильного растения *Tidestromia oblongifolia*, не увеличивается. *T. oblongifolia*, напротив, не может акклиматизироваться к холоду. Два вечнозеленых растения из Долины смерти — *Zarrea divaricata* (крезотовый куст) и *Atriplex len-*



ресценции хлорофилла при повышении температуры указывает на повреждение системы тилакоидных мембран (рис. 11-24) и тесно коррелирует со снижением интенсивности фотосинтеза, измеряемой по квантовому выходу. Растения пустынь (например, *Tidestromia oblongifolia*) отличаются высокой устойчивостью фотосинтеза к теплу и термостабильностью тилакоидных мембран (рис. 11-24). Изменения липидов, лежащие в основе этих адаптаций, по-видимому, сходны с наблюдаемыми у животных, адаптированных (акклимированных) к разным температурам: у видов или популяций растений, переносящих более высокую температуру, повышено содержание насыщенных жирных кислот в фосфолипидах и галактолипидах (Raison et al., 1982).

3. *Энергия активации ферментативных реакций, протекающих на мембранах.* Функционирование отдельных ферментов, связанных с мембраной, часто сильно зависит от локальной вязкости их микроокружения. В этом отношении такие ферменты сходны с белковыми и белково-пигментными комплексами, функции которых изменяются при изменениях текучести липидов. На рис. 11-25 схематически представлено влияние изменений температуры и соответствующей адаптации на термодинамические параметры активации фермента, связанного с мембраной, — активируемой ионами АТРаза. При определенной «переломной» температуре наклон кривой Аррениуса (эта кривая связывает логарифм скорости реакции с абсолютной температурой) резко меняется. При температурах ниже точки «перелома» энтальпия активации намного выше, чем при более высоких температурах. В то же время с повышением энтальпии активации возрастает и энтропия активации (рис. 11-25, *вверху*). В связи с этим чистый прирост свободной энергии активации невелик по сравнению с изменениями энтальпии, но уже достаточен для того, чтобы реакция замедлилась.

В основе всех этих температурных изменений параметров активации, вероятно, лежит тот факт, что ферментный белок должен быть «подвижным», т. е. иметь возможность изменять свою конформацию или перемещаться в пределах мембраны во время катализа; а для этого нужно, чтобы могли перемещаться и окружающие молекулы липидов. Если липидная фаза доста-

---

*tiformis* — сохраняют свою активность в течение всего года, и фотосинтез у них может протекать с высокой интенсивностью в очень широком температурном диапазоне. Видно, что температурный оптимум у них смещается в зависимости от температуры акклимации. *Atriplex hymenelytra* — высокоэвритермное растение, встречающееся в прибрежных и пустынных зонах, — тоже отличается большой способностью к акклимации и тем, что фотосинтез у него возможен в широком диапазоне температур. (По Bjorkman et al., 1980, с изменениями.)

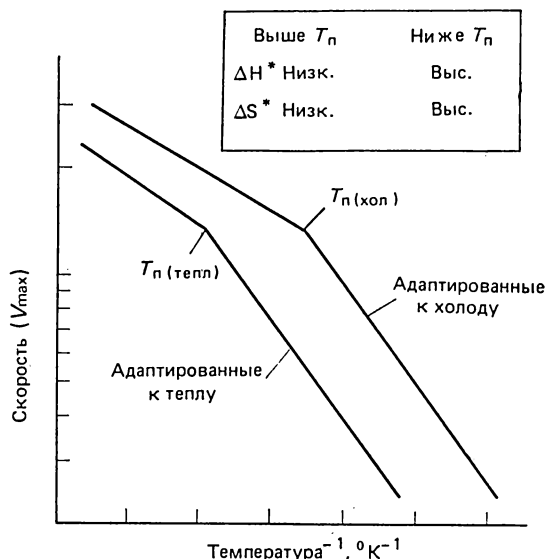


Рис. 11-25. Кривые Аррениуса (зависимость  $\lg V_{\max}$  от величины, обратной абсолютной температуре) для ионозависимой мембранной АТФазы организмов, адаптированных (акклимированных) к теплу или к холоду. В процессе адаптации (акклимации) происходит сдвиг температуры «перелома» кривых ( $T_n$ ). Этот сдвиг связан с изменениями состава липидов (например, их насыщенности). Такие изменения характеризуются высококомпенсаторным характером отношения энтальпии к энтропии. При температуре ниже точки перелома довольно высоки значения как энтальпии активации ( $\Delta H^*$ ), так и энтропии активации ( $\Delta S^*$ ). Если же температура выше  $T_n$ , то оба этих параметра характеризуются низкими значениями. Такие компенсаторные изменения  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  отражают локальную дезорганизацию липидов, окружающих фермент во время катализа. (Эта модель основана на данных G. Inesi, M. Millman, S. Eletr, J. Mol. Biol., 81, 483—504.)

точно текуча, передвижения фермента требуют небольших затрат энергии; если же вязкость липидов велика, то необходимо их локальное «расплавление». Для этого требуется значительная дополнительная энтальпия, и, кроме того, заметно возрастает энтропия системы (ясно, что в жидком состоянии липидная фаза менее упорядоченна, чем в твердом). Благодаря гомеостазу вязкости температура плавления фосфолипидов мембраны может устанавливаться на таком уровне, при котором легко поддерживать необходимую текучесть среды, окружающей ферменты, в физиологическом диапазоне температур. Действительно, есть данные (см. Hazel, 1972; Vik, Capaldi, 1977) о том, что липопротеиновые ферменты [для полной активности которых необходимы и белковый (каталитический), и липидный компоненты] наиболее эффективны в том случае, если белковый ком-

понент связан с высокотекучим липидным компонентом. Такую связь между текучестью липида и каталитической эффективностью можно объяснить тем, что при низкой температуре плавления липидов, окружающих белок, низким будет и энергетический барьер для передвижений белка во время катализа. Следует, однако, помнить, что текучесть не должна быть чрезмерной. Среда с высокой текучестью способствует большей каталитической эффективности ферментов, связанных с мембранами, однако в слишком жидком липидном бислое может происходить дезинтеграция многокомпонентных систем (об этом мы уже говорили, когда речь шла о тилакоидных мембранах).

4. Кожный воск и терморегуляция. До сих пор, рассматривая фазовые переходы липидов при температурных сдвигах, мы касались лишь неблагоприятных последствий изменения их текучести при крайних температурах. Однако на примере влияния температуры и pH на ассоциацию субъединиц фосфофруктокиназы у зимнеспящих животных мы видели, что механизм, оказывающий в одних условиях нежелательное действие, в других может быть очень полезным. Такого рода двойственные эффекты, связанные с фазовыми переходами липидов, участвуют в поддержании водного баланса и в терморегуляции у аргентинской древесной лягушки *Phyllomedusa sauvagei* (McClanahan et al., 1978). Эта лягушка может переносить высокие температуры (летом — выше 40 °C), так как ее кожные железы вырабатывают особое липидное вещество, смазывающее кожу и препятствующее таким образом потере воды. В пределах до 35 °C температура тела лягушки соответствует температуре окружающей среды. Кожный воск при этом находится в гелеобразном состоянии и очень плохо пропускает воду. Но, когда внешняя температура достигает 34—38 °C, кожный воск начинает плавиться (рис 11-26). Создается некий «компромисс» между необходимостью сохранять воду и терморегуляцией. При переходе воска в жидкое состояние его способность задерживать воду резко падает. В результате вода испаряется с поверхности тела (лягушка как бы «потеет»), и благодаря этому даже при внешней температуре до 40—41 °C (что очень близко к верхнему пределу выживания данного вида) температура тела удерживается на уровне 36—37 °C. Таким образом, в этом случае плавление смеси липидов при определенной температуре биологически целесообразно, так как способствует терморегуляции.

### Резистентность и толерантность к замораживанию

Многим живым организмам приходится заботиться не только о физическом состоянии липидных систем, но и о состоянии внеклеточной и внутриклеточной жидкости. К таким организмам

относятся многие виды, обитающие в холодных областях, где эта проблема имеет жизненно важное значение в течение всего года или значительной его части. Образование льда внутри клеток, как правило, приводит к их гибели. Известно, правда, что современные методы криоконсервации позволяют долго хранить замороженные клетки и ткани (Ashwood-Smith, Farrant, 1980), но для этого требуются особые условия (например, высокие концентрации криопротекторов, таких как диметилсульф-

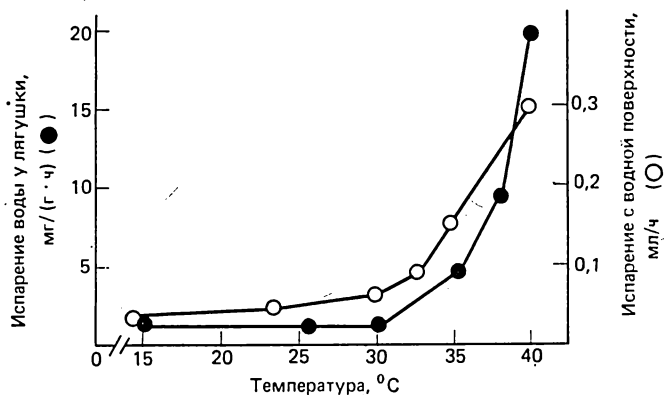


Рис. 11-26. Влияние температуры на испарение воды у лягушки *Phyllomedusa sauvagei* (темные кружки) и с водной поверхности, покрытой пленкой липидов из кожного секрета этого животного (светлые кружки). (По данным McClapahan et al., 1978, *Physiological Zoology*, 51, 179—187; С разрешения Univ. of Chicago Press, Copyright 1978 by the Univ. of Chicago.)

оксид), которые в природе невозможны. Большинство живых существ погибает даже тогда, когда лёд образуется только во внеклеточном пространстве, хотя существуют удивительные примеры видов, переносящих замерзание внеклеточных жидкостей. Однако у животных, подвергающихся опасности заморозания, обычно имеются особые механизмы, предотвращающие образование льда во всех компартментах тела. В настоящем разделе речь будет идти в основном об использовании особых макромолекул — биологических антифризов, которые тормозят образование льда и повышают резистентность к замораживанию у различных рыб и беспозвоночных.

У живых существ, не обладающих резистентностью или толерантностью к замораживанию, выбор стратегии приспособления к температурам ниже точек замерзания жидкостей организма зависит от нескольких факторов. Иногда важно бывает и при низких температурах сохранять активность. Если же какие-то экологические факторы (например, отсутствие пищи)

делают целесообразной зимнюю спячку, то внеклеточные жидкости организма должны претерпевать такие изменения, при которых облегчается образование льда при температурах, близких к температуре замерзания крови или гемолимфы. Тем самым в значительной степени предупреждается переохлаждение. Таких животных называют *толерантными к замерзанию*, так как они могут переносить образование льда во внеклеточной (но не внутриклеточной) жидкости. У этих животных часто вырабатываются специальные вещества, служащие центрами образования кристаллов льда при относительно высоких температурах (см. Zachariassen, 1980). Может показаться, что такой механизм никак нельзя считать адаптацией: образование льда во внеклеточной жидкости с последующим выходом значительной части воды из клеток на первый взгляд представляется невыгодным для организма. Долго полагали, что обезвоживание клеток, приводящее к повышению концентрации неорганических ионов и деформации внутриклеточных структур, служит главной причиной гибели при низких температурах. Однако на самом деле вещества, служащие центрами кристаллообразования и способствующие тем самым замерзанию при сравнительно высоких температурах, препятствуют переохлаждению, и в результате лед образуется во внеклеточной жидкости при температуре выше той, при которой может происходить спонтанное замерзание внутриклеточной среды. Возможно, при этом все же возникают нежелательные эффекты дегидратации, хотя переносимость обезвоживания у толерантных к замерзанию животных очень высока (Kanwisher, 1955; Murphy, Pierce, 1975). Однако главное — то, что внутри клеток лед не образуется, и это может играть решающую роль в толерантности к замерзанию. Опасность повреждения клеток при образовании в них льда гораздо серьезнее, чем нежелательные эффекты дегидратации.

Вторую важнейшую стратегию адаптации используют виды, *резистентные к замерзанию*. У них есть особые биохимические механизмы, которые препятствуют образованию льда как во внутриклеточной, так и во внеклеточной жидкости. Во многих случаях такие животные активны даже при температурах ниже точки замерзания. Ясно, что активность и замерзание внеклеточной среды с обезвоживанием внутриклеточной — вещи несовместимые. Яркие примеры резистентности к замерзанию можно найти у полярных рыб; пептидные и гликопептидные антифризы, содержащиеся в жидкостях тела этих рыб, позволяют им оставаться активными в морской воде с температурой  $-1,86^{\circ}\text{C}$  в присутствии льда (DeVries, 1980, 1982).

В то время как у многих рыб имеются биохимические механизмы защиты от замерзания, другие рыбы избегают замерзания путем сезонных миграций. Например, длиннорогий керчак

(*Myoxocephalus octodecemspinosus*) при наступлении зимних холодов и образовании льда мигрирует из прибрежных районов в более глубокие места и проводит там холодное время года. Такое поведение предохраняет рыбу от замерзания жидкостей организма в результате появления в них центров кристаллизации льда (у рыб, не обладающих антифризами, температура замерзания этих жидкостей больше чем на 1°C выше, чем у морской воды). Однако при миграции в более глубокие зоны керчаку приходится сталкиваться с уменьшением пищевых ресурсов и с новыми, непривычными для него хищниками. Таким образом, поведенческий способ защиты от замерзания связан с необходимостью проводить по меньшей мере часть года в местах с худшими экологическими условиями. Между тем для видов, обладающих антифризами, чрезмерно низкая температура перестает быть фактором, ограничивающим выбор местобитания.

*Примеры живых организмов, толерантных к замерзанию.* Прежде чем перейти к биохимии биологических антифризов, рассмотрим коротко некоторые организмы, толерантные к замерзанию. Такие организмы могут переносить образование льда во внеклеточной жидкости и часто даже обладают приспособлениями, способствующими этому процессу. Это, как правило, наземные животные, проводящие зиму в состоянии покоя. Известны многочисленные виды насекомых, у которых имеются особые вещества, индуцирующие образование льда и тем самым препятствующие переохлаждению гемолимфы (Duman, 1980; Zachariassen, 1980). Как уже говорилось, замерзание внеклеточной воды при сравнительно высокой температуре предотвращает более опасное замерзание цитозоля при дальнейшем понижении температуры.

Сходная адаптивная стратегия была описана недавно у *Lo-belia telekii*. Это растение встречается в африканских горах, где температура ночью в любое время года может опускаться до -10°C (Krog et al., 1979). В отличие от арктических жуков лобелия не может проводить недели или месяцы в состоянии покоя; днем, когда тепло, у нее должны активно протекать метаболические процессы и она должна расти, тогда как ночью ей необходима толерантность к замерзанию. Главной структурой, обеспечивающей суточную терморегуляцию, у *L. telekii* служит крупная полость с вязкой жидкостью, расположенная в ее соцветии. Эта жидкость выполняет по меньшей мере две функции, связанные с терморегуляцией. Во-первых, благодаря своей высокой теплоемкости и «температурной инерции» она может сглаживать действие перепадов внешней температуры. Во-вторых, в этой жидкости, как и в крови толерантных к замерзанию насекомых, содержится вещество, способствующее

образованию льда при температуре около 0°C. Это может быть выгодно в двух отношениях. Прежде всего, как и у толерантных к замерзанию животных, такое образование льда предупреждает переохлаждение и тем самым препятствует замерзанию внутриклеточной жидкости, которое могло бы произойти, если бы температура растения упала ниже 0°C. Кроме того, тепло, выделяющееся при образовании льда, может даже обогреть растение. Круг и др. (Krog et al., 1979) показали, что при ночном понижении внешней температуры примерно с 12°C до -8°C температура внутренних структур растения не падает ниже 0°C. Таким образом, скорость образования льда достаточна, чтобы помешать сильному охлаждению глубинных тканей. По подсчетам автора, в этих условиях замерзает лишь около 2% жидкости центральной полости, и поэтому остается вполне достаточный «тепловой резерв», способный обеспечить толерантность и к более низким температурам.

Трудно представить себе, чтобы сходные механизмы теплообразования могли эффективно действовать и в жидкостях тела животных. Относительные объемы жидкостей у *L. telekii* и животных существенно различаются. У мелких животных сохранение тепла связано с очевидными трудностями. Кроме того, как уже говорилось, наземные беспозвоночные, способные переносить образование льда во внеклеточной жидкости, обычно впадают в длительную зимнюю спячку.

Среди водных животных значительная толерантность к замерзанию встречается у обитателей литоральной зоны в высоких широтах. Например, Кануишер (Kanwisher, 1955) установил, что моллюски *Mytilus edulis* и *Littorina rudis* в северных областях Атлантического океана при снижении внешней температуры до -20°C могут переносить замерзание примерно 70% всей воды организма. Замерзала при этом только внеклеточная жидкость; хотя клетки под микроскопом выглядели сморщенными и деформированными, кристаллов льда в них не было (Kanwisher, 1955). В другой работе (Murphy, Pierce, 1975) изучалась способность литорального моллюска *Modiolus demissus demissus* акклиматизироваться к низким температурам путем повышения толерантности к замерзанию. Авторы показали, что такая акклимация сопровождалась значительным повышением способности животного переносить обезвоживание тканей. Особи, акклиматизированные к 23°C, погибали, когда вследствие образования льда во внеклеточном пространстве клетки теряли 35% воды, тогда как животные, акклиматизированные к 0°C, могли переносить потерю 41% клеточной воды. Из этих данных следует важный вывод: акклимация к низкой температуре связана не с уменьшением потери клетками воды при замерзании внеклеточной жидкости, а с повышением переносимости частичного

обезвоживания клеток. Молекулярные механизмы этого явления пока неизвестны. Тот факт, что у некоторых литоральных моллюсков определенную роль играют макромолекулярные антифризы (Theede et al., 1976), наводит на мысль, что эти вещества могут каким-то образом способствовать стабилизации биологических структур и функций при снижении активности воды. Сходное предположение было высказано и для объяснения устойчивости к обезвоживанию некоторых насекомых, например *Tenebrio molitor* (Patterson, Duman, 1979; Schneppenheim, Theede, 1980).

В связи с проблемой толерантности к замерзанию заслуживают внимания многоатомные спирты, такие как глицерол, сорбитол и маннитол. У многих толерантных или резистентных к замерзанию насекомых они могут накапливаться в высоких концентрациях. Эти вещества снижают температуру возможного переохлаждения раствора примерно в два раза больше, чем истинную точку замерзания, и поэтому могут играть большую роль в предотвращении образования льда. Однако многоатомные спирты обладают по меньшей мере двумя недостатками. Во-первых, в отличие от пептидных и гликопептидных антифризов (см. ниже) они действуют строго коллигативно и поэтому резко повышают осмотическую концентрацию жидкостей тела. Правда, если эти вещества равномерно распределяются во всех жидкостях организма, такое повышение может не создавать особых проблем, так как оно не будет приводить к перераспределению воды между разными компартментами. Во-вторых, многоатомные спирты значительно повышают вязкость биологических жидкостей; при использовании пептидных и гликопептидных антифризов подобных осложнений не возникает, так как они действуют неколлигативно.

Важная особенность многоатомных спиртов типа глицерола состоит в том, что у организмов, подвергающихся опасности замерзания или обезвоживания, они могут выполнять ряд различных функций. Например, глицерол может играть роль криопротектора, понижать предельную точку переохлаждения и, кроме того (Clegg, 1962), повышать резистентность к высушиванию цист *Artemia*. В главе 10 мы отмечали, что глицерол в растворе безвреден и не оказывает неблагоприятного воздействия на белки (в отличие от таких распространенных неорганических ионов, как  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  в повышенных концентрациях). Поэтому глицерол вполне целесообразно использовать в качестве растворенного вещества, когда активность воды снижена, например, при высокой осмолярности окружающей среды, при инцистировании, при переходе в состояние покоя или для создания толерантности к замерзанию. Следует, однако, помнить, что глицерол не является обязательным компонентом жидкостей тела у



толерантных и резистентных к замерзанию животных (Duman, 1980; Zachariassen, 1980). У таких животных обычно имеются и другие вещества, необходимые для выживания при низких температурах. К ним относятся пептидные и гликопептидные антифризы, найденные у многих рыб, обитающих в высоких широтах, а также у некоторых наземных беспозвоночных.

**Резистентность к замерзанию и высокомолекулярные антифризы.** Одним из самых интересных открытий в области молекулярной эволюции за последние два десятилетия было открытие макромолекулярных антифризов (пептидов и гликопептидов). Впервые такие вещества были найдены у личинок жука *Tenebrio molitor* (Ramsay, 1964) и в сыворотке крови антарктических рыб (обзоры: DeVries, 1980, 1982). В табл. 11-11 приведены данные о выявленных к настоящему времени антифризах — пептидах и гликопептидах. Видно, что эти вещества встречаются у представителей разных групп животных, весьма различны по химической структуре и молекулярной массе, а их концентрации могут варьировать в зависимости от акклимации и акклиматизации. Однако у всех этих антифризов есть одна общая особенность: в их присутствии температура замерзания раствора (т. е. температура, при которой растут кристаллы льда) становится ниже, чем температура таяния (при которой кристаллы льда уменьшаются). Именно по такому «температурному гистерезису» судят о наличии антифризов в растворах, и это явление служит важным ключом к пониманию механизмов действия антифризов (см. ниже). В дальнейшем мы убедимся в том, что, несмотря на все различия в первичной структуре антифризов, механизм их действия, по-видимому, во всех случаях един.

Гликопептидные и пептидные антифризы широко распространены у рыб, обитающих в высоких широтах в верхних слоях воды, где имеется лед (табл. 11-11). Если же у полярной рыбы антифриз отсутствует, то ей приходится отыскивать зоны, в которых нет льда, и многие из таких рыб, вероятно, в течение всей жизни остаются в переохлажденном состоянии (DeVries, 1980). Антифризы полярных рыб служат удивительным примером эволюционной конвергенции на молекулярном уровне. Гликопептиды и пептиды, обуславливающие температурный гистерезис, возникали в процессе эволюции независимо в разных группах животных. Так, например, у далеких друг от друга видов рыб появились антифризы со сходной первичной структурой (рис. 11-27). У антарктических нототениевых (например, у *Trematomus*) и у арктической рыбы *Gadus agac* (Van Voorhies et al., 1978) содержатся молекулы с одинаковым структурным элементом — повторяющимся трипептидом аланилаланилтреонином, к треониновому остатку которого присоединены углеводные

Таблица 11-11. Белковые и гликопротеиновые антифризы рыб и беспозвоночных

Животные	Тип антифриза	Мол. масса	Температурный гистерезис, °C <sup>1)</sup>	Источник данных
Антарктические рыбы <i>Nototheniidae</i> (например, <i>Pagothenia borchgrevinki</i> )	Гликопротеины	8 групп (2600—33 700)	1,27	DeVries, 1974
<i>Zoarctidae</i> ( <i>Rhigophila dearborni</i> )	»		0,76	DeVries, 1974
Арктические рыбы Камбала <i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Белки	3 группы	0,62 (зима)	Duman, DeVries, 1974, 1976 Van Voorhies et al., 1978
Треска <i>Gadus ogac</i>	Гликопротеины	7 групп (те же, что у антарктических <i>Nototheniidae</i> )	1,18	
Вахня <i>Eleginus gracilis</i>	Гликопротеины		1,0	Raymond et al., 1975
Керчак <i>Myoxocephalus verrucosus</i>	Белок		1,4	Raymond et al., 1975
Членистоногие Жук <i>Tenebrio molitor</i>	Белки	Несколько групп		Patterson, Duman, 1979; Schneppenheimer, Theede, 1980
Паук <i>Philodromus</i> sp.	»		2,44 (февраль) 0 (июнь)	Duman, 1979
Паук <i>Clubiona</i> sp.	»		1,88 (январь) 0 (акклимация к теплу)	Duman, 1979
Жук <i>Dendroides canadensis</i>	»		3,62 (акклимация к холоду)	Duman, 1980
Жук <i>Meracantha contracta</i>	»		3,71 (февраль)	Duman, 1977

<sup>1)</sup> Температурный гистерезис — разность между температурой плавления и температурой замерзания. Этот показатель измеряли у сыворотки крови животных, адаптированных к обычной для них температуре или акклиматизированных к разным температурам.

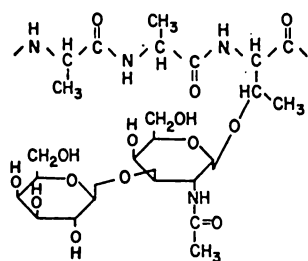
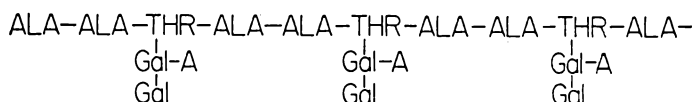
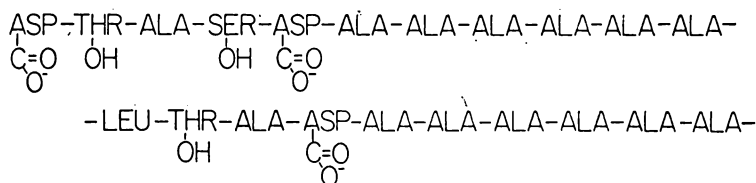
Антарктическая нототения (*D. mawsoni*)Камбала (*P. americanus*)

Рис. 11-27. Строение гликопептидных и пептидных антифризов полярных рыб. *Вверху*: основной повторяющийся элемент гликопептида, обладающего свойствами антифриза. В состав пептидной цепи входят только два вида аминокислот — аланин и треонин. С каждым остатком треонина соединен дисахарид β-D-галактопиранозил-(1→3)-2-ацетида-2-дезоксид-α-галактопираноза. *Внизу*: первичная структура гликопептидных антифризов антарктической рыбы *Dissostichus mawsoni* из сем. Nototheniidae (видно, что здесь тоже повторяется трипептид Ala-Ala-Thr), а также пептидного антифриза камбалы *Pseudopleuronectes americanus*. (DeVries, 1980.)

группировки. Пептидные антифризы арктического керчака *Myoxocephalus verrucosus* и камбалы *Pseudopleuronectes americanus* тоже, по-видимому, обладают сходной структурой. Антифризы с высоким содержанием цистеина были обнаружены у рыб (*Hemitrepterus americanus*; Slaughter et al., 1981) и насекомых (*Tenebrio molitor*; Schneppenheim, Theede, 1980). Таким образом, существуют, видимо, молекулы с разнообразной структурой, способные играть роль антифризов, и в процессе эволюции они вырабатывались независимо у разных рыб и беспозвоночных.

На рис. 11-27 показана структура антифризов двух различных типов. Сначала была расшифрована структура гликопептидных антифризов, и оказалось, что их аминокислотная после-

довательность обычно довольно проста. Они отличаются высоким содержанием аланина, а их углеводные компоненты присоединены к остаткам треонина. Основной повторяющийся элемент может встречаться в антифризах с различной молекулярной массой — от 2600 до 33 000 (DeVries, 1980). У самых низкомолекулярных гликопептидных антифризов некоторые остатки аланина заменены пролином.

На рис. 11-27 внизу представлен участок пептидного антифриза камбалы *P. americanus*. Главный компонент аминокислотной цепи здесь тоже аланин. Из других аминокислот в пептидных антифризах преобладают треонин и аспартат. Полярные или заряженные группировки треонина и аспартата образуют «фронт», возможно, облегчающий адсорбцию молекул на кристаллах льда (см. ниже); сходную роль в гликопептидных антифризах играют остатки галактозы и галактозамина.

Структура антифризов насекомых расшифрована не столь детально. Ни в одном из них не было обнаружено углеводных группировок; это означает, что все такие антифризы, вероятно, являются пептидами (Duman et al., 1982). По аминокислотному составу они существенно отличаются от антифризов рыб; например, обычно в антифризах насекомых невелико содержание аланина. В пептидном антифризе клопа *Oncopeltus fasciatus* много (30,5%) серина (Patterson et al., 1981). В других пептидных антифризах содержатся большие количества цистеина, и при обработке веществами, восстанавливающими дисульфидные мостики, они теряют свою активность (Duman et al., 1982). Пока неясно, каким образом вторичная структура, стабилизируемая S—S-мостиками, придает этим пептидам свойства антифризов.

*Механизмы действия антифризов.* Почему гликопептидные и пептидные антифризы с разным строением молекулы обладают одной общей характерной чертой — вызывают температурный гистерезис? Чем объясняется неколлигативное действие этих антифризов, т. е. их способность снижать температуру замерзания (роста кристаллов льда) в большей степени, чем можно было бы ожидать, исходя из общего количества частиц антифриза в растворе? Возможно, эти особенности антифризов обусловлены большим числом полярных или заряженных группировок в их молекулах (рис. 11-27). В гликопептидных антифризах ОН-группы углеводных остатков образуют сплошной правильный фронт: полагают, что они лежат в одной плоскости вдоль линейной молекулы антифриза (DeVries, 1980). В молекулах пептидных антифризов, богатых треонином и аспартатом, образуется такой же фронт полярных групп. По-видимому, расположение таких групп способствует сильному взаимодействию их с кристаллами льда (DeVries, 1980). В связи с этим было вы-

сказано предположение, согласно которому действие антифризов связано с тем, что они прочно адсорбируются на кристаллах льда и создают дополнительный термодинамический барьер для присоединения к этим кристаллам новых молекул воды (более подробное рассмотрение такой «блокады» роста кристаллов льда содержится в работе Raymond, DeVries, 1977).

В пользу такой гипотезы говорят данные многих экспериментов. Так, неколлагативные антифризы в отличие от коллагативных не отделяются из раствора по мере образования льда (Duman, DeVries, 1973). Это позволяет предполагать, что между кристаллами льда и антифризом существует сильное взаимодействие. Подтверждение этого было получено с помощью сканирующего электронного микроскопа (Raymond, DeVries, 1977): оказалось, что антифризы действительно адсорбируются на кристаллах льда и подавляют их рост. Температурный гистерезис, наблюдаемый при замерзании и таянии растворов с молекулами антифриза, тоже свидетельствует о необычном взаимодействии между льдом и этими молекулами. Снижение температуры замерзания у раствора с антифризом может быть связано с подавлением дальнейшего роста мелких кристаллов льда в результате адсорбции антифриза на их поверхности. Но если лед уже образовался, то температура его таяния будет такой же, как и в обычных условиях. Роль полярных групп в действии антифризов была подтверждена в опытах с химической модификацией молекул (например, блокадой гидроксильных групп в остатках галактозы с помощью боргидрида натрия; DeVries, 1980). Блокирование таких групп, вероятно, препятствовало образованию водородных связей между антифризом и льдом, и в результате антифриз терял способность адсорбироваться на кристаллах льда и подавлять их рост.

Важно отметить, что необычная способность пептидных и гликопептидных антифризов взаимодействовать со льдом еще не означает, что такие антифризы могут необычным образом взаимодействовать и с жидкой водой (см. DeVries, 1980). Антифризы связывают такое же количество воды, как и белки сходных размеров, не вызывающие температурного гистерезиса. Антифризы могут связывать лишь около 1% всей воды сыворотки крови (DeVries, 1980), и это незначительное количество не может играть существенной роли в снижении точки замерзания под действием гликопептидных и пептидных антифризов.

*Действие антифризов in vitro и in situ.* Для выяснения механизма действия антифризов, разумеется, проводились исследования *in vitro*. Тщательное изучение роста кристаллов льда *in vitro* может привести нас к неверной мысли о том, что аналогичные процессы происходят и в жидкостях тела животных, обладающих антифризами. На самом же деле у большинства

резистентных к замерзанию животных (в частности, антарктических рыб, постоянно живущих при  $-1,86^{\circ}\text{C}$ ; DeVries, 1980) лед в организме не должен образовываться вовсе. Дело в том, что хотя антифризы этих рыб и способны препятствовать росту кристаллов льда в крови или цитозоле, ликвидировать эти кристаллы, если они уже образовались, не представляется возможным: в организме антарктических рыб никогда не бывает таких температур, при которых происходило бы таяние замерзших жидкостей с антифризами (примерно  $-1^{\circ}\text{C}$ ).

Все эти соображения заставили предположить, что роль антифризов *in situ* состоит в том, чтобы препятствовать проникновению кристаллов льда внутрь через поверхности, контактирующие с внешней средой (DeVries, 1980). У рыб, например, наиболее велика вероятность проникновения льда через жабры, так как здесь нет защитного покрова в виде чешуй или слизи. Молекулы антифриза, содержащиеся в жаберных мембранах и циркулирующих жидкостях, могут играть решающую роль в предупреждении перехода микроскопических кристалликов льда из морской воды в организм. Сообщалось (Schneppenheim, Theede, 1979), что в наружных покровах рыбы *Myoxocephalus scorpius* содержатся пептидные антифризы; это подкрепляет гипотезу о том, что одна из функций таких антифризов (возможно, главная функция) состоит в «периферической защите» от проникновения кристаллов льда в организм.

*Роль антифризов, веществ, способствующих образованию льда, и многоатомных спиртов у насекомых.* В отличие от полярных рыб, у которых каждому виду свойственны антифризы лишь одного химического класса (хотя и разной молекулярной массы), у некоторых насекомых имеется целый ряд веществ, способствующих резистентности или толерантности к замерзанию. К таким веществам относятся пептидные антифризы, снижающие точку замерзания, вещества, иницирующие образование кристаллов льда, и такие криопротекторы, как глицерол. Каким же образом взаимодействие всех этих веществ предотвращает образование льда или позволяет насекомому переносить замерзание внеклеточных жидкостей?

Дьюмен (Duman, 1980) рассмотрел различные функции, которые могут выполнять эти три группы веществ. Совершенно ясно, что вещества, способствующие образованию льда, играют лишь одну роль — они препятствуют чрезмерному переохлаждению, которое могло бы привести к спонтанному образованию льда внутри клеток. Роль многоатомных спиртов, несмотря на многолетние исследования, остается до конца не выясненной. Они могут либо способствовать переохлаждению, либо играть роль криопротекторов, либо увеличивать резистентность к обезвоживанию. Пептидные антифризы тоже могут выполнять раз-

личные функции. Например, пептидные антифризы, содержащиеся в гемолимфе жука *Dendroides canadensis*, могут препятствовать образованию льда до тех пор, пока поздней осенью не выработается толерантность к замерзанию. Кроме того, эти пептиды могут играть роль веществ, способствующих переохлаждению (Duman et al., 1982). Не ясно, какую роль могут играть антифризы у жуков, у которых эта толерантность уже выработалась; однако именно тогда, когда она наиболее высока, содержание пептидных антифризов в их организме тоже достигает максимума. По мнению Дьюмена, в таких условиях антифризы могут играть роль криопротекторов, но эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

*Регуляция синтеза и расщепления антифризов.* Содержание пептидных и гликопротеиновых антифризов в жидкостях организма может быть сравнительно высоким [в сыворотке антарктических рыб оно составляет около 3% (вес/объем); DeVries, 1980], и для их биосинтеза, по-видимому, нужны значительные затраты энергии. В связи с этим не удивительно, что у многих видов синтез антифризов может быть сезонным: он начинается осенью и прекращается весной. Антарктические рыбы, разумеется, составляют исключение, так как они постоянно живут при отрицательной температуре и содержание антифризов в крови у них должно поддерживаться в течение всей жизни.

В последние годы в ряде работ изучались механизмы, регулирующие синтез и расщепление антифризов. Оказалось, что у разных животных различны не только молекулярное строение антифризов, но и механизмы регуляции их количества — по крайней мере те внешние сигналы, по которым организм «судит» о необходимости вырабатывать антифризы. При изучении некоторых северных рыб было установлено (Duman, DeVries, 1974), что в регуляторном механизме у них имеется особое «предохранительное устройство»: хотя синтез антифризов у этих рыб начинался при воздействии одних лишь низких температур, для исчезновения антифризов требовалась уже комбинация потепления с удлинением светового дня. Благодаря этому при необычном кратковременном потеплении поздней зимой или ранней весной содержание антифризов у рыб не падает, так как доминирует влияние освещенности. Кинетика синтеза антифризов такова, что максимальная их концентрация устанавливается за 3—6 недель; примерно такое же время необходимо для исчезновения антифризов.

У некоторых рыб были также изучены гормональные и молекулярно-генетические механизмы, влияющие на оборот антифризов. Так, было показано (Hew, Fletcher, 1979), что расщепление антифризов у камбалы *Pseudopleuronectes americanus* регулируется гипофизом: у гипофизэктомированных рыб синтез

антифризов продолжался и летом. По-видимому, регуляция синтеза антифризов довольно сложна. Было обнаружено (Lin, 1979; Lin, Long, 1980), что у камбалы *P. americanus* специфическая информационная РНК, ответственная за синтез антифризов, появляется задолго до начала этого синтеза, а весной она не выявляется уже примерно за месяц до исчезновения антифризов. Таким образом, в печени рыб, по-видимому, синтез антифризов регулируется на уровне как транскрипции, так и трансляции.

У наземных беспозвоночных также существует целый ряд различных механизмов регуляции содержания антифризов. Не у всех изученных видов было обнаружено такое же «предохранительное устройство» на случай временного потепления, как у некоторых рыб (см. выше). Например, у жука *Meracantha contracta* снижение содержания антифризов запускается сочетанием высокой температуры и длинного светового дня (Duman, 1977), тогда как у паука *Philodromus* sp. — одним только повышением температуры. У жука *Dendroides canadensis* (Duman, 1980) для снижения уровня антифризов требовался длинный световой день; сочетание же высокой температуры с коротким световым днем оказалось неэффективным. Нервные и гуморальные механизмы, ответственные за такие реакции на внешние сигналы, пока не выяснены.

### Выводы из анализа температурной адаптации и некоторые нерешенные вопросы

В главе 1 мы высказали мысль о том, что основная цель сравнительного изучения различных биохимических адаптаций состоит в том, чтобы вскрыть основные принципы организации биохимического аппарата. Изучение молекулярных механизмов адаптации позволяет не только понять, каким образом разные живые существа приспосабливаются к окружающей их среде, но также выяснить, какие особенности молекулярных систем должны прочно сохраняться у любых организмов. Изучение температурной адаптации дает прекрасную возможность понять общие принципы биохимической организации: воздействие температуры затрагивает практически все стороны биохимических систем и изменяет структурные и функциональные свойства всех главных компонентов организма — воды, белков, липидов и нуклеиновых кислот.

Мы смогли убедиться в том, что к важнейшим консервативным механизмам, действующим при температурной адаптации, относится сохранение постоянства  $K_m$  и потенциальной эффективности ферментов в физиологическом диапазоне температур. По-видимому, компенсаторные изменения кинетических свойств



ферментов, способствующие постоянству  $K_m$  и эффективности катализа,— это универсальная черта эволюции ферментов. Даже незначительные изменения температуры внешней среды (или тела) могут приводить к эволюционным видоизменениям ферментов. Так, на примере различных видов барракуды мы видели, что для выработки разных «температурных вариантов»  $M_4$ -лактатдегидрогеназы понадобились сдвиги средней температуры тела всего лишь на несколько градусов. Какого рода замены аминокислот в белках приводят к таким функциональным адаптациям, пока не известно. Выяснение структурных основ адаптивных изменений в кинетике ферментов поможет нам глубже проникнуть в сущность механизмов ферментативного катализа. Может быть, мы сможем лучше понять, как влияют изменения в первичной структуре ферментов на способность связывать лиганды и на каталитические свойства. Изучение ферментов эктотермных животных, адаптированных к различным температурам, возможно, позволит нам разобраться во взаимоотношениях между структурой и функцией родственных ферментов (например, различных  $M_4$ -ЛДГ) так же подробно, как мы разбираемся сегодня в этих взаимоотношениях у дыхательных белков (например, различных гемоглобинов позвоночных). Точно так же изучение структурных основ взаимодействия между субъединицами таких полимерных белков, как фибриллярный актин, возможно, позволит нам понять природу связей, определяющих обратимую ассоциацию субъединиц в различных белковых комплексах.

Адаптивные изменения липидных систем во многом сходны с адаптивными изменениями белков. В обоих случаях для обратимых перестроек необходима «полустабильность» структуры (Alexandrov, 1977). Для того чтобы при той температуре, при которой функционируют белки или липиды, их структура была достаточно гибкой, нужен надлежащий подбор состава аминокислот или соответственно жирных кислот. Подобно адаптации структурных и функциональных свойств ферментов, гомеостаз вязкости липидных систем тоже, по-видимому, имеет общую основу у самых различных организмов. Хотя у прокариот и эукариот существуют разнообразные регуляторные механизмы, видоизменяющие гидрофобные и гидрофильные части липидных молекул в мембранах, конечный результат действия таких механизмов во всех случаях один и тот же.

Приспособительные изменения структуры крупных молекул — белков, липидов и нуклеиновых кислот — дополняются адаптивными сдвигами той микросреды, в которой эти молекулы функционируют. Так, альфастатический механизм регуляции рН играет решающую роль в сохранении необходимых кинетических свойств (например,  $K_m$  для пирувата у  $M_4$ -ЛДГ) и полимери-

зации белков (например, фосфофруктокиназы). В связи с этим для температурной адаптации очень важное значение имеют имидазольные группы гистидина. Регуляция рН у разных организмов и в разных тканях требует дальнейшего изучения; хотя мы и начинаем понимать значение альфастатической регуляции, механизмы, должным образом изменяющие рН в соответствии с температурой тела, до конца не ясны.

Изучение температурной адаптации дает нам хорошую возможность сравнить молекулярные адаптивные механизмы разных временных масштабов. Как мы видели, долговременные эволюционные изменения часто бывают сходны с кратковременными акклимационными сдвигами. В этом отношении показатель адаптивные изменения липидов: поддержание нужной вязкости достигается сравнимыми способами как у видов, приспособленных к разным температурам, так и у популяций одного и того же вида, акклимированных к разным условиям. Альфастатическая регуляция тоже может обуславливать как межвидовые, так и внутривидовые различия. Неясным остается значение различных вариантов белков для температурной акклимации. Адаптивные особенности, обнаруженные при сравнении представителей разных видов (например, приспособительные изменения  $K_m$  и  $k_{cat}$ ), обычно не выявляются при сравнении популяций одного вида, акклимированных (или акклиматизированных) к разным условиям. Тем не менее есть четкие примеры изменения ферментов — например, ацетилхолинэстеразы у *Salmo gairdneri* и  $H_4$ -ЛДГ у *Fundulus heteroclitus*, при акклимации и акклиматизации, и это служит стимулом к дальнейшим исследованиям.

Мы все глубже понимаем конечные результаты процессов температурной адаптации, однако с выяснением кинетики этих процессов дело обстоит несколько хуже. Как быстро происходят эволюционные изменения белков? Одновременно ли протекают приспособительные изменения белковых и липидных систем при акклимации? От каких регуляторных механизмов зависит скорость процессов, связанных с акклимацией? Подобные вопросы послужат хорошими отправными точками, когда мы начнем выяснять, каким образом различные биохимические системы претерпевают долговременные (эволюционные) или кратковременные (акклимационные) изменения, позволяющие им выполнять свои функции при различной температуре.

# Адаптация к морским глубинам

## Введение

Мы рассмотрели основные принципы биохимической адаптации, но при этом каждый раз имели дело с каким-либо одним фактором среды. Теперь, в последней главе книги, нам хотелось бы рассмотреть такие условия, в которых на организацию биохимических систем одновременно влияют факторы разного рода — физические, химические и биологические. Подобные условия создаются в морских глубинах. Здесь можно найти превосходные примеры для иллюстрации тех основных принципов адаптации, которые мы рассматривали в настоящей книге. В особенности это относится к комбинированным влияниям сложной совокупности внешних факторов, включающей гидростатическое давление, температуру, освещенность, пищевые ресурсы (количество, калорийность, распределение, источники первичной продукции), морские течения и химический состав воды.

## Специфические особенности морских глубин

1. *Физические особенности.* Морские глубины отличаются крайне высоким гидростатическим давлением, отсутствием света (кроме свечения биологических объектов), низкой температурой (за исключением участков около гидротермальных источников, где температура может достигать  $360^{\circ}\text{C}$ ; Spiess et al., 1980), большой удаленностью от зон первичного синтеза органического вещества (в этом отношении зоны гидротермальных источников тоже составляют исключение) и отсутствием, как правило, сильных течений. Как мы увидим, каждый из этих факторов влияет на «конструкцию» глубоководных животных. Важнейшие из этих факторов представлены на рис. 12-1. Особо следует отметить, что первичный синтез органического вещества за счет энергии солнечного света может происходить лишь на глубинах до 300 м. На больших глубинах количество света недостаточно для фотосинтеза. Из рис. 12-1 видно также, что температура морских глубин обычно очень низка — в среднем  $2-3^{\circ}\text{C}$ . В связи с этим возникает вопрос, свойственны ли глу-

боководным животным такие же способы температурной адаптации, как и у приспособленных к холоду эктотермных обитателей небольших глубин или у наземных животных. Еще одна важная особенность морских глубин — высокое гидростатическое давление. С увеличением глубины на каждые 10 м это давление возрастает на 1 атм, и в самых глубоких участках океана оно

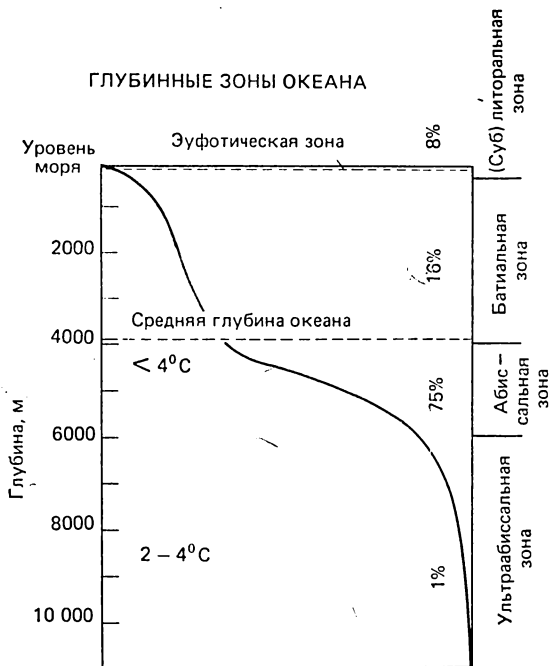


Рис. 12-1. Глубинные зоны морей и океанов. Цифры (проценты) соответствуют относительной площади дна, приходящейся на каждую зону. (Somego, 1982.)

достигает примерно 1100 атм. В среднем же гидростатическое давление в океане равно около 380 атм. В морских глубинах царит мрак, если только нет биологических источников света. Это может играть важнейшую роль во взаимоотношениях между хищниками и их жертвами: обнаружить жертву визуально в темноте нелегко, поэтому стратегии пищевого поведения могут быть иными, нежели в мелких водах. В свою очередь эти стратегии могут оказывать глубокое влияние на организацию биохимических систем (см. ниже). Таким образом, физические особенности больших глубин, по-видимому, ставят перед глубоководными животными ряд проблем, требующих биохимической адаптации. Однако при изучении такой адаптации нельзя рассматривать

какие-либо физические факторы в отдельности. Необходимо учитывать еще одну группу особенностей морских глубин, которые могут иметь решающее значение для стратегии поведения и для физиологии и биохимии глубоководных животных. Эти особенности касаются пищевых ресурсов.

2. *Источники пищи на больших глубинах.* Глубоководные животные, безусловно, должны приспосабливаться к таким физическим факторам, как высокое давление и низкая температура. Однако наиболее характерные особенности этих животных — на морфологическом, физиологическом и молекулярном уровнях — по-видимому, обусловлены спецификой пищевых ресурсов. На организацию глубоководных животных оказывают сильное влияние многие особенности источников их пропитания. Во-первых (и это, возможно, самое важное), общее количество пищи экспоненциально снижается с глубиной (Banse, 1964). Чем больше удалена та или иная зона от области, где происходит первичное образование органической материи с использованием света, тем менее вероятно в этой зоне обилие пищи. Во-вторых, распределение ограниченного количества пищи может быть в высшей степени неравномерным. Для глубоководных животных (особенно пелагических) не существует таких мест, где бы они могли изо дня в день находить пищу; источники пищи разбросаны на больших глубинах случайным образом. Ясно, что и общее поступление потенциальных источников энергии на глубину, и их распределение должны влиять на стратегию поведения глубоководных животных, а значит, и на особенности их локомоции. Оптимальной стратегией для таких животных может быть спокойное поджидание жертвы, не требующее больших затрат энергии на плавание. Учитывая, что «бросковое» плавание может приводить у рыб к возрастанию энергозатрат примерно в 100 раз по сравнению с уровнем основного обмена (см. Brett, Groves, 1979), можно понять, что выжидательная стратегия позволяет сберечь немало энергии для процессов роста. «Энергетический бюджет» у глубоководных животных может быть существенно иным, нежели у обитателей мелководья, — это касается и общих энергозатрат, и распределения энергии между процессами поддержания жизни (сюда относятся и плавание) и ростом особи.

До недавнего времени пищевые ресурсы, доступные для глубоководных животных, рассматривали всецело исходя из представления о том, что единственным источником энергии для образования органического вещества на Земле служит Солнце. Из этого следовало, что количество пищи в том или ином участке находится в прямой зависимости от близости этого участка к зонам фотосинтеза. Поэтому главной особенностью глубоководных местообитаний считали ограниченность энерге-

тических ресурсов. Однако недавно было сделано открытие, которое заставило биологов критически пересмотреть свои представления о пищевых цепях на больших глубинах. Оказалось, что солнечные лучи не единственный источник энергии для первичного образования органических веществ. Для организмов, обитающих вблизи гидротермальных выходов в местах расхождения литосферных плит (Corliss et al., 1979; Spiess et al., 1980), таким источником служит в основном сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$  или  $\text{HS}^-$ ). Сульфиды, образующиеся при геологических процессах (Edmond et al., 1979) без участия солнечного света, доставляют здесь энергию для генерирования ATP и восстановительной силы (NADPH) (Felbeck et al., 1981; Felbeck, Somero, 1982). Поэтому, когда мы говорим о пищевых ресурсах и трофических взаимоотношениях на больших глубинах, мы должны рассматривать две различные цепи событий. Одна из этих цепей берет начало в эвфотической зоне, а вторая — в магме, находящейся под дном океана. Характер различий между организмами, населяющими «типичные» глубинные зоны, и обитателями областей, близких к гидротермальным источникам, служит убедительным аргументом в пользу важнейшей роли близости к местам первичной продукции органического вещества в формировании ключевых морфологических, физиологических и биохимических особенностей животных. Изучение видов, живущих около таких источников (для этих видов характерны высокая плотность популяций и интенсивность метаболических процессов), поможет нам лучше понять, каким образом характер пищевых ресурсов формирует необычные свойства типичных обитателей морских глубин.

### Адаптация к гидростатическому давлению

Перед тем как перейти к пищевым взаимоотношениям глубоководных животных, будь то «типичные» обитатели морских глубин или существа, населяющие зоны гидротермальных источников, следует рассмотреть те молекулярные адаптации, которые позволяют этим животным существовать при высоком гидростатическом давлении. Если бы они не обладали способностью поддерживать и точно регулировать интенсивность метаболизма в таких условиях, то вопрос о пищевых ресурсах в обычных и гидротермальных зонах, наверное, не имел бы смысла. Как мы увидим, адаптация к давлению (особенно адаптация ферментных систем) играет важнейшую роль в распределении морских животных по вертикали: с одной стороны, ограничивается доступ мелководных животных к морским глубинам, а с другой — глубоководные животные не выдерживают конкуренции на мелководье. Для того чтобы понять, почему адаптация к давлению

играет такую важную роль, нужно сначала рассмотреть механизмы возможного влияния давления на биологические системы.

Давление может влиять на любые процессы только через изменения объема. Если какой-либо процесс протекает без изменения объема, то давление не оказывает на него влияния. Если же он сопровождается увеличением объема, то давление будет тормозить его; и наоборот, если объем уменьшается, то повышенное давление будет содействовать данному процессу. Эти основные правила определяют чувствительность биологических систем к давлению и, как мы увидим дальше, пути приспособления к нему.

Здесь необходимо несколько подробнее рассмотреть изменения объема, чтобы уяснить, во-первых, их причины и, во-вторых, количественные взаимоотношения между изменениями объема и их влиянием на равновесие и скорость химических реакций. Здесь прежде всего важно подчеркнуть, что давление может изменять оба показателя; это видно из уравнений (1) и (2):

$$\left(\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial P}\right)_T = \frac{-\Delta V}{RT}; \quad (1)$$

$$k_p = k_0 \exp(-P\Delta V^*/RT), \quad (2)$$

где  $P$  — давление (атм),  $T$  — абсолютная температура,  $R$  — газовая постоянная ( $82 \text{ см}^3 \text{ атм К}^{-1} \text{ моль}^{-1}$ ),  $K_{eq}$  — константа равновесия для данной реакции,  $k_0$  и  $k_p$  — константы скоростей для реакции при давлении 1 атм и  $P$  атм соответственно,  $\Delta V$  — изменения объема при переходе системы из начального состояния в конечное и  $\Delta V^*$  — «объем активации» реакции, т. е. изменение объема системы во время лимитирующего скорость этапа в превращении реагентов в продукты. (Более подробно все эти взаимоотношения рассмотрены в работах Johnson et al., 1974, и Laidler, Bunting, 1973.)

Из приведенных уравнений очевидно, что от изменения объема при переходе системы из начального состояния (где она содержит реагирующие вещества) в конечное (где она содержит продукты реакции) будет зависеть влияние давления на  $K_{eq}$ ; влияние же давления на скорость реакции ( $k$ ) будет определяться изменением объема системы при активации исходного комплекса с образованием промежуточного комплекса. Здесь, как и в главах, посвященных температурной адаптации, символ  $*$  означает активацию.

Теперь, когда мы установили количественные отношения между изменениями объема и влиянием давления на равновесие и скорость реакций, нужно будет рассмотреть причины этих изменений объема при биохимических превращениях. Какие компоненты метаболических реакций могут обуславливать расширение или сжатие системы, в которой эти реакции протекают?

Для того чтобы удовлетворительно ответить на этот вопрос, важно помнить, что подавляющее большинство химических превращений в биологических системах протекает в водной среде. Скорее всего именно вода играет главную роль в изменениях равновесия и объема активации (Low, Somero, 1975). Огромное значение воды в изменениях объема при биохимических реакциях связано с тем, что большинство компонентов внутриклеточной жидкости влияет на структуру воды. В самых общих чертах это связано с тем, что большая часть промежуточных продуктов метаболизма и боковых цепей аминокислот в белках окружены сравнительно упорядоченным водным слоем, толщина которого соответствует, возможно, нескольким молекулам воды. По-видимому, в таком упорядоченном, или структурированном, виде вода занимает меньший объем, чем такое же число молекул в основной массе воды. Поскольку метаболиты, аллостерические эффекторы и боковые цепи аминокислот способны структурировать воду, можно ожидать, что при ферментативных реакциях должны происходить некоторые изменения в состоянии воды, а потому и в объеме всей системы. Например, присоединение лиганда (субстрата или кофактора) к активному центру фермента должно сопровождаться по меньшей мере частичной дегидратацией как этого лиганда, так и взаимодействующих с ним аминокислотных остатков. Взаимодействия фермента с лигандом обычно связаны с взаимодействиями зарядов или полярных, но не заряженных групп. На структуру воды сильно влияют карбоксильные группы, кислород карбонильных групп, гуанидиновые группы аргинина, фосфаты и остатки гистидина. Обратимые процессы гидратации и дегидратации всех этих групп во время связывания лигандов, вероятно, сопровождаются значительными изменениями объема всей системы (вода + белок + лиганд) независимо от того, меняется ли объем белка.

По-видимому, второй по значению компонент, ответственный за изменения объема, — это белок: при каталитических или регуляторных процессах происходит значительное изменение конформации ферментов и (или) ассоциации субъединиц. В связи с белком следует рассмотреть два вида изменений объема. Прежде всего объем может изменяться при изменении плотности упаковки аминокислот в белковых молекулах. Такие изменения касаются структуры самих белков, в отличие от изменений, зависящих от гидратации на поверхностях контакта белков с водой. У многих изученных к настоящему времени белков обнаружена исключительно высокая плотность упаковки: боковые цепи аминокислот (особенно неполярные гидрофобные цепи, заполняющие большую часть пространства внутри белковой молекулы) располагаются почти так же плотно, как молекулы



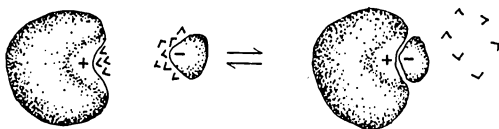
в растворе какого-либо одного углеводорода (подробнее см. Chotia, 1975). Таким образом, природа, по-видимому, не терпит вакуума в третичной структуре белков, и поэтому остаются лишь очень небольшие возможности для увеличения плотности упаковки аминокислотных остатков. Таким образом, изменения объема белков во время каталитических или регуляторных процессов (а такие изменения, несомненно, происходят в ряде случаев; см. Low, Somero, 1975), по-видимому, в меньшей степени определяют чувствительность ферментативных реакций к давлению, чем изменения объема иного рода, связанные с гидратацией. Эти последние могут быть обусловлены изменениями конформации белка независимо от того, меняется ли в процессе реакции его объем. При изменении конформации ферментов, очевидно, почти неизбежно должна изменяться доступность для молекул  $H_2O$  тех аминокислотных цепей, которые влияют на структуру (и плотность) воды. Действительно, изменения гидратации могут играть важную роль в ферментативном катализе, так как эндотермическая гидратация во время этапа активации должна приводить к уменьшению свободной энергии активированного комплекса и тем самым увеличивать вероятность его образования (Low, Somero, 1975; Greaney, Somero, 1979). Таким образом, при каталитических конформационных изменениях могут происходить реакции гидратации, благодаря которым катализ становится чувствительным к давлению (как и в случае связывания лиганда, когда отделение воды от лигандов и мест их связывания или обратный процесс почти неизбежно сопровождается изменениями объема). Следует также отметить, что чувствительность биохимических реакций к давлению может быть связана и с ассоциацией белковых субъединиц. По-видимому, при сборке полимерных ферментов из отдельных субъединиц практически всегда происходит удаление воды в местах контакта этих субъединиц. Таким образом, даже если при полимеризации объем субъединиц не изменяется, повышение давления может нарушать равновесие этого процесса. Опасность этого может быть особенно велика в том случае, если ассоциация субъединиц обеспечивается значительным увеличением энтропии, связанным с удалением воды.

Различные причины изменения объема при связывании лиганда, конформационных изменениях и ассоциации субъединиц схематично представлены на рис. 12-2.

### Адаптация кинетических свойств ферментов к давлению

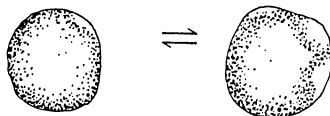
Действительно ли изменения объема, происходящие по тем или иным причинам при ферментативных реакциях, делают эти реакции настолько чувствительными к давлению, что требуется

## СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДА

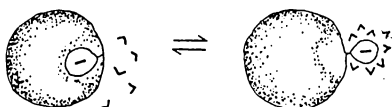


## ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ

## Плотность упаковки



## Плотность гидратации



## ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ

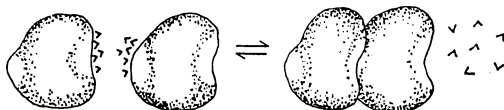


Рис. 12-2. Причины изменений объема во время ферментативных реакций и ассоциации белковых субъединиц.

**Связывание лигандов:** в случае, изображенном на данном рисунке, лиганд, несущий отрицательный заряд (субстрат, кофактор или регуляторный модулятор), присоединяется к положительно заряженному участку фермента. При этом «плотно упакованная» упорядоченная вода «выжимается» с поверхности лиганда и связывающего участка фермента. Объем этой воды увеличивается, и в результате увеличивается объем всей системы (белок+лиганд+вода).

**Изменение конформации:** 1) Изменение «плотности упаковки». При конформационных перестройках ферментов изменяется плотность самой молекулы белка в связи с изменением упаковки аминокислотных остатков. 2) Изменение плотности гидратации. Изменение конформации белковой молекулы приводит к появлению (или исчезновению) экспонированных групп, вокруг которых организуется вода. Здесь изображен обратимый переход отрицательно заряженной группы из глубины молекулы белка (где эта группа недоступна для воды) наружу, где она может сильно гидратироваться. Вокруг этой группы структурированная ею вода становится плотнее окружающей неупорядоченной воды.

**Полимеризация:** при ассоциации двух субъединиц с образованием полимера упорядоченные молекулы воды в месте контакта этих субъединиц «выжимаются» отсюда, и объем системы, как и при связывании лиганда, увеличивается.

специальная адаптация ферментов? На этот вопрос можно ответить утвердительно, хотя в большинстве случаев мы еще не знаем, с какими изменениями объема может быть связана чувствительность биохимических процессов к давлению. Поэтому, обсуждая влияние давления на ферментные системы обитателей малых и больших глубин, мы будем в основном рассматривать изменения кинетики ферментативных реакций и ограничимся лишь гипотетическими соображениями относительно соответствующих адаптивных механизмов.

При обсуждении влияния температуры, осмотически активных веществ и рН на кинетические свойства ферментов мы столкнулись с тем, что некоторые ключевые характеристики ферментов очень чувствительны к этим факторам, но в то же время — благодаря адаптивным изменениям самих ферментов или окружающей их среды — весьма постоянны. Одна из таких характеристик — кажущаяся константа Михаэлиса ( $K_m$ ) для субстратов и кофакторов. Этот показатель во многих случаях отражает эффективность образования комплекса фермент-субстрат или фермент-кофактор. Из предыдущих глав мы уже знаем, что  $K_m$  поддерживается на постоянном уровне, несмотря на изменения температуры, рН или осмотического давления. Точно так же и при адаптации к большим глубинам потребовались механизмы стабилизации  $K_m$  в условиях высоких давлений и низких температур. Следует рассмотреть несколько подробнее роль адаптации  $K_m$  к давлению: такой анализ позволит нам сделать важные выводы относительно адаптации к большим глубинам. Мы узнаем, что ферменты животных, обитающих на мелководье и адаптированных к холоду, не всегда достаточно приспособлены для работы при высоком давлении. Поэтому для перемещения на большую глубину этим животным необходимо преодолевать значительные биохимические барьеры. Рассматривая ферменты глубоководных рыб, мы найдем поразительные примеры эволюционной конвергенции — по-видимому, существует лишь одно «оптимальное решение» для устойчивой регуляции ферментативного катализа на больших глубинах. Мы увидим также, что за выработку устойчивых к давлению ферментов пришлось расплачиваться тем, что на малых глубинах глубоководные виды уже не могут конкурировать с местными видами. И наконец, мы узнаем, что приспособительные изменения ферментов необходимы уже при давлениях, соответствующих не столь большим глубинам — от 500 до 1000 м (51—101 атм).

Из всех ферментов наиболее изучен в отношении адаптации к давлению изозим  $M_4$  лактатдегидрогеназы ( $M_4$ -ЛДГ), уже хорошо знакомый читателю. Он обладает выраженной чувствительностью к давлению (возможные причины этого будут указаны в конце раздела). Все изученные до сих пор характери-

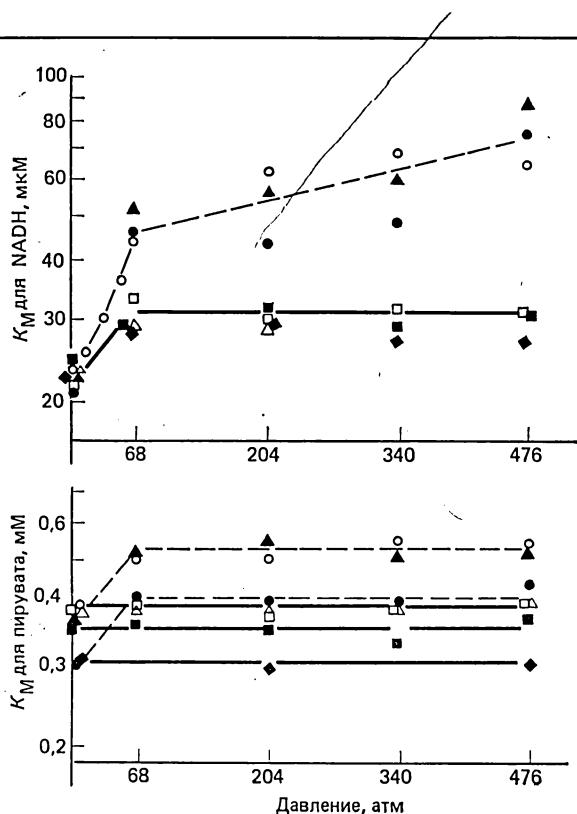


Рис. 12-3. Влияние гидростатического давления на кажущуюся  $K_M$  для NADH (вверху) и пирувата (внизу) у очищенной  $M_4$ -ЛДГ некоторых мелководных и глубоководных морских костистых рыб. Глубоководные виды: *Sebastolobus altivelis* (светлые квадратики), *Antimora rostrata* (светлые треугольники), *Coryphaenoides acrolepis* (черные квадратики) и *Halosaurusopsis macrochir* (ромбики); рыбы с малых глубин: *Pagothenia borchgrevinkii* (черные кружочки), *Scorpaena guttata* (черные треугольники) и *Sebastolobus alascanus* (светлые кружочки). Измерения проводились при 5 °C. (Siebenaller, Somero, 1979.)

стики ЛДГ, в том числе  $K_M$  для субстрата (пирувата) и ко-фактора (NADH), а также число оборота субстрата, различны у мелководных и глубоководных рыб, причем различия эти носят характер адаптации к давлению. Изучение ЛДГ мелководных и глубоководных рыб позволит нам сделать важные выводы относительно роли адаптивных изменений белков у глубоководных животных и влияния этих изменений на вертикальное распределение морских животных.

На рис. 12-3 показано влияние давления на  $M_4$ -ЛДГ некоторых мелководных и глубоководных морских костистых рыб — на  $K_M$  этого фермента для NADH (вверху) и пирувата (внизу).

Все эти рыбы были адаптированы примерно к одинаковой температуре (от  $-2$  до  $8^{\circ}\text{C}$ ). При 1 атм  $K_m$  для NADH и пирувата поразительно сходны у разных видов (это кажется естественным в связи с важностью постоянства  $K_m$ ; см. гл. 11). Например,  $K_m$  для пирувата находятся в диапазоне величин, характерных для эктотермных животных, хорошо приспособленных к холоду. Однако такое сходство  $K_m$  при 1 атм не наблюдается при более высоких давлениях. У мелководных рыб повышение давления приводит к увеличению  $K_m$  для субстрата и кофактора, причем наиболее выражено изменение  $K_m$  для NADH. У глубоководных же рыб  $K_m$  для пирувата абсолютно нечувствительна к давлению, а  $K_m$  для NADH лишь умеренно возрастает при повышении давления от 1 до 68 атм, а затем остается постоянной вплоть до 476 атм (максимального давления в данном эксперименте; эта величина близка к предельному давлению, с которым могут встречаться в природе глубоководные рыбы, исследованные в данной работе) (рис. 12-4).

Какие выводы можно сделать из различий в кинетических свойствах  $M_4$ -ЛДГ мелководных и глубоководных рыб? Прежде всего очевидно, что  $K_m$  ЛДГ глубоководных рыб, в отличие от всех изученных мелководных, может поддерживаться на нужном уровне при повышенном давлении. Мы уже знаем (см. главу о температурной адаптации ферментов), что удержание  $K_m$  в пределах, оптимальных для катализа и его регуляции, — одно из важнейших проявлений адаптации ферментных систем. При погружении мелководных рыб на большие глубины работа их ферментов нарушилась бы из-за чрезмерного увеличения  $K_m$  для субстратов и кофакторов. К особенно нежелательным последствиям могло бы привести значительное увеличение  $K_m$  для NADH, так как для того, чтобы дегидрогеназы всегда были насыщены кофактором, они должны связывать его чрезвычайно прочно. При этом направление метаболического потока зависит от окислительно-восстановительного баланса клетки (в случае ЛДГ от соотношения NADH и  $\text{NAD}^+$ ). Поскольку связывание кофактора — это обязательный первый этап в лактатдегидрогеназной реакции, значительное снижение сродства к кофактору привело бы к сильному уменьшению интенсивности гликолиза. У глубоководных рыб эти трудности не возникают, так как сродство ЛДГ к субстрату и кофактору у них достаточно нечувствительно к давлению.

Из этих соображений ясно, что у мелководных адаптированных к холоду животных  $M_4$ -ЛДГ не приспособлена для больших глубин. Поэтому выработку ферментов, устойчивых к давлению, можно считать необходимым условием для проникновения в эти глубины. Изучение двух видов рыб — *Sebastolobus alascanus* и *S. altivelis* — позволяет выдвинуть интересную модель, объяс-

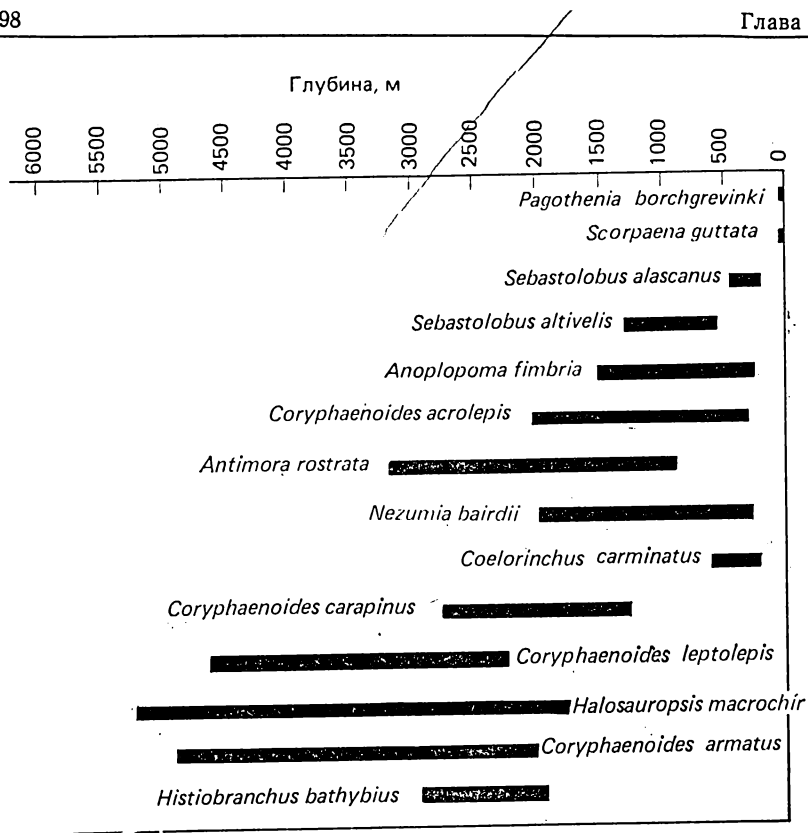


Рис. 12-4. Глубина обитания некоторых морских костистых рыб, упоминавшихся в этой главе. Для *Sebastolobus alascanus* и *S. altivelis*, принадлежащих к одному роду, приведена глубина максимальной численности. (Somero et al., 1983.)

няющую вертикальное распределение морских животных (Siebenaller, Somero, 1978). Эти виды очень сходны по морфологическим и общим экологическим особенностям (Moser, 1974), однако их распределение по глубинам различно (см. рис. 12-4). Кроме того, у них имеются различия в кинетических свойствах ЛДГ на малой и большой глубине, а также в ряде других биохимических особенностей (см. ниже). Различная чувствительность  $M_4$ -ЛДГ у разных видов связана с очень незначительными изменениями первичной структуры фермента. При исследовании пептидных карт и анализе аминокислот было показано, что ЛДГ у двух упомянутых рыб различаются лишь по одной аминокислоте (у *S. altivelis* аспарагин, а у *S. alascanus* гистидин) (Jo-

seph Siebenaller, неопубликованные данные). Таким образом, для того чтобы ЛДГ утратила чувствительность к давлению, достаточно сравнительно небольшого эволюционного изменения. В связи с этим можно предположить, что глубоководный вид *S. altivelis* когда-то произошел от предковой популяции *S. alascanus* в результате выработки ЛДГ, приспособленной к давлению (и, безусловно, других белков). В соответствии с такой гипотезой отдельные особи в прежней популяции *S. alascanus* (или какого-либо общего предка обоих современных видов) обладали ферментами с меньшей чувствительностью к давлению, и такие особи могли заселять более глубокие зоны. Эта модель по меньшей мере частично объясняет, каким образом от мелководного вида может произойти другой, глубоководный вид. В то же время остается неясным, почему толерантный к давлению вид обитает лишь на больших глубинах, а не сосуществует рядом с мелководным видом (или не вытесняет его полностью). К этому вопросу мы вернемся несколько позже.

Сравнение ЛДГ *S. alascanus* и *S. altivelis* позволяет сделать еще один важный вывод: для выработки в процессе эволюции устойчивых к давлению ферментов достаточно давлений всего лишь около 50—100 атм. Таким образом, организму не обязательно нужно подвергаться действию экстремально высоких давлений, чтобы приобрести адаптации вроде тех, какие свойственны, например, М<sub>4</sub>-ЛДГ *S. altivelis* и других глубоководных рыб. Сходство между М<sub>4</sub>-лактатдегидрогеназами *S. altivelis* и значительно более глубоководных форм *Coryphaenoides*, *Halo-sauropsis macrochir* и *Antimora rostrata* позволяет думать, что адаптивные изменения, обеспечивающие нормальную работу ферментов при давлениях около 50—100 атм, уже достаточны и для успешного функционирования при нескольких сотнях атмосфер. Такое сходство кинетических свойств М<sub>4</sub>-ЛДГ всех глубоководных рыб служит прекрасным примером конвергентной эволюции на молекулярном уровне. Все эти виды происходят от различных мелководных предков. Естественно задаться вопросом: одинаковы ли замены аминокислот, которые произошли при создании устойчивых к давлению ЛДГ у разных рыб? Можно надеяться, что изучение первичной структуры ферментов позволит ответить на этот вопрос. В конце следующего раздела мы выскажем соображения о возможном общем механизме такой адаптации.

Следует подчеркнуть, что М<sub>4</sub>-ЛДГ — это лишь один из тысяч различных белков, имеющих у рыб, и поэтому у нас нет особенно веских оснований делать обобщения. Другие ферменты могут быть более (или, наоборот, менее) чувствительными к давлению, и в других случаях давление может влиять на иные этапы катализа. Ограниченные данные, полученные при изуче-

нии глубоководных животных (обзор: Somero et al., 1983), позволяют нам утверждать, что некоторые (но не все) белки таких животных претерпевают изменения, направленные на адаптацию к давлению. Зависимость кажущейся  $K_m$  от давления, обнаруженная у  $M_4$ -ЛДГ, по-видимому, довольно типична для широкого круга ферментов. Данные об ацетилхолинэстеразах (Hochachka, 1974), цитратсинтазах (Hochachka et al., 1975) и Na/K-АТРазах (Pfeiler, 1978) указывают на то, что  $K_m$  часто сильно изменяется при повышении давления, и поэтому ее стабилизация играет важную роль в адаптации к большим глубинам.

### Различия в каталитической эффективности ферментов, связанные с давлением

Внимательный читатель мог бы заметить, что в наших рассуждениях о значении адаптации ферментов к давлению для вертикального распределения водных животных есть некоторая односторонность. Мы предположили, что выработка ферментов, кинетические свойства которых не зависят от давления, может позволить некоторым представителям мелководных видов проникать на большие глубины, со временем заселять эти глубины и образовывать новый вид. В качестве возможного примера мы привели гипотетическое происхождение *Sebastolobus altivelis* от *S. alascanus*. Однако такая модель не позволяет объяснить, почему новый вид, приспособленный к высоким давлениям, расселяется только на больших глубинах, а не занимает наряду с глубоководными и мелководные зоны, где обитает неадаптированный к давлению родственный вид. Однозначного ответа на вопрос о том, что удерживает глубоководных животных на глубине, пока нет. В то же время при исследовании некоторых особенностей  $M_4$ -ЛДГ мелководных и глубоководных рыб были получены данные о том, что биохимические факторы могут играть важную роль в установлении не только нижних пределов обитания мелководных видов, но также и верхних пределов для глубоководных видов.

Данные, приведенные в табл. 12-1, показывают, что за устойчивость к давлению приходится расплачиваться: каталитическая эффективность  $M_4$ -ЛДГ у глубоководных рыб значительно ниже, чем у мелководных, адаптированных к холоду. В одинаковых условиях опыта при насыщающей концентрации субстрата и кофактора одна молекула  $M_4$ -ЛДГ глубоководной рыбы превращает пируват в лактат со скоростью, в полтора-два раза меньшей по сравнению с  $M_4$ -ЛДГ мелководных рыб. Эти различия в каталитической эффективности, так же как и в зависимости  $K_m$  от давления, обнаружены у всех изученных в этом отноше-



нии глубоководных и мелководных рыб, в том числе и у разных видов *Sebastolobus*.

К чему приводят такие различия в каталитической эффективности ферментов? Прежде всего при прочих равных условиях глубоководные рыбы на малой глубине будут в метаболическом отношении уступать мелководным, так как их ферменты обладают более низкой активностью. Поскольку  $M_4$ -ЛДГ играет

Таблица 12-1. Характеристики энергии активации и относительная скорость реакции, катализируемой  $M_4$ -лактатдегидрогеназой, у животных, адаптированных к различной температуре и давлению. (По данным Somero, Siebenaller, 1979)

Вид (глубина обитания; температура тела)	$\Delta H^\circ$ , кал/моль	$\Delta S^\circ$ , кал/(моль/°K)	$\Delta G^\circ$ , кал/моль	Относительная скорость реакции <sup>1)</sup>
<i>Pagothenia borchgrevinki</i> (поверхностный слой, -2 °C)	10 467	-12,7	14 000	1,00
<i>Sebastolobus alascanus</i> (180—440 м; 4—12 °C)	10 515	-12,6	14 009	0,98
<i>Sebastolobus altivelis</i> (550—1300 м; 4—12 °C)	11 985	-8,1	14 249	0,64
<i>Coryphaenoides acrolepis</i> (1460—1840 м, 2—10 °C)	11 813	-8,7	14 222	0,67
<i>Halosauropsis macrochir</i> (около 2300 м, 2—5 °C)	11 843	-8,6	14 227	0,66
<i>Antimora rostrata</i> (1300—2500 м, 2—5 °C)	12 557	-6,4	14 343	0,54
<i>Thunnus thynnus</i> (до 300 м; 15—30 °C)	11 384	-10,0	14 152	0,76
Кролик (суша; 37 °C)	12 550	-6,4	14 342	0,54

<sup>1)</sup> При 5 °C и 1 атм.

важнейшую роль в процессах локомоции, особенно в «бросковом» плавании, глубоководным рыбам, попавшим на малую глубину, будет труднее поймать жертву и самим не стать добычей более сильных пловцов. Низкая эффективность  $M_4$ -ЛДГ может компенсироваться у таких рыб увеличением синтеза и содержания этого фермента в локомоторной мускулатуре. Однако этот способ адаптации требует дополнительных затрат энергии на синтез белков. Таким образом, низкая эффективность ферментов может быть одним из важных факторов, определяющих верхнюю границу обитания видов, адаптированных к высоким давлениям. Такие различия могут играть особенно важную роль на ранних этапах дифференциации видов, когда остальные особенности глубоководных и мелководных форм еще очень слабо выражены.

Значение пониженной каталитической эффективности ферментов, приспособленных к высоким давлениям, следует рассматривать в связи с балансом выгоды и ее «цены» в тех условиях, в которых обитают глубоководные животные. Существует по меньшей мере два возможных преимущества меньшей каталитической эффективности ферментов у этих животных. С одной стороны, у большинства глубоководных видов интенсивность метаболизма чрезвычайно низка (см. ниже), и поэтому можно предположить, что малая эффективность ферментов служит средством замедления обменных процессов в холодной, темной и бедной источниками пищи среде. С этой точки зрения прямое преимущество пониженной каталитической эффективности у глубоководных животных состоит в установлении низкого уровня метаболизма. Эта гипотеза может показаться правдоподобной, однако нам она представляется ошибочной. Если физические и биологические особенности глубоководной зоны требуют от ее обитателей низкой интенсивности метаболизма (что кажется несомненным), то использование с этой целью неэффективных ферментов вряд ли будет хорошей стратегией. При малых энергетических ресурсах среды, по-видимому, было бы выгоднее использовать эффективные ферменты в низких концентрациях, чем неэффективные в высоких концентрациях. Поскольку  $M_4$ -ЛДГ — один из главных растворимых белков скелетных мышц, выработка более эффективных форм этого фермента, если она возможна, казалась бы явно выгодной ввиду уменьшения затрат энергии на синтез белка. Таким образом, нужно искать другие преимущества низкой эффективности ферментов у глубоководных животных.

Одно возможное преимущество мы уже рассматривали в несколько ином контексте. Когда мы сравнивали каталитическую эффективность гомологичных ферментов животных с различной температурой тела (живущих при давлении около 1 атм), мы нашли, что наиболее эффективные ферменты имеются у таких холоднокровных видов, как антарктические рыбы (см. табл. 12-1); наименее эффективными оказались ферменты теплокровных животных, например птиц и млекопитающих. Однако если каталитическая эффективность находилась в обратном отношении к температуре тела, то температурная стабильность ферментов была прямо пропорциональна температуре. Мы истолковали такие взаимоотношения как «компромисс» между эффективностью фермента и его структурной стабильностью. Согласно нашему предположению, ферменты, действующие при высоких температурах, должны обладать повышенной термостабильностью, хотя за это приходится расплачиваться снижением эффективности (разумеется, такое снижение у теплокровных животных в значительной мере компенсируется температурным уско-

рением реакции). У обитателей больших глубин, где высокое гидростатическое давление угрожает нарушить структуру ферментов, отбор тоже мог привести к «компромиссу» между их стабильностью и каталитической эффективностью. Например, устойчивость структуры фермента к давлению могла бы иметь решающее значение для постоянства  $K_m$  для NADH. Таким образом, за сохранение необходимого сродства к кофактору и субстрату ферменту пришлось бы расплачиваться снижением каталитической эффективности.

Недавно при изучении изозима  $C_4$ -ЛДГ, содержащегося в семенниках млекопитающих, были получены данные о возможной тесной связи между каталитической эффективностью и конформационными изменениями, сопровождающими связывание кофактора (Musick, Rossmann, 1979). Эта связь позволяет по крайней мере частично объяснить кинетические особенности свойств  $M_4$ -ЛДГ глубоководных рыб. Авторы этой работы обратили особое внимание на петлю в  $C_4$ -ЛДГ — особый участок, который прикрывает молекулу кофактора, образуя «карман», в котором эта молекула связывается. В  $M_4$ -ЛДГ эта петля не прикрывает активный участок, пока к нему не присоединен кофактор. Однако при рентгеноструктурном исследовании  $C_4$ -ЛДГ авторы обнаружили, что активный участок может существовать в закрытом (З) состоянии даже в отсутствие кофакторов и субстрата. Значит, в таком состоянии изозим  $C_4$  особенно стабилен термодинамически. Это может приводить к снижению скорости оборота. Поскольку NADH может связываться только с активным участком, находящимся в открытом (О) состоянии, доля молекул  $C_4$ -ЛДГ, способных осуществить катализ, определяется количественным отношением между молекулами в состоянии З и О. У эффективного изозима  $M_4$ -ЛДГ отношение О/З может быть чрезвычайно высоким, а у изозима  $C_4$  — более низким, чему соответствует и меньшая эффективность катализа при одном и том же числе молекул ЛДГ. Рассматривая с таких позиций адаптацию ЛДГ к давлению, можно представить себе, что для сохранения целостности комплекса  $M_4$ -ЛДГ-NADH при высоких давлениях необходима стабилизация фермента в закрытой конфигурации. Для того чтобы при таких давлениях комплекс фермент-кофактор не распадался, у изозимов  $M_4$ -ЛДГ, адаптированных к высокому давлению, могли бы устанавливаться сильные взаимодействия между петлей и остальными участками молекулы. Поэтому соотношение между молекулами фермента в состоянии З и О может быть таким же, как у изозима  $C_4$ . Такие представления хорошо согласуются с данными о том, что каталитическая эффективность изозима  $C_4$  млекопитающих близка к эффективности  $M_4$ -ЛДГ глубоководных рыб. Интересно было бы исследовать чувствительность  $C_4$  к давлению.

нию и посмотреть, не сходен ли этот изозим по характеристикам связывания с ферментами глубоководных животных.

Для того чтобы окончательно оценить преимущества и отрицательные моменты, связанные с выработкой у глубоководных рыб устойчивых к давлению форм таких ферментов, как  $M_4$ -ЛДГ, следует рассмотреть, как ведет себя этот фермент у мелководных и глубоководных видов при физиологических концентрациях субстрата и кофактора и давлениях, существующих на больших глубинах. При давлении 1 атм и насыщающих концентрациях субстрата  $M_4$ -ЛДГ мелководных рыб явно эффективнее, однако при тех условиях, которые имеют место в мышцах глубоководных рыб *in situ*, это преимущество утрачивается. Поскольку внутриклеточные концентрации пирувата ниже насыщающих, изменение  $K_m$  фермента мелководных рыб под влиянием давления будет снижать его активность. Кроме того, и это более важно, значительное повышение  $K_m$  для NADH приведет к ненасыщению участка связывания кофактора. Поскольку связывание NADH — это обязательный этап в лактатдегидрогеназной реакции, изменение  $K_m$  при повышении давления существенно затормозит восстановление пирувата. Учитывая все эти моменты, вполне можно предположить, что устойчивая к давлению ЛДГ глубоководных рыб при высоком давлении и физиологических концентрациях субстрата и кофактора способна по меньшей мере так же эффективно восстанавливать пируват, как и ее гомологи у мелководных видов. Не менее существенно то, что  $K_m$  ЛДГ глубоководных видов сохраняется на уровне, оптимальном для регуляции. Сравнение  $M_4$ -ЛДГ мелководных и глубоководных видов позволяет сделать важный вывод: при адаптации к давлению, как и при температурной адаптации, природа идет на определенные компромиссы. Эти компромиссы обусловлены тем, что из-за взаимосвязи структурных и функциональных особенностей ради поддержания важнейших свойств ферментов (например, способности к связыванию лигандов) приходится частично жертвовать другими свойствами (например, каталитической эффективностью).

### Влияние давления на структуру белков

О структурных адаптациях, облегчающих функционирование белков у глубоководных организмов, нам известно очень немного. Ясно, что эти белки должны обладать структурой, устойчивой к давлению (мы уже приводили предположение о роли определенного участка в молекуле лактатдегидрогеназы глубоководных рыб); однако замены аминокислот, лежащие в основе соответствующих адаптаций, еще только начинают подробно

изучаться. Тем не менее уже ясно, что все такие адаптации преследуют одну цель — уменьшить увеличение объема при изменениях белковой структуры, сопровождающих связывание лигандов, катализ и ассоциацию субъединиц.

На рис. 12-2 весьма схематично показаны различные причины изменения объема в белковых системах, в том числе в ферментных системах и сократительных белках типа актина. Видно, что изменения объема системы в целом могут быть связаны как с изменением самих белковых молекул (плотности упаковки их компонентов), так и с перестройкой организации (а значит, и изменением плотности) воды, окружающей белки. Судя по имеющимся данным, второй источник изменений объема имеет большее значение; при этом наиболее существенные изменения в организации воды, вероятно, связаны с процессами ассоциации белковых субъединиц, так что эти процессы должны быть особенно чувствительны к давлению. В связи с этим рассмотрим вопрос, какие модификации белков могут понадобиться для того, чтобы при высоком давлении могли существовать, например, олигомерные ферментные структуры и полимерные (фибриллярные) формы актина.

Прежде всего необходимо напомнить, что чувствительность процессов сборки субъединиц к давлению уже давно признается важнейшим затруднением на пути адаптации к большим глубинам. Например, Пеннистон (Penniston, 1971) установил, что у ряда животных, приспособленных к давлению 1 атм, функция олигомерных белков ингибируется при повышении давления. Автор объяснил это диссоциацией субъединиц, приводящей к утрате каталитической активности (большинство олигомерных ферментов инактивируется при распаде на отдельные субъединицы); в связи с этим он предположил, что у глубоководных организмов либо белки должны быть мономерными, либо взаимодействия субъединиц должны стабилизироваться необычайно сильными нековалентными связями. Подтвердились ли эти предположения?

Данные, которыми мы сегодня располагаем, позволяют отказать от гипотезы о том, что у глубоководных животных олигомерные ферменты заменены мономерными. Оказалось, что в тех звеньях метаболических путей, в которых у животных, адаптированных к 1 атм, действуют олигомерные ферменты, такие же ферменты имеются и у глубоководных организмов. Однако вторая гипотеза Пеннистона, возможно, верна. В ряде работ, посвященных влиянию гидростатического давления на олигомерные ферменты, в том числе на  $M_4$ -ЛДГ млекопитающих, были получены данные о том, что при давлениях, соответствующих большим глубинам, вряд ли может сохраняться состояние агрегации субъединиц, необходимое для функции фермента.

Было, например, установлено (Schade et al., 1980), что при давлении около 400 атм  $M_4$ -ЛДГ свиньи начинает распадаться на мономеры, а при 1000—1500 атм происходит полная диссоциация. После снятия давления нативная тетрамерная структура фермента восстанавливалась, так же как и его функция. Это означает, что при повышенном давлении не происходит необратимых изменений третичной структуры субъединиц. Правда, опыты проводились *in vitro* (при 20 °С и нефизиологических значениях рН), и это заставляет воздерживаться от поспешных выводов о ситуации *in vivo*; однако полученные результаты позволяют по меньшей мере предполагать, что олигомерные белки животных, адаптированных к 1 атм, не могут оставаться в ассоциированном состоянии при давлениях, характерных для больших глубин. Очевидно, что нужны дальнейшие сравнительные исследования.

Если олигомерные белки глубоководных организмов действительно обладают повышенной способностью сохранять свою структуру при высоком давлении, то какие же «сильные связи» обуславливают эту способность? Одним из способов достижения такой устойчивости к давлению может быть изменение тех энергетических сдвигов, которые обеспечивают реакцию полимеризации. У наземных организмов «движущей силой» для ассоциации субъединиц часто служит увеличение энтропии (см. рис. 12-2). Вода, удаляемая из области контакта субъединиц, переходит в неупорядоченное состояние, и при этом энтропия возрастает, за счет чего и осуществляется ассоциация мономеров. Поэтому можно задать вопрос: не меньше ли у глубоководных животных зависимость процессов ассоциации от энтропии? И если меньше, то каким образом достигается такое снижение вклада энтропии в энергетику ассоциации? Сравнительное изучение полимеризации гомологичных белков мелководных и глубоководных видов проводилось лишь на примере образования фибриллярного (F) актина из мономеров глобулярного (G) актина. Данные, представленные на рис. 12-5, показывают, что у разных видов рыб, обитающих при разных температурах и давлениях, различны также и изменения энтальпии и энтропии, сопровождающие присоединение одного мономера G-актина к растущей нити F-актина. В главе 11 мы уже говорили о том, что изменения энтальпии и энтропии при образовании F-актина из G-актина у животных, приспособленных к теплу, больше, чем у приспособленных к холоду. Кроме того, у самых глубоководных из изученных рыб — у *Coryphaenoides armatus* и *Halosaurus macrochir* — значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  даже ниже, чем у рыб, живущих при сходных температурах на малой глубине (рис. 12-5). Это позволяет думать, что в ходе эволюции глубоководных рыб отбор действительно благоприятствовал уменьшению изменений

энтропии (и одновременно — уменьшению прироста объема воды) при ассоциации белковых субъединиц.

Следует отметить, что между актиновыми комплексами и гомологами ЛДГ, которые мы рассматривали выше, существует четкое различие по распределению их у животных в зависимости от адаптации к высоким давлениям. У всех рыб, обитающих глубже примерно 500—1000 м, были найдены формы ЛДГ с пониженной чувствительностью к давлению. Что касается актина мышц, то у многих видов, у которых ЛДГ «адаптирована к давлению», актин к нему не адаптирован (если судить по снижению  $\Delta S$  полимеризации). Например, у *Coryphaenoides armatus* — вида, родственного *C. acrolepsis*, — термодинамические характеристики полимеризации актина такие же, как и у мелководных рыб, адаптированных к холоду. Оба представителя рода *Sebastes* (см. выше) тоже сходны между собой и с другими мелководными рыбами. Эти различия между ЛДГ и актином показывают, что пороговая величина давления, приводящая к нарушению функции, у разных белков различна. В случае ЛДГ давление в несколько десятков атмосфер уже достаточно для отбора, благоприятствующего адаптированным формам, тогда как для актина необходимость в такой адаптации возникает при гораздо больших давлениях (например, таких, при которых живут *C. armatus* и *Halosaurus marochir*; см. рис. 12-4). Вероятно, для каждого белка существует своя пороговая величина давления, при которой для нормального функционирования (в отношении кинетики, регуляции, ассоциации и т. д.) требуются уже адаптивные видоизменения.

Каким образом энтропия и энтальпия связывания могут снижаться без существенных сдвигов тех изменений свободной энергии, которые происходят при полимеризации? Как может сохраняться стабильность полимерного актина при уменьшении энергии некоторых связей? Одним из возможных механизмов может быть «титрование» энергии и объема (Somero, Low, 1977). Например, для компенсации увеличения объема при уменьшении количества «упорядоченной» воды одновременно с этим увеличением из глубины белковой макромолекулы (скажем, мономера актина) может выдвигаться группировка, притягивающая воду. В частности, ассоциация субъединиц и удаление воды с поверхностей их контакта при превращении G-актина в F-актин может сопровождаться таким изменением конформации этих субъединиц, при котором в соприкосновение с водой придет заряженная или полярная группа, что приведет к уменьшению объема всей системы (см. рис. 12-2). Процесс экспонирования этой группы должен быть экзотермическим, так как ее гидратация связана с положительным изменением энтальпии (изменение энтропии было бы отрицательным, не благо-

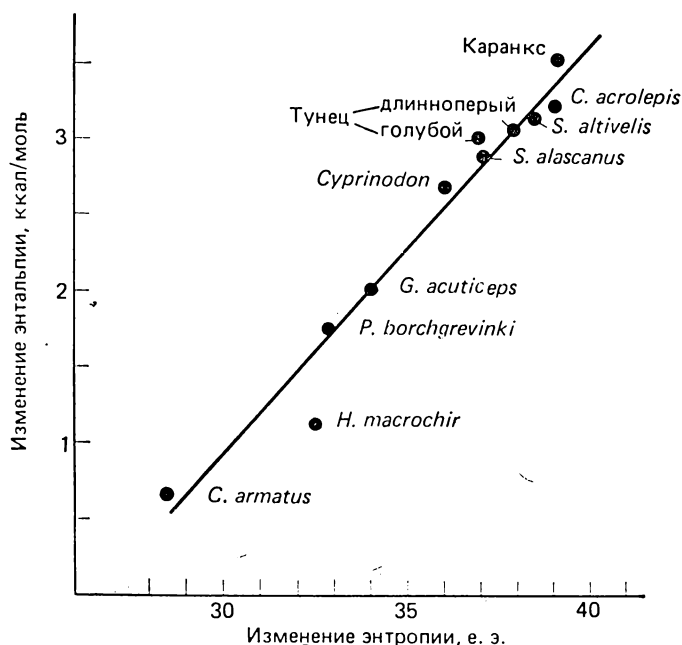


Рис. 12-5. Кривая компенсации, связывающая изменения энтальпии с изменениями энтропии при полимеризации мышечного актина некоторых костистых рыб. Видно, что у наиболее глубоководных рыб (*Halosauropsis macrochir* и *Coryphaenoides armatus*) эти изменения минимальны. Данные для других видов рыб представлены на рис. 11-19. (По Swezey, Somero, 1982a, с изменениями.)

приятствующим процессу). Важно подчеркнуть, что сопряженные перемещения групп при таком «титровании» не обязательно должны происходить в области контакта субъединиц. Изменения энергии, происходящие одновременно с полимеризацией, могут быть обусловлены структурными изменениями в любом участке белковой молекулы.

Связь субъединиц у животных, адаптированных к давлению, не обязательно должна быть «сильнее» в том смысле, что поддержание полимерного состояния обусловлено большей свободной энергией стабилизации. Вместо этого у обитателей разных глубин могут качественно различаться изменения энергии (либо энтальпии, либо энтропии), участвующие в стабилизации полимера; об этом свидетельствуют данные, представленные на рис. 12-5. При низкой температуре и высоком давлении большую роль в обеспечении биохимических реакций могут играть не изменения энтропии, а благоприятные (т. е. отрицательные) изменения энтальпии.



Еще одно замечание относительно структурной адаптации белков касается стабилизации глобулярных белков глубоководных животных. Мы уже сталкивались с подобным механизмом, когда рассматривали возможность повышения сродства ЛДГ глубоководных животных к NADH путем стабилизации «петли» в молекуле фермента. Существуют данные о том, что у двух наиболее глубоководных из всех изученных рыб — *Coryphaenoides armatus* и *Halosaurus macrochir* — третичная структура G-актина скелетных мышц сравнительно ригидна. Если принять за показатель такой ригидности термостабильность белка (см. рис. 11-11), то оказывается, что G-актин этих двух видов рыб столь же стабилен, как и G-актин термофильной пустынной ящерицы *Dipsosaurus dorsalis*, у которой температура внутренних областей тела достигает 47°C. Таким образом, повышенное гидростатическое давление, как и высокая температура тела, может способствовать отбору белков с жесткой структурой.

### Адаптация липидных систем

Изменения липидных систем организма (в частности, мембран) при действии температуры и давления в некоторых отношениях очень сходны с изменениями белковых систем. Липидные структуры, подобно ферментным белкам, могут выполнять свои биологические функции, лишь находясь в «полустабильном» состоянии. Так же как и у белков, это тонкое равновесие между стабильностью и гибкостью структуры легко нарушается при изменениях физических факторов среды. Как уже говорилось в гл. 11, липидные компоненты клеток, по-видимому, лучше всего функционируют в «жидкокристаллическом» состоянии. Понижение температуры может приводить к нарушению функции систем, связанных с липидами (например, мембранных транспортных белков), вследствие перехода липидов из жидкокристаллического состояния в твердое или же локального «вымораживания» мембранных фосфолипидов.

Влияние давления на липидные системы изучено меньше, чем эффекты температуры, однако можно полагать, что оно достаточно для создания определенных трудностей глубоководным организмам. Поскольку гидростатическое давление способствует затвердеванию липидов, одновременное воздействие высокого давления и низкой температуры (характерное для среды обитания глубоководных животных) могло бы серьезно нарушать функции клеточных компонентов, требующие сравнительно жидкого состояния липидов. Повышение температуры плавления липидов при высоких давлениях легко можно связать с изменением объема. Поскольку в твердом состоянии цепи жирных кислот упакованы плотнее, чем в жидком, гидростатическое

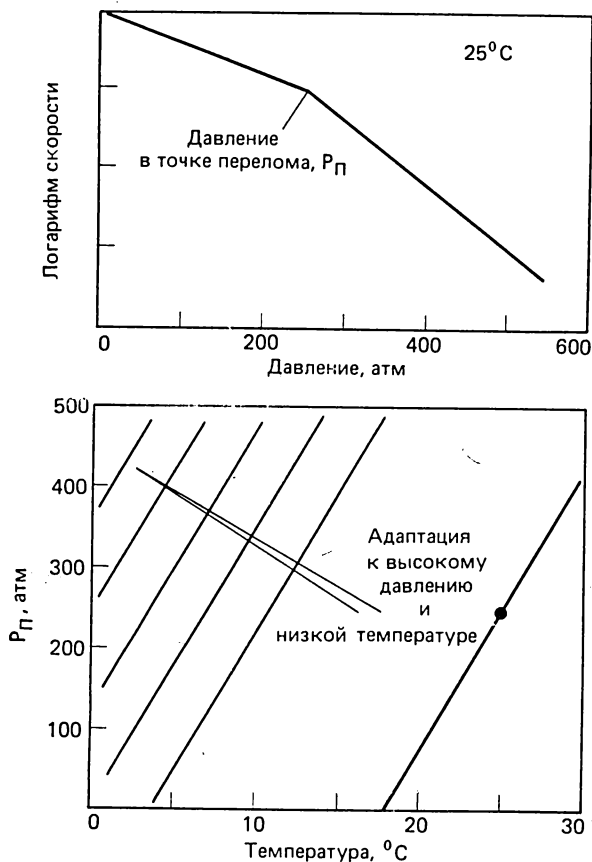


Рис. 12-6. Влияние температуры и давления на активность Na/K-АТФазы из почки свиньи. *Вверху*: влияние давления на скорость реакций при 25°C. Виден перелом на кривой зависимости скорости от давления, соответствующий примерно 250 атм. Полагают, что при этом «давлении перелома» ( $P_n$ ) происходит перестройка липидов, окружающих белковую молекулу Na/K-АТФазы. «Отверждение» фосфолипидов, наступающее при увеличении давления или снижении температуры, приводит к повышению энергии активации и объема активации. *Внизу*: зависимость  $P_n$  от температуры. Жирная линия, точка на которой соответствует  $P_n$  верхнего графика ( $P_n$  при 25°C), отражает зависимость  $P_n$  от температуры для Na/K-АТФазы из почки свиньи. Параллельные прямые слева показывают возможные изменения этой зависимости при адаптации к температуре и давлению. Например, адаптация к условиям больших глубин — к низкой температуре (около 2°C) и высокому давлению — должна облегчаться при смещении прямой вверх и влево, так как при этом мембранные фосфолипиды оставались бы в жидкокристаллическом состоянии даже на больших глубинах. (Данные для Na/K-АТФазы из почки свиньи взяты из работы de Smedt et al., 1979.)

давление должно сильно способствовать «замерзанию» липидных систем.

На рис. 12-6 показано совместное действие давления и температуры на мембранный фермент, зависимый от фосфолипидов, — Na/K-АТФазу из почки свиньи. Верхний график иллюстрирует влияние давления на скорость реакции. Когда давление превышает определенную величину, наклон кривой Аррениуса изменяется; сходный эффект проявляется и на кривой зависимости функции мембранных ферментов от температуры. Если давление выше этой «переломной» величины ( $P_n$ ), энтальпия активации реакции возрастает. Возможно, это связано с «твердым» состоянием фосфолипидов в микроокружении фермента. Для того чтобы фермент смог изменить свою конформацию или внутримембранную ориентацию в процессе переноса ионов, «твердые» фосфолипиды должны «расплавиться». Величина  $P_n$  сильно зависит от температуры (см. рис. 12-6, *внизу*). Таким образом, имеется выраженный синергизм между влиянием на липидные системы пониженной температуры и повышенного давления. Следует отметить, что липиды данной ферментной системы млекопитающего при температурах и давлениях, существующих на больших глубинах, перешли бы в «твердое» состояние: при температуре около 18°C  $P_n$  становится равным 1 атм. Если для того, чтобы многие мембранные ферменты глубоководных животных могли нормально функционировать, они должны быть окружены жидкими липидами, то необходимость адаптивных изменений вязкости этих липидов очевидна. Теоретические кривые зависимости  $P_n$  от температуры для глубоководных животных приведены на рис. 12-6 *внизу*. Необходимо, разумеется, выяснить, верны ли эти кривые для естественных условий. Важные данные можно было бы получить при изучении состава жирных кислот в фосфолипидах мембран у глубоководных организмов. Содержатся ли в таких фосфолипидах главным образом полиненасыщенные жирные кислоты (как у животных, адаптированных к холоду)?

Хотя данные о липидном составе активных мембран глубоководных организмов весьма скудны (см. Patton, 1975), при изучении влияния давления на поведенческие и физиологические особенности организма в целом были получены веские доводы в пользу адаптации к давлению на уровне мембран. Так, например, Брауэр и др. (Brauer et al., 1980a, b) установили, что изменения поведенческих реакций и систем обмена натрия при повышении давления существенно различаются у мелководных и глубоководных бокоплавов Байкала (глубины до 1400 м). У глубоководных бокоплавов наблюдалась выраженная адаптация к давлению, связанная, по всей вероятности, со свойствами мембран. При электрофизиологических исследованиях на препа-

ратах животных, не адаптированных к давлению, обычно оказывалось, что повышение давления приводит к серьезному нарушению функций мембран (обзор: Wann, Macdonald, 1980). Таким образом, как и в случае температурной адаптации, при адаптации к давлению изменение клеточных мембран может играть важнейшую роль.

### **Интенсивность метаболизма у глубоководных животных: совместное влияние физических и биологических факторов**

До сих пор мы обсуждали главным образом адаптации, благодаря которым глубоководные животные способны переносить высокое давление и низкую температуру среды. Эти адаптации обеспечивают саму возможность протекания метаболических процессов на больших глубинах, но не определяют скорость этих процессов. Для того чтобы понять, от чего зависит интенсивность метаболизма у глубоководных животных, нужно учитывать не только влияние давления и температуры, но и ряд других факторов среды — особенности пищи и ее распределение, отсутствие света, наличие или отсутствие течений. Все эти факторы играют важнейшую роль в формировании глубоководных организмов.

1. *Интенсивность метаболизма у животных в типичных глубоководных условиях.* Прежде всего нам нужно рассмотреть имеющиеся данные о скорости метаболических процессов у глубоководных организмов. В последние годы был выполнен ряд изощренных работ по измерению потребления кислорода глубоководными животными в природных условиях (Smith, Hessler, 1974; Smith, 1978). Важные данные были получены также исследователями, которым удалось извлечь интактных глубоководных животных и изучить их в лаборатории (Childress, 1975, 1977; Quetin, Childress, 1976; Torres et al., 1979). Все эти исследования приводят к общему выводу, что у глубоководных животных — как рыб, так и беспозвоночных — уровень метаболизма значительно ниже, чем у обитателей малых глубин. Зависимость потребления кислорода от верхнего предела глубины обитания<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Верхний предел глубины обитания обычно используют как показатель «глубоководности» того или иного животного. По-видимому, этот показатель более надежен, чем средняя или максимальная глубина обитания (Childress, Nygaard, 1973). Дело в том, что представители многих видов, живущих на средних глубинах, совершают вертикальные миграции и во время пребывания на малой глубине могут получать более обильную и калорийную пищу, чем представители немигрирующих видов. Поскольку на физиологические и биохимические особенности морских животных очень сильно влияют количество и распределение пищи, а также необходимость интенсивно передвигаться (об этом мы будем говорить подробнее в настоящем разделе), было бы ошибкой

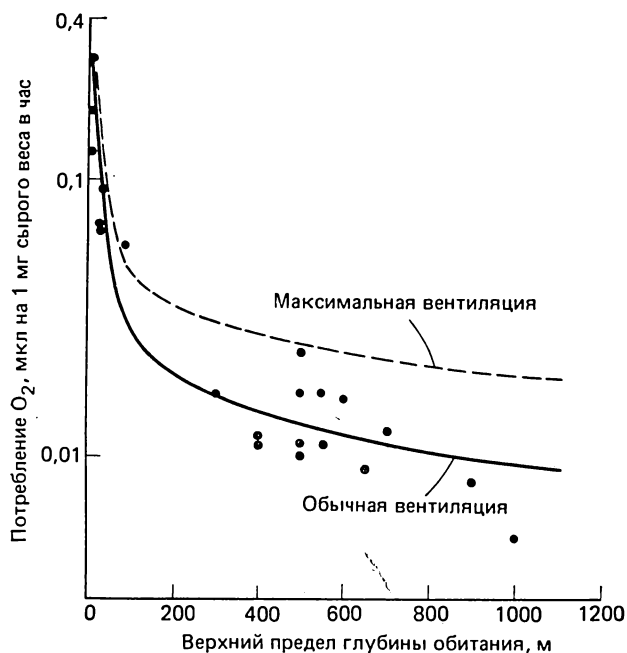


Рис. 12-7. Связь между обычным (сплошная кривая) и максимально интенсивным (прерывистая кривая) дыханием и верхним пределом глубины обитания для некоторых видов костистых рыб, живущих на средних глубинах. (Из Somero, 1982, по данным Torres et al., 1979.)

у морских рыб показана на рис. 12-7. Видно, что у глубоководных рыб потребление кислорода намного ниже, чем у мелководных. Поскольку такое низкое потребление  $O_2$  наблюдается у глубоководных рыб как при давлении, характерном для их обычной среды обитания, так и при 1 атм (см. Torres et al., 1979), малую интенсивность обмена у них нельзя объяснить прямым тормозящим действием давления. Какие же главные эволюционные факторы способствовали «настройке» организма на столь низкую интенсивность энергетического обмена?

2. *Факторы отбора на низкую интенсивность метаболизма в глубоководных условиях.* Для того чтобы понять, почему скорость обменных процессов у глубоководных животных (особенно у пелагических видов) настолько мала по сравнению с мелко-

---

объединять в одну группу представителей мигрирующих и немигрирующих видов, средняя глубина обитания которых (по крайней мере в определенное время суток) может быть одинаковой.

водными, полезно сначала задаться вопросом: а какие факторы делают необходимой *высокую* интенсивность энергетического обмена? Если читатель усвоил те выводы, к которым мы пришли в главах о метаболизме при нагрузке и о биохимических процессах в мышцах, то он должен найти один возможный ответ на этот вопрос. Дело в том, что образ жизни тех животных, которым часто приходится быстро передвигаться, требует больших энергозатрат. При переходе от полного покоя к максимально интенсивному «бросковому» плаванию затраты энергии могут возрастать примерно в 100 раз (Brett, Groves, 1979). Всего лишь несколько эпизодов такого максимально быстрого плавания могут потребовать больше калорий, чем вся остальная жизнедеятельность в течение суток, когда животное передвигается медленно или не передвигается вовсе. Большие затраты энергии нужны не только для самих «бросков», но и для того, чтобы постоянно поддерживать мощный двигательный аппарат. Так, для сохранения высоких концентраций гликолитических ферментов необходима высокая скорость синтеза белков. Отсюда становится ясно, что в среде, где локомоторная активность может быть сведена к минимуму, затраты энергии тоже могут быть минимальными. Именно такой средой по ряду причин являются морские глубины.

Одним из важнейших факторов, определяющих локомоторную активность глубоководных животных, служит характер пищи. Чем больше глубина, тем более скудны пищевые ресурсы. На больших глубинах не только уменьшается общее количество пищи, но (что, наверное, столь же важно с точки зрения оптимальной «конструкции» глубоководных животных) и распределение источников пищи в пространстве и времени затрудняет их поиск. Вряд ли глубоководным пелагическим рыбам или беспозвоночным было бы выгодно затрачивать много энергии на поиски в темноте случайных пищевых объектов, опускающихся из эвфотической зоны. Некоторые глубоководные рыбы все же, по-видимому, активно плавают, разыскивая пищу (хотя их двигательная активность не идет ни в какое сравнение с плаванием таких рыб, как тунцы). Однако для большинства глубоководных животных характерна «выжидательная» стратегия, при которой затраты энергии на передвижение снижаются до крайне низкого уровня. Тело у таких животных обычно мягкое, в нем повышено содержание воды, а скелет очень хрупкий. Эти особенности выгодны в двух отношениях. Во-первых, стратегия пищевого поведения таких животных позволяет уменьшить содержание органических компонентов в их тканях, и таким образом еще больше снизить уровень поддерживающего метаболизма. Во-вторых, редукция скелетных элементов и повышенное содержание воды в организ-

ме облегчают приближение к нейтральной плавучести, что уменьшает потребность в мышечных усилиях для противодействия силе тяжести. Такая «адаптация плавучести», по-видимому, тесно связана со многими изменениями в составе тканей, направленными на уменьшение энергозатрат. Действительно, важной побочной выгодой приспособительных механизмов, служащих в основном для редукции двигательного аппарата, является снижение затрат энергии на поддержание нейтральной плавучести (подробнее эти особенности глубоководных животных обсуждаются в работе Marshall, 1979).

На двигательную активность глубоководных животных влияет не только количество, качество и распределение пищи. На больших глубинах нет света (за исключением биолюминесценции), и с точки зрения локомоторной активности это «палка о двух концах». В темноте труднее найти пищу, однако меньше и вероятность быть обнаруженным хищниками, а значит, и необходимость спастись бегством. Эти два фактора, связанные с отсутствием света на больших глубинах, не благоприятствуют выработке способности к быстрому плаванию. Кроме того, в большинстве глубоководных зон нет сильных течений, и это тоже уменьшает потребность в быстром плавании. Таким образом, низкая интенсивность метаболизма у глубоководных животных, по-видимому, не обусловлена влиянием повышенного давления или низкой температуры (достаточно вспомнить сильно выраженную холодовую адаптацию интенсивности обмена у полярных рыб, обитающих на небольших глубинах). В глубоководной зоне действует и ряд других факторов, препятствующих отбору на высокую двигательную активность с соответствующими затратами энергии. Теперь нам следует рассмотреть, какие механизмы способствуют снижению метаболизма у глубоководных животных, и выяснить, снижен ли он только в двигательных органах, как это следовало бы из приведенных выше рассуждений, или во всех тканях.

3. *Адаптивные механизмы, снижающие интенсивность обмена у глубоководных животных.* В белой мускулатуре большинства глубоководных рыб сильно снижена активность гликолитических ферментов, ответственных за энергообеспечение мышечного сокращения (рис. 12-8), и это служит, по-видимому, непосредственной причиной уменьшения затрат энергии на локомоторную активность. У некоторых глубоководных рыб активность лактатдегидрогеназы (лучший показатель способности мышц к выполнению интенсивной работы) на три порядка ниже, чем у таких выдающихся пловцов, как теплокровные тунцы. Активность пируваткиназы тоже снижается по мере увеличения наименьшей глубины обитания, хотя и не столь значительно, как активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

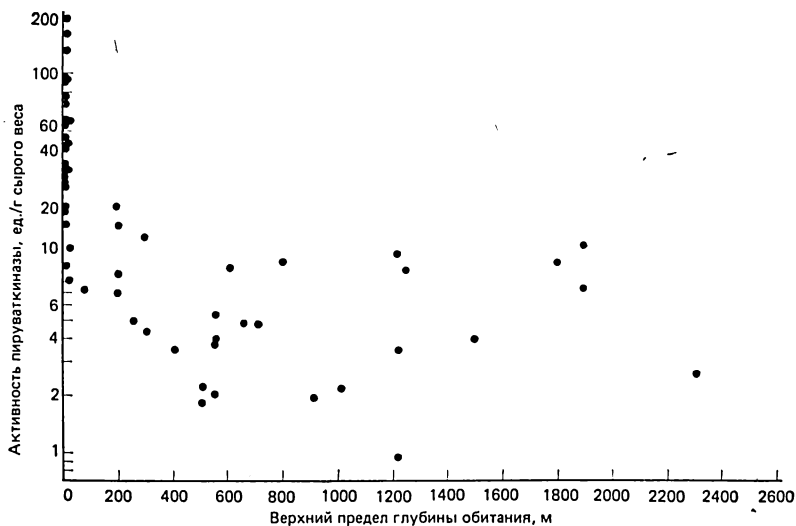
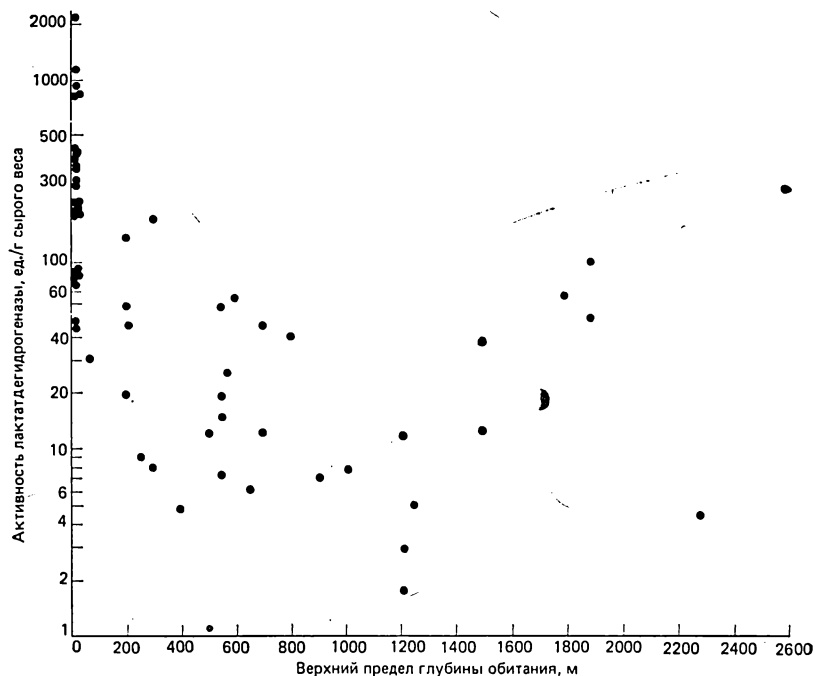


Рис. 12-8. Связь между минимальной глубиной обитания рыб и активностью лактатдегидрогеназы (*вверху*) и пируваткиназы (*внизу*) в их белой скелетной мускулатуре. Активность оценивалась в микромолях субстрата, превращаемых в продукт за 1 мин при 10 °C в пересчете на 1 г сырого веса мышечной ткани. (По Sullivan, Somero, 1980, с изменениями.)



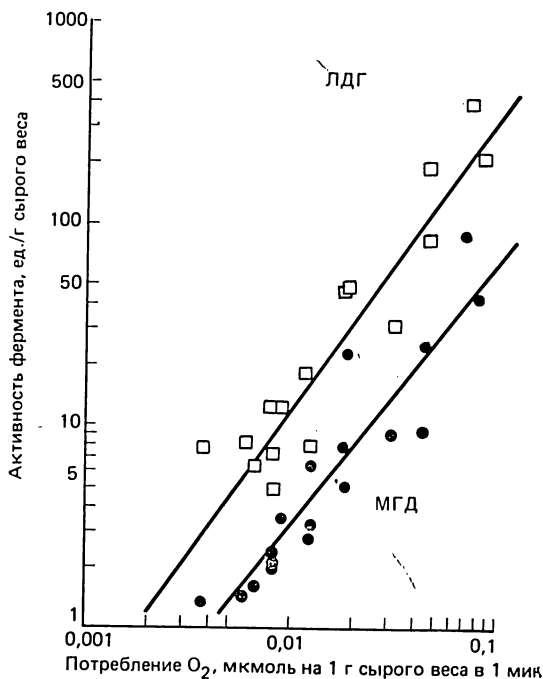


Рис. 12-9. Связь между обычным уровнем потребления кислорода и активностью лактатдегидрогеназы (квадратики) и малатдегидрогеназы (кружки) в скелетных мышцах у рыб, обитающих на средних глубинах. (По Childress, Somero, 1979, с изменениями.)

Важное отклонение от общей тенденции к снижению активности ЛДГ и пируваткиназы с глубиной было обнаружено у неидентифицированной рыбы из сем. *Zoarcidae*, живущей исключительно в области гидротермальных источников (21° с. ш.) на глубине около 2600 м. У этой рыбы активность ЛДГ и пируваткиназы намного выше, чем у других глубоководных рыб (см. табл. 12-2, а также точки, соответствующие 2600 м, на рис. 12-8). В дальнейшем мы узнаем, что благодаря высокой плотности биомассы (т. е. обилию пищи) у животных, обитающих вблизи гидротермальных источников, возможна высокая интенсивность метаболизма и (у подвижных форм) значительная локомоторная активность.

Учитывая, что ЛДГ и пируваткиназа — это гликолитические ферменты, обеспечивающие анаэробный гликолиз во время «броскового» плавания, можно задаться вопросом: правомерно ли использование активности этих ферментов как показателя общего аэробного метаболизма у рыб? Данные, представлен-

Таблица 12-2. Активность ферментов в белой скелетной мускулатуре и головном мозгу, а также содержание воды, концентрация белков и буферная емкость в мышечной ткани морских рыб, обитающих на разных глубинах и различающихся особенностями питания и локомоторной активности

Исследованный материал	Активность ферментов <sup>1)</sup>				Содержание H <sub>2</sub> O, % <sup>2)</sup>	Содержание белков <sup>3)</sup>	Буферная емкость <sup>4)</sup>
	лактаде- гидрогеназа	пируват- киназа	малатдегид- рогеназа	цитрат- синтаза			
<b>Мышцы</b>							
<b>Группа I: теплокровные рыбы</b>							
<i>Thunnus alalunga</i>	2100	192		5,45		218	107
<i>Auxis thazard</i>	1186						109
<i>Thunnus albacares</i>	998					194	105
<i>Euthynnus lineatus</i>	788					184	102
$\bar{X}$	1268						
<b>Группа II: мелководные экто- термные рыбы</b>							
<i>Medialuna californiensis</i>	981	125	23	0,70	75,6	198	63
<i>Engraulis mordax</i>	540	60	61	1,52	80,8		71
<i>Salmo gairdneri</i>	575						60
<i>Sphyræna ensis</i>	512						63
<i>Phanerodon furcatus</i>	414	90	77	0,71	77,3	251	66
<i>Atherinops affinis</i>	412	107	20		77,2	222	
<i>Paralabrax nebulifer</i>	397	71	21	0,52	75,6	211	62
<i>Paralabrax clathratus</i>	389	75	23	0,79	77,4	200	62
<i>Chromis punctipennis</i>	388	92	51	0,85	77,8	230	62
<i>Rhacochilus toxotes</i>	351	42	63	1,15	78,5	211	
<i>Gillichthys mirabilis</i>	321	28	26	0,90			60
<i>Paralabrax maculatofaciatus</i>	287	41		0,50			
<i>Genyonemus lineatus</i>	267	88		0,67			
<i>Caulolatilus princeps</i>	209	32	32	0,50	80,8	213	59
<i>Squalus acanthias</i>	182	58	18	0,56	69,5	166	
<i>Sebastes mystinus</i>	116	72		0,74			
<i>Scorpaena guttata</i>	77	15		0,25			52
$\bar{X}$	378	60	38	0,74	77,1	211	62

Группа III: глубоководные рыбы

<i>Histiobranchus bathybius</i>	156	19	7	0,35	103	42
<i>Coryphaenoides acrolepis</i>	154	10	9	0,31	103	42
<i>Coryphaenoides armatus</i>	153	21	16	0,97	151	
<i>Anoploroma fimbria</i>	107	16	16	0,48	112	
<i>Paraliparis rosaceus</i>	66	10		0,10	93,9	
<i>Antinora rostrata</i>	36	10	7	0,37	102	44
<i>Coryphaenoides carapinus</i>	15	9	7	1,10	147	
<i>Halosaurusopsis macrochir</i>	12	4	3	0,41	124	48
<i>Nezumita bairdii</i>	9	5	9	0,82	165	46
<i>Coryphaenoides leptolepis</i>	5	4	4	0,40	139	46
<u>X</u>	71	11	9	0,53	130	45

<0,001

<0,001

Недостоверна

<0,001

<0,001

Разница между II и III (P)

Группа IV: рыбы из области гидротермальных источников

Неидентифицированная рыба сем. Zoarcidae (21° с. ш.)

Мозг

<i>Medialuna californiensis</i>	35	21		2,88		
<i>Paralabrax nebulifer</i>	35	22		1,75		
<i>Paralabrax clathratus</i>	36	20		1,87		
<i>Chromis punctipennis</i>	32	19		2,65		
<i>Genyonemus lineatus</i>	18	14		1,60		
<i>Caulolatilus princeps</i>	31	19		1,88		
<i>Scorpaena guttata</i>	31	17		1,40		
<i>Coryphaenoides acrolepis</i>	36	12		1,46		
<i>Anoploroma fimbria</i>	40	16		1,65		
<u>X</u>	33	18		1,90		

1) Активность ферментов выражена в международных единицах на 1 г сырого веса ткани при 10 °C. (По данным Sullivan, Somero, 1980; Castellini, Somero, 1981; Somero, неопубликованные данные.)

2) Содержание воды приведено в процентах сырого веса ткани. (По данным Sullivan, Somero, 1980.)

3) Содержание белков выражено в миллиграммах на 1 г сырого веса ткани. (По данным Sullivan, Somero, 1980; K. L. Dickson, неопубликованные данные.)

4) Буферная емкость выражена в микромолях основания, необходимых для изменения pH 1 г мышечной ткани на 1 в диапазоне pH примерно от 6 до 7. (По данным Castellini, Somero, 1981.)

ные на рис. 12-9, показывают, что этот показатель вполне надежен. Если измерить потребление кислорода и активность лактат- и малатдегидрогеназы в белых мышечных волокнах рыб одних и тех же видов, а затем построить такие кривые, как на рис. 12-9, то можно выявить сильную корреляцию между активностью гликолитических ферментов и потреблением  $O_2$ . Такая связь между анаэробными ферментами типа ЛДГ и аэробным метаболизмом обусловлена тем, что после образования лактата в результате анаэробных процессов потребуется — рано или поздно, в той или иной ткани — дополнительное потребление кислорода (если только лактат не будет экскретироваться, что весьма маловероятно). Лактат, образующийся во время «броскового» плавания, обычно либо снова превращается в гликоген, либо окисляется в пируват, который в дальнейшем используется в цикле Кребса. Таким образом, если подходить к функции ЛДГ с учетом реальных временных и пространственных функциональных отношений в организме, не покажется удивительным, что активность этого фермента может служить показателем общего аэробного метаболизма. Следует отметить, что такая корреляция между активностью ЛДГ в мышцах и суммарным потреблением кислорода удобна с методической точки зрения, так как она позволяет изучать метаболизм у тех глубоководных рыб, которых нельзя содержать живыми (или в достаточно хорошем состоянии) в лаборатории для исследования дыхания. Поскольку активность ЛДГ долго не изменяется даже при длительном хранении замороженных мышц, ее измерение может служить полезным непрямым методом оценки потребления  $O_2$  животными, которых нельзя поместить в респирационную камеру.

Хотя у глубоководных рыб интенсивность метаболизма, как правило, намного ниже, чем у обитателей верхних слоев воды, у них наблюдается большой разброс ферментативной активности, а значит, и интенсивности обменных процессов (см. рис. 12-8 и табл. 12-2). По-видимому, этот разброс может быть обусловлен различиями в стратегии питания и локомоторной активности (Sullivan, Somero, 1980; Siebenaller et al., 1982). Это дополнительно подкрепляет гипотезу о том, что затраты энергии на передвижение в значительной мере определяют «конструкцию» организма у глубоководных видов. Особенно показательны в этом отношении сравнительно высокие (для глубоководных рыб) величины ферментативной активности у *Coryphaenoides acrolepis* и *C. armatus*. Эти пелагические рыбы энергично плавают в поисках пищи и совершают довольно большие вертикальные передвижения, что может быть связано с затратой значительной энергии. Этим они отличаются от более оседлых глубоководных видов, у которых активность ЛДГ в мышцах на

порядок меньше. *C. acrolepis* и *C. armatus* живут на разных глубинах (см. рис. 12-4), однако активность ферментов у них сходна, и это означает, что глубина обитания сама по себе не является главным фактором, определяющим эту активность у глубоководных рыб. Данные, приведенные в табл. 12-2 и на рис. 12-7, позволяют нам заключить, что интенсивность метаболизма у всех изученных глубоководных рыб (к ним относятся рыбы, верхний предел глубины для которых составляет примерно 200 м или больше) варьирует так же, как и у мелководных, хотя по ее абсолютным значениям эти две группы резко отличаются друг от друга. Межвидовые различия в интенсивности метаболизма внутри каждой из двух групп, так же как и между группами, в целом, по-видимому, обусловлены главным образом особенностями питания и локомоторной активности.

Разница между глубоководными и мелководными рыбами прослеживается и на более тонком уровне при сравнении родственных видов, обитающих на разных глубинах. Активность мышечных ферментов у *Sebastolobus altivelis* примерно в два раза меньше, чем у мелководной рыбы того же рода — *S. alascanus* (табл. 12-3). Сравнение видов одного рода, живущих на разных глубинах, позволяет особенно четко выявлять влияние глубины на различные признаки организма. Различия в активности мышечных ферментов у *S. altivelis* и *S. alascanus* обусловлены двумя механизмами (Siebenaller, Somero, 1982). Активность ЛДГ в пересчете на 1 г мышечной ткани у этих видов различается примерно в два раза, и это можно объяснить различием в числе оборота фермента. Активность пируваткиназы в мышцах этих двух видов тоже различна, однако в данном случае это связано, по-видимому, с разницей в содержании фермента, так как число оборота у обоих видов одинаково. Причины различий в активности малатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы и цитратсинтазы у этих двух видов пока не выяснены. Изучение ЛДГ и пируваткиназы позволяет заключить, что примерно двукратная разница в активности этих ферментов у разных видов, так же как и постоянное соотношение активности различных ферментов в мышцах одного и того же вида, может быть обусловлена двумя причинами — разницей в каталитической эффективности и в концентрации ферментов. Таким образом, пониженный уровень метаболизма у глубоководных животных может быть связан как с «качественной», так и с «количественной» стратегиями биохимической адаптации, с которыми мы сталкивались на протяжении всей этой книги.

Большим различиям в активности мышечных ферментов соответствуют и различия по другим свойствам мышц — не столь выраженные, но достоверные (табл. 12-2). В мышцах глубоководных рыб меньше белка, но больше воды. Следует отметить.

Таблица 12-3. Биохимические особенности мышц и мозга *Sebastolobus alascanus* и *S. altivelis*  
(По данным Siebenaller, Somero, 1982)

	Активность ферментов, ед./г сырого веса¹)					Содержание белка, мг/г²	Содержание воды, % сырого веса³)	Буферная емкость, слабок³)
	креатин-фосфокиназа	малатдегидрогеназа	лактатдегидрогеназа	пируваткиназа	цитратсинтаза			
Мышцы								
<i>S. alascanus</i>	119	5	58	7	0,35	149	81,2	47,4
<i>S. altivelis</i>	75	3	26	4	0,19	152	81,6	43,0
Мозг								
<i>S. alascanus</i>			35	23	1,6			
<i>S. altivelis</i>			31	29	1,6			

1) Активность всех ферментов в мышцах *S. alascanus* и *S. altivelis* достоверно различается ( $P < 0.001$ ), а в мозге нет.  
2) Достоверных межвидовых различий в содержании белка и воды нет.  
3) Буферная емкость достоверно различна ( $P < 0.01$ ).

что содержание белков у этих рыб лишь на 30—40% меньше, чем у мелководных, тогда как активность ЛДГ и пируваткиназы может быть снижена в 1000 раз. Это означает, что уменьшение содержания ферментов — специфический механизм адаптации, который не обусловлен просто уменьшением количества всех белков в мышцах. Снижение содержания сократительных и структурных белков с увеличением глубины обитания может быть значительно меньшим, чем снижение активности ферментов энергетического обмена. В частности, количество актина в скелетных мышцах не коррелирует с глубиной (Swezey, Somero, 1928b). Уменьшение способности к анаэробному гликолизу сопровождается значительным снижением буферной емкости мышц (табл. 12-2). В разделе о биохимических процессах при физической нагрузке (см. рис. 4-3) мы говорили о том, что способность к образованию лактата (показателем которой служит активность ЛДГ) тесно коррелирует с буферной емкостью цитозоля мышечных клеток. В связи с этим низкая буферная емкость у глубоководных рыб не вызывает удивления. Буферные свойства мышц снижаются примерно на столько же, насколько уменьшается содержание в них белков, и это позволяет предполагать, что у глубоководных рыб снижается емкость именно буферных систем.

Рассматривая интенсивность обмена у глубоководных животных, мы говорили в основном о затратах энергии, связанных с локомоцией, и о соответствующей мускулатуре. Тем не менее, хотя на долю скелетных мышц обычно приходится у рыб 45—60% общей массы тела, обсуждение этой темы было бы неполным, если бы мы не коснулись и метаболизма других тканей. В табл. 12-2 приводятся данные об активности ферментов в ткани головного мозга у ряда мелководных и глубоководных рыб, сильно различающихся по образу жизни и двигательной активности. Из этих данных видно, что выводы, основанные на изучении метаболизма и ферментных систем мышц, не приложимы к мозгу. Так, например, удельная активность ферментов в мозгу у всех исследованных рыб примерно одинакова. Разумеется, это не противоречит изложенной здесь гипотезе о связи интенсивности обмена с локомоцией. На долю мозга приходится у рыб лишь ничтожная часть общей массы тела, и хотя мы не располагаем надежными данными о том, какой вклад вносит мозг в общий метаболизм, этот вклад наверняка очень мал. Поэтому снижение метаболизма в головном мозгу не может, по видимому, существенно уменьшить общие энергозатраты глубоководной рыбы. Уменьшение же массы мозга с целью сбережения энергии за счет нейтральной плавучести тоже маловероятно: головной мозг богат липидами, поэтому плотность его

невелика; кроме того, размеры мозга у рыб малы по сравнению с массой мышц и скелетом.

Итак, биохимические системы глубоководных животных и обитателей небольших глубин различны как в количественном, так и в качественном отношении. Приспособительные изменения белков, благодаря которым возрастает их устойчивость к гидростатическому давлению, облегчают выживание на больших глубинах. Адаптивные сдвиги содержания ферментов энергетического обмена в локомоторной мускулатуре обеспечивают именно такую двигательную и метаболическую активность, которая необходима для жизни в темной и бедной пищевыми ресурсами среде. Таким образом, типичные пелагические глубоководные животные, видимо, отлично приспособлены к своему неторопливому образу жизни; что касается донных животных, то они очень плохо изучены в физиологическом и биохимическом плане, и мы почти ничего не знаем об особенностях их метаболизма.

#### Гидротермальные источники — область обильной жизни на больших глубинах

Картина глубоководной зоны и ее обитателей, которую мы набросали в предыдущих разделах этой главы, до недавнего времени считалась типичной для всех больших глубин. Однако в 1977 г. океанографическая экспедиция, изучавшая область гидротермальных выходов на морском дне близ Галапагосских островов, впервые натолкнулась на сообщество организмов, противоречившее всем прежним представлениям о глубоководной жизни. Вокруг трещин в дне, из которых выходили струи горячей воды особого химического состава, с необычно высокой плотностью расселялись многие виды беспозвоночных, в том числе двустворчатые моллюски, ракообразные, актинии и, что самое удивительное, гигантские погонофоры *Riftia pachyptila* Jones (Jones, 1981; Corliss et al., 1979). Эти червеобразные животные, не имеющие ни рта, ни кишечника, достигали метра и более в длину, и в области галапагосских гидротермальных источников на их долю приходилась значительная часть общей биомассы животных.

Когда у Галапагосских островов, а затем и в других участках зоны спрединга в восточной части Тихого океана (Spiess et al., 1980) обнаружили высокую плотность животной биомассы на глубинах 2500—2600 м, где в сообществе доминировали крупные организмы без пищеварительной системы, перед биологами встал ряд чрезвычайно интересных вопросов о способах питания членов такого сообщества. Какие источники пищи обеспечивают создание столь плотных популяций на таких больших



глубинах? Каким образом животные вроде *R. pachyptila* могут удовлетворять свои метаболические потребности, не обладая органами, позволяющими поглощать крупные органические частицы? Кто кому служит пищей в этих сообществах? Какова интенсивность метаболических процессов у этих животных по сравнению с типичными глубоководными животными и обитателями малых глубин? Мы еще не так хорошо изучили гидротермальные сообщества, чтобы подробно ответить на эти и некоторые другие вопросы, однако мы уже накопили достаточно данных, чтобы создать по меньшей мере ориентировочную модель пищевых взаимоотношений внутри таких сообществ. Кроме того, особенности этих организмов, может быть, и не укладываются в общие представления о типичной глубоководной жизни, однако они лишь еще больше подтверждают те важнейшие правила адаптации, которые мы рассмотрели в настоящей главе. Это особенно касается закономерностей, объясняющих метаболические и биохимические особенности организмов характером пищевых ресурсов.

### Свойства воды гидротермальных источников

Для того чтобы понять биохимическую организацию животных, обитающих вблизи глубоководных горячих источников, и особенно те черты этой организации, которые связаны с пищевыми взаимоотношениями, необходимо сначала рассмотреть физические и химические свойства воды этих источников. Эта вода представляет собой сильно видоизмененную океаническую воду (см. цифровые данные на рис. 12-10). Когда вода проходит через пористое дно океана в области спрединга, она на некотором расстоянии от поверхности дна соприкасается с горячими скальными породами и претерпевает значительные химические изменения. В дальнейшем эта вода выходит обратно и смешивается с холодной водой придонных слоев. Физические и химические свойства выходящей воды частично зависят от того, в какой степени она смешивается с обычной морской водой перед тем, как выйдет на поверхность дна. В источниках типа «черных курильщиков» (рис. 12-10) вода выходит из высоких труб, образованных веществами, осаждающимися из горячей воды при ее контакте с холодной. Температура воды здесь составляет около 350—360 °C (Spiess et al., 1980; Edmond et al., 1982). Источники такого типа отличаются тем, что в океан выбрасывается практически неразбавленная («первичная») вода (Edmond et al., 1982). В воде этих источников нет кислорода и нитратов, но в ней содержится сероводород ( $\text{HS}^-$ ) в миллимолярных концентрациях. Ясно, что такая среда непригодна для обычной жизни, и пока неизвестно, могут ли вообще какие-либо

организмы (например, термофильные бактерии) существовать в неразбавленной воде «черных курильщиков».

В большинстве случаев вода термальных источников, прежде чем выйти через поверхность дна, в той или иной степени смешивается с обычной морской водой. Наиболее плотны сообщества морских животных около тех источников, где первичная вода сильно разбавляется (о чем лучше всего свидетельствует

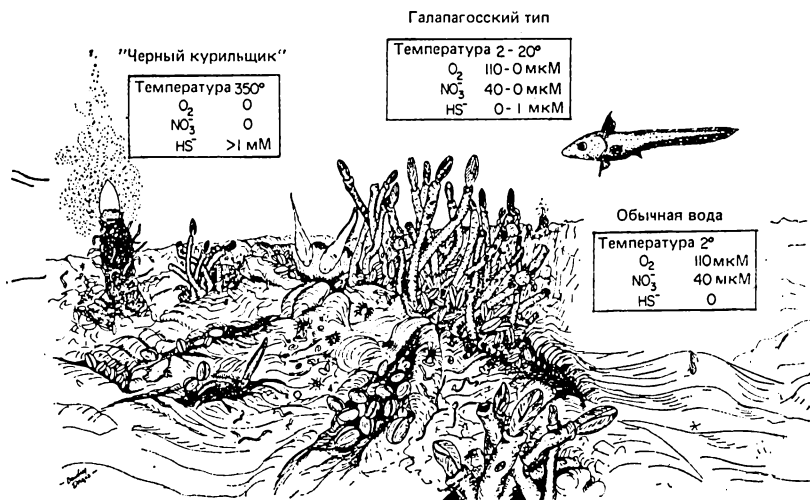


Рис. 12-10. Экосистема гидротермальных источников. На этом обобщенном рисунке изображены важнейшие организмы, живущие около источников галапагосского типа и источников типа «черных курильщиков» и указан состав воды тех и других. (Somero et al., 1983.)

ее сравнительно низкая температура). В источниках галапагосского типа, названных так по месту, где они были впервые обнаружены, в пористых базальтовых породах молодых слоев океанического дна происходит значительное смешивание первичной воды с холодной морской водой, в результате чего температура в области выхода составляет 2—20°C (рис. 12-10). Особенности химического состава воды источников галапагосского типа тоже обусловлены смешиванием; содержание кислорода, нитратов и сероводорода здесь широко варьирует (рис. 12-10).

Какие же особенности воды этих источников обуславливают высокую плотность животных и бактериальных популяций (Karl et al., 1980; Tuttle et al., 1983) около них? Для того чтобы попытаться ответить на этот вопрос, нужно прежде всего рассмотреть роль повышенной температуры. Несмотря на то что у обитающих здесь животных и бактерий внутриклеточная тем-

пература может быть на несколько градусов выше, чем у типичных глубоководных организмов, обилие жизни у гидротермальных источников нельзя объяснить просто тепловым ускорением метаболических процессов. У большинства животных в этих областях температура тела отличается от температуры типичных глубоководных существ лишь на несколько градусов, тогда как интенсивность метаболизма, по-видимому, отличается на порядок.

Еще одна возможная роль высокой температуры в поддержании обилия жизни около термальных источников может быть связана с особым способом доставки пищи. По мере того как нагретая вода, обладающая меньшей плотностью, поднимается от источника, она замещается окружающей придонной водой. В результате такого тока воды органический материал, образующийся в эвфотической зоне и оседающий на морское дно вокруг источника, может концентрироваться около него. Согласно этой модели, циркуляция воды, обусловленная разницей температур, могла бы быть достаточной для того, чтобы, например, фильтрующие организмы могли получать значительно больше пищи, чем в тех глубоководных районах, где такой циркуляции нет.

Мы не знаем, насколько важна в количественном отношении такая доставка питательных веществ для животных и бактерий, обитающих вблизи термальных источников. Однако есть веские данные в пользу того, что в питании важнейших видов таких животных и бактерий восстановленные углеродные и азотистые соединения, образующиеся в эвфотической зоне, играют лишь незначительную роль. Изучение изотопного состава углерода позволяет судить о том, образовалось ли органическое вещество в процессе фотосинтеза или каким-либо иным путем. И такое изучение показало, что первичным источником пищи для погонофор и двусторчатых моллюсков в области горячих источников служат соединения восстановленного углерода, образующиеся *не* в результате фотосинтеза (Rau, 1981; Williams et al., 1981). Таким образом, чтобы объяснить высокую плотность биомассы в этих необычных сообществах, необходимо найти здесь источник энергии, который был бы способен обеспечить высокую интенсивность первичной продукции органического вещества.

#### Сульфид как источник энергии для пищевых сетей гидротермального сообщества

Изучение источников галапагосского типа позволило обнаружить два главных вещества, обеспечивающих высокую интенсивность первичного образования органического материала.

В воде этих источников (см. рис. 12-10) содержатся как богатые энергией молекулы  $\text{HS}^-$ , так и кислород, необходимый для окисления  $\text{HS}^-$  до  $\text{SO}_4^{2-}$  (сульфата). Это окисление, включающее сложную последовательность ферментативных реакций, приводит к высвобождению энергии, которая может запасаться в виде АТФ и восстановительной силы —  $\text{NAD(P)H}$ . Эти два вида «энергетической валюты» могут использоваться для связывания  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина — Бенсона, а также для восстановления нитрата до ионов аммония. Таким образом, в гидротермальных экосистемах сульфид может играть роль главного заменителя солнечных лучей. Первичными продуцентами — организмами, играющими ту же роль, что и способные к фотосинтезу виды в обычных экосистемах, — являются здесь хемолитотрофные сульфидокисляющие бактерии. Эти бактерии обладают набором ферментов, необходимым для катализа окисления  $\text{HS}^-$  и использования выделяющейся энергии для связывания  $\text{CO}_2$ . Такие бактерии встречаются на поверхности каменистых пород в области гидротермальных источников, на некоторых животных (например, на трубках *Riftia pachyptila*), а также во взвешенном состоянии в воде (Karl et al., 1980; Tuttle et al., 1983). По-видимому, они могут служить пищей для подвижных «пасущихся» животных (например, моллюсков-блюдечек), а также для фильтраторов. Этими животными в свою очередь могут питаться хищные виды — ракообразные, рыбы и т. п.

Эта простая модель пищевых взаимоотношений в гидротермальных экосистемах, по-видимому, в общих чертах верна. Однако остается еще вопрос о способе питания доминирующего представителя экосистемы — *R. pachyptila*. У этого животного нет рта и кишечника, так что оно, видимо, плохо приспособлено для использования соединений восстановленного углерода и азота, которые синтезируются хемолитотрофными сульфидокисляющими бактериями. *R. pachyptila* могла бы захватывать органические питательные вещества, растворенные в воде, но отношение поверхности к объему у этого крупного организма не благоприятствует такому способу питания; к тому же в прямом контакте с морской водой у него находятся только щупальца.

Однако у *Riftia pachyptila* существует иной способ использования биосинтетического потенциала сульфидокисляющих бактерий. Этот способ (рис. 12-11) состоит в том, что *R. pachyptila* не эксплуатирует метаболическую активность бактерий, находящихся в воде, а содержит мощные их колонии в своем организме. Большая часть полости тела *R. pachyptila* заполнена крупным органом — трофосомой, — в состав которого входят бактерии (Cavanaugh et al., 1981; Cavanaugh, 1983) в количестве до одного миллиарда на грамм. На основании данных об активности различных ферментов в трофосоме (Felbeck, 1981; Felbeck

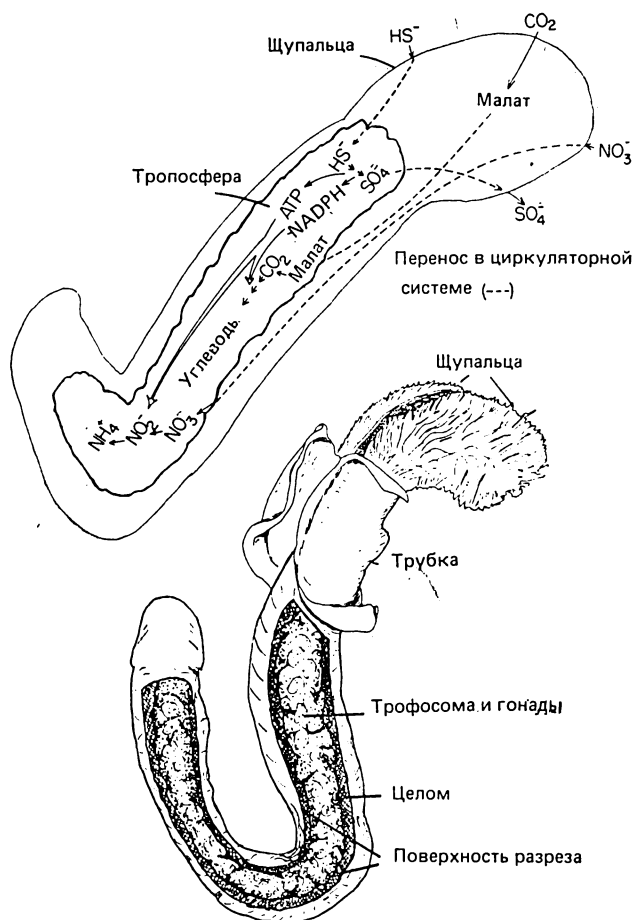


Рис. 12-11. Червеобразное животное *Riftia pachyptila* (Pogonophora), обитающее в области глубоководных гидротермальных источников. *Внизу*: строение тела. Показана трофосома — орган, в котором находятся хемолитотрофные бактерии-эндосимбионты. *Вверху*: метаболические превращения и процессы переноса вещества, связанные с симбиотическими взаимоотношениями. (Felbeck, Somero, 1982.)

et al., 1981; Felbeck, Somero, 1982) была предложена метаболическая модель, представленная в верхней части рис. 12-11. В этой модели источником энергии для синтеза АТФ и создания восстановительной силы служит  $\text{HS}^-$  (пока не известно, могут ли бактерии использовать также метан и водород, присутствующие в воде термальных источников).  $\text{HS}^-$  поглощается из воды поверхностью щупалец, а затем по развитой замкнутой цирку-

ляционной системе доставляется бактериям, обитающим в трофосоме. Эти бактерии-симбионты окисляют  $\text{HS}^-$  до  $\text{SO}_4^{2-}$  (или до других частично окисленных форм серы), и освобождающаяся энергия используется для связывания  $\text{CO}_2$  и синтеза соединений, содержащих восстановленный азот. Углекислота, получаемая из морской воды, по-видимому, включается в четырехуглеродное соединение малат, который затем переносится кровью. Источником азота для синтеза восстановленных азотистых соединений служат нитраты морской воды.

Здесь, как и в случае симбиоза между животными и фотосинтезирующими организмами (см. Felbeck et al., 1983), трудно в точности количественно оценить роль питательных веществ, поставляемых симбионтом для метаболических нужд хозяина. В данном случае тоже оказалось полезным изучение изотопного состава углерода. Было показано (Rau, 1981), что между различными тканями *R. pachyptila* распределен общий пул восстановленного углерода и что отношение  $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$  в этом пуле совершенно иное, нежели у других животных гидротермальной экосистемы и у большинства обитателей малых глубин. Эти данные служат веским доводом в пользу того, что значительную часть потребностей *R. pachyptila* в восстановленном углероде обеспечивают бактерии-симбионты. Для оценки способности этих бактерий синтезировать соединения с восстановленным углеродом важен тот факт, что в трофосоме высока активность ферментов цикла Кальвина — Бенсона. Так, активность самого характерного фермента этого цикла — рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы — в трофосоме примерно такая же, как в свежих листьях шпината (Felbeck, 1981). Это указывает на высокую способность к фиксации  $\text{CO}_2$ .

Открытие симбиоза нового типа между бактериями и *R. pachyptila* заставило искать другие примеры подобного симбиоза между животными и серными бактериями. В глубоководных гидротермальных экосистемах были обнаружены еще два вида животных, в жабрах которых обитают симбиотические бактерии, — это крупный двустворчатый моллюск *Calyptogena magnifica* и неидентифицированный моллюск из того же класса (Cavanaugh, 1983); обнаруженные у них бактерии тоже обладают способностью окислять сульфиды и связывать  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина — Бенсона (Felbeck et al., 1981; Felbeck et al., 1983). Таким образом, доминирующие двустворчатые моллюски геотермальных экосистем так же, как и *R. pachyptila*, могут частично обеспечиваться восстановленным углеродом и азотом благодаря деятельности бактерий-симбионтов.

Подобного рода симбионты были обнаружены и у животных, обитающих на малых глубинах в среде с повышенным содержанием сульфида и кислорода. Так, в области сброса сточных

вод концентрация сульфида может быть в несколько раз выше, чем в зоне гидротермальных источников, а для его окисления может использоваться кислород из верхних слоев морской воды. В иле около Лос-Анджелеса, куда сбрасываются сточные воды, наряду с другими макроскопическими формами животной жизни в большом количестве был обнаружен двустворчатый моллюск *Solemya reidi*, не имеющий кишечника (Felbeck et al., 1981; Felbeck, 1983). У этого моллюска очень крупные жабры, и в них содержатся многочисленные бактерии, способные окислять сульфиды, связывать  $\text{CO}_2$  и восстанавливать нитраты. Таким образом, важным источником питания у многих животных, в среде обитания которых содержатся сульфиды и необходимый для их окисления кислород, может быть особого рода симбиоз, впервые обнаруженный у погонофор в гидротермальной экосистеме.

#### Интенсивность метаболизма у животных, обитающих в области гидротермальных источников

В связи с тем что область около таких источников гораздо богаче пищей по сравнению с типичной глубоководной зоной, можно было бы предположить, что уровень метаболизма у обитающих здесь животных выше, чем у представителей типичной глубоководной фауны. Пока еще нет подобных работ, посвященных потреблению кислорода обитателями таких участков. Возможно, потребление  $\text{O}_2$  окажется ненадежным показателем интенсивности метаболизма у животных, находящихся в симбиозе с сульфидоокисляющими бактериями: большая часть потребляемого кислорода у таких животных может идти на окисление сульфидов бактериями, а не на катаболизм питательных веществ.

Другой метод, позволяющий хотя бы грубо оценить интенсивность метаболизма, мы уже рассматривали в настоящей главе. Измеряя активность ферментов энергетического обмена, можно с некоторым приближением судить о потреблении кислорода интактным животным (это видно, например, из рис. 12-9). Такой метод использовался при изучении нескольких животных из гидротермального сообщества (Hand, Somero, 1983b). Исследовалась, в частности, активность лактатдегидрогеназы и пируваткиназы в белых волокнах скелетных мышц неидентифицированной рыбы, обитающей в гидротермальной зоне около Калифорнийского полуострова ( $21^\circ$  с.ш.) (рис. 12-8: точки, соответствующие минимальной глубине обитания 2600 м). Активность этих ферментов не выходила из диапазона величин, найденных у мелководных рыб. Это позволяет предполагать, что и интенсивность метаболизма у рыб гидротермальных областей

примерно такая же, как у обитателей малых глубин, т. е. намного выше, чем у обычных глубоководных рыб. С этим согласуются также данные, полученные при наблюдении над двигательной активностью рыб в зоне источников с помощью погружаемого аппарата DSRV Alvin (Hand, Somero, 1983b).

Активность ферментов изучалась также у многих беспозвоночных гидротермальной зоны, в том числе у *Riftia pachyptila*, *Calyptogena magnifica* и краба *Bythograea thermhydrion* (Hand, Somero, 1983). Сравнение полученных величин с активностью ферментов у мелководных донных беспозвоночных показывает, что у сравнимых форм, живущих на глубине у горячих источников и на мелководье, интенсивность метаболизма весьма сходна.

Таким образом, скорость метаболических процессов у представителей гидротермальных сообществ, по-видимому, намного выше, чем у типичных обитателей морских глубин. Столь высокий уровень обмена, а также значительная плотность биомассы в области источников галапагосского типа ясно свидетельствуют о том, что ни низкие температуры, ни высокие давления сами по себе не служат главными факторами, определяющими малую интенсивность метаболических процессов у типичных глубоководных животных. Высокий уровень метаболизма у обитателей глубинных гидротермальных зон служит прекрасным подтверждением тесной связи этой особенности с наличием богатых пищевых ресурсов.

### Механизмы, предупреждающие отравление сероводородом

Сероводород — это не только вещество, богатое энергией, но и высокотоксичное соединение, так как оно способно блокировать гемоглобин и цитохром-с-оксидазную систему. Организмы, получающие энергию за счет аэробного дыхания, обычно погибают уже при микромолярных концентрациях  $\text{HS}^-$  в окружающей среде. Поэтому, казалось бы, большинство животных сможет переносить разве только очень кратковременное пребывание в богатых сульфидом водах гидротермальных зон. Какие же адаптации позволяют обитателям этих зон, особенно таким оседлым видам, как *R. pachyptila*, избегать отравления сероводородом?

Возможны различные механизмы, позволяющие метаболическим процессам продолжаться при высоких концентрациях  $\text{HS}^-$ . Например, животное может получать энергию преимущественно или всецело за счет анаэробных процессов (см. гл. 5). По-видимому, именно такова стратегия адаптации к высокому содержанию  $\text{HS}^-$  у крупного двусторчатого моллюска *Calyptogena magnifica*; на это указывает очень низкая активность цитохром-с-оксидазы в его тканях и значительно более высокая активность таких ферментов, как малатдегидрогеназа, способных



участвовать в анаэробных процессах (Hand, Somero, 1983b). Второй возможный механизм заключается в быстром окислении  $\text{HS}^-$  до менее токсичных или нетоксичных форм серы. По-видимому, такой способ адаптации используется у представителей мейофауны ила, богатого сульфидом (Powell et al., 1980). Третьим механизмом может быть выработка вариантов гемоглобина и цитохром-*c*-оксидазы, нечувствительных к сероводороду. Показано, что внеклеточный гемоглобин *R. pachyptila* действительно нечувствителен к сульфидам (Arg, Childress, 1981); однако система цитохром-*c*-оксидазы у обитателей гидротермальных зон, по-видимому, так же подвержена отравлению сульфидом, как и гомологичные ферменты других животных (Hand, Somero, 1983b; Powell, Somero, 1983). И наконец, четвертый механизм может состоять в том, что у животных, содержащих симбиотических серных бактерий,  $\text{HS}^-$  при поступлении в организм может прочно связываться с какой-то транспортной молекулой, и это будет препятствовать как взаимодействию свободного  $\text{HS}^-$  с цитохром-*c*-оксидазой, так и спонтанному окислению  $\text{HS}^-$  раньше, еще до передачи его симбионтам. По-видимому, этот последний механизм приспособления к высоким концентрациям  $\text{HS}^-$  представляет собой важное звено в цепи преобразования сульфида у *R. pachyptila*.

При химическом исследовании крови *R. pachyptila* Арп и Чилдресс (Arg, Childress, 1983) обнаружили необычный белок, который они называли сульфидсвязывающим. Этот белок обладал чрезвычайно высоким сродством и большой способностью к переносу  $\text{HS}^-$ . Такой белок может выполнять по меньшей мере три функции, очень важные для симбиоза животного с бактериями. Во-первых, поскольку содержание  $\text{HS}^-$  в крови *R. pachyptila* может превышать 1 мМ (Arg, Childress, 1983), а в окружающей щупальца воде она должна быть намного ниже, сульфидсвязывающий белок, по-видимому, извлекает  $\text{HS}^-$  из этой воды. Таким образом, он действует аналогично гемоглобину крови, поглощающему кислород из воздуха или воды. Во-вторых, благодаря высокому сродству к  $\text{HS}^-$  и высокой способности к переносу сульфида этот белок может препятствовать значительному накоплению свободного  $\text{HS}^-$  в крови. В результате уровень токсичных молекул  $\text{HS}^-$  в крови не повышается настолько, чтобы создать угрозу для функции цитохром-*c*-оксидазы. Было даже показано (Powell, Somero, 1983), что ничтожные количества крови *R. pachyptila* могут полностью снимать блокаду цитохром-*c*-оксидазы этого животного ионами  $\text{HS}^-$ . В-третьих, сульфидсвязывающий белок предохраняет  $\text{HS}^-$  от самопроизвольного окисления. В комплексе с этим белком  $\text{HS}^-$  чрезвычайно стабилен (Arg, Childress, 1983). Таким образом, белок, очевидно, способен переносить  $\text{HS}^-$  в стабилизированном

состоянии от места его поглощения (щупальца) к месту использования симбиотическими бактериями (трофосома). Как регулируется отдача  $\text{HS}^-$  в тканях трофосомы, еще предстоит выяснить, однако кажется вероятным, что она, так же как и отдача  $\text{O}_2$  гемоглобином, может происходить под действием каких-либо эффекторных молекул (например, протонов).

### Резюме

Рассматривая способы биохимической адаптации у глубоководных организмов, мы еще раз встретились с рядом важнейших стратегий, которые мы обсуждали в первой главе книги. Сравнение гомологичных белков рыб, живущих на малых и на больших глубинах, особенно ясно показало, что некоторые важнейшие характеристики белков сохраняются у всех видов, тогда как менее важные особенности могут широко варьировать. Примером выраженных консервативных тенденций и необходимых компромиссов в эволюции белков может служить сохранение сродства к лигандам за счет снижения каталитической эффективности. Особенности глубоководных животных из гидротермальных областей и особенно тех видов, которые используют потенциально токсичный сероводород как богатый источник энергии, иллюстрируют «оппортунистический» характер биохимической адаптации: молекулярная эволюция направлена на использование возможностей окружающей среды. Кроме того, при изучении глубоководных животных мы столкнулись с поразительными примерами приспособления интенсивности метаболизма к окружающим условиям. Чрезвычайно низкая скорость обменных процессов у глубоководных пелагических рыб, показателем которой служит значительное снижение содержания ферментов в мышечной ткани, позволяет убедиться в том, насколько различным может быть использование того или иного метаболического пути (например, гликолиза в мышцах) у разных животных в зависимости от физических, химических и биологических факторов среды. Все это позволяет нам прийти к фундаментальному положению, которое высказал несколько десятков лет назад Эрнест Болдуин. Этот автор заключил свой основополагающий труд «Введение в сравнительную биохимию» следующим выводом: изучение биохимической изменчивости организмов, приспособленных к самым различным условиям среды, заставляет нас признать, что «в основе любых проявлений жизни лежат общие для всех организмов фундаментальные закономерности» и что «все колоссальное разнообразие форм, размеров, образа жизни, мест обитания и прочих особенностей живых существ всецело обусловлено совокупностью вторичных специфических адаптивных особенностей — своего рода вариаций на одну главную тему».

# Литература

- Abe H. (1981). Determination of L-histidine-related compounds in fish muscle using high-performance liquid chromatography. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 47, 139.
- Alexandrov Y. Ya., 1977. *Cells, Molecules and Temperature*. Berlin, Springer-Verlag.
- Alfonso M., Racker E. (1979). Components and mechanism of action of ATP-driven proton pumps. *Can. J. Biochem.* 57, 1351—1358.
- Andersen M. E., Olson J. S., Gibson Q. H. (1973). Studies on ligand binding to hemoglobins from teleosts and elasmobranchs. *J. Biol. Chem.*, 248, 5544—5555.
- Anderson G. R., Polonis V. R., Petell J. K., Saavedra R. A., Manly K. F., Matovic L. M. (1983). LDH<sub>x</sub>, a transformation dehydrogenase found in human cancer. In: *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Studies*, ed. M. C. Rattazzi, J. G. Scandalios, and G. S. Whitt, 11, 155—172, New York, Alan R. Liss.
- Argos P., Rossman M. G., Grau U. M., Zuber H., Frank G., Tratschin J. D. (1979). Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18, 5698—5703.
- Armond P. A., Schreiber U., Bjorkman O. (1978). Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. II. Light-harvesting efficiency and electron transport. *Plant Physiol.*, 61, 411—415.
- Arnone A. (1972). X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature*, 237, 146—149.
- Arp A. J., Childress J. J. (1981). Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm. *Science*, 213, 342—344.
- Arp A. J. (1983). Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*. *Science*, 219, 295—297.
- Ashwood-Smith M., Farrant J., 1980. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. University Park, Md., University Park Press.
- Assaf S. A., Graves J. D. (1969). Structural and catalytic properties of lobster muscle glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 244, 5544—5555.
- Atkinson D. E. (1969). Limitation of metabolite concentrations and the conservation of solvent capacity in the living cell. *Current Topics in Cellular Regulation*, 1, 29—43.
- Atkinson D. E., 1977. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. New York, Academic Press.
- Atkinson D. E., Camien M. N. (1982). The role of urea synthesis in the removal of bicarbonate and the regulation of blood pH. *Current Topics in Cellular Regulation*, 21, 261—302.
- Bailey A. J., 1968. The nature of collagen. In: *Comprehensive Biochemistry*, 26B, ed. M. Florkin and E. H. Stotz, 297—423, Amsterdam, Elsevier.
- Baldwin E., 1970. *An Introduction to Comparative Biochemistry*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Baldwin J. (1971). Adaptation of enzymes to temperature: acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40, 181—187.

- Baldwin J., Hochachka P. W. (1970). Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization: Acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem. J.*, 116, 883—887.
- Ballantyne J. S., Hochachka P. W., Mommsen T. P. (1981). Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biol. Letters*, 2, 75—85.
- Banse K., 1964. On the vertical distribution of zooplankton in the sea. In: *Progress in Oceanography*, ed. M. Sears, 2, 53—125. Oxford, Pergamon Press.
- Beis I., Newsholme E. A. (1975). Contents of adenine nucleotides, phosphagens, and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, 152, 23—32.
- Benade A. J. S., Heisler N. (1978). Comparison of efflux rate of hydrogen and lactate ions from isolated muscle in vitro. *Resp. Physiol.*, 32, 369—380.
- Bennett A. F. (1972). A comparison of activities of metabolic enzymes in lizards and rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B, 637—647.
- Bennett A. F., Ruben J. A. (1979). Endothermy and activity in vertebrates. *Science*, 206, 649—654.
- Bernstam V. A. (1978). Heat effects on protein biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29, 25—46.
- Berry J., Bjorkman O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann. Plant Physiol.*, 31, 491—543.
- Bessman S. P., Geiger P. J. (1981). Transport of energy in muscle: The phosphorylcreatine shuttle. *Science*, 211, 448—452.
- Beyer R. F., 1972. Effects of low temperature on cold-sensitive enzymes from mammalian tissues. In: *Hibernation-Hypothermia: Perspectives and Challenges*, ed. F. E. South, J. P. Hannon, J. R. Willis, E. T. Pengelley, and N. R. Alpert, 17—54, Amsterdam, Elsevier.
- Biesecker G., Harris J. I., Thierry J. C., Walker J. E., Wonacott A. J. (1977). Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 266, 328—333.
- Bjorkman O., Badger M. R., Armond P. A., 1980. Adaptation to high temperature stress. In: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, ed. N. C. Turner and P. J. Kramer, pp. 231—249, New York, John Wiley and Sons.
- Bock P. E., Frieden C. (1976). Phosphofructokinase. I. Mechanism of the pH-dependent inactivation and reactivation of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.*, 251, 5630—5636.
- Bonaventura C., Sullivan B., Bonaventura J., Bourne S. (1977). Anion modulation of the negative Bohr effect of haemoglobin from a primitive amphibian. *Nature*, 265, 474—476.
- Bonaventura J., Bonaventura C. (1980). Hemocyanins: relationships in their structure, function and assembly. *Amer. Zool.*, 20, 7—17.
- Bonaventura J., Bonaventura C., Sullivan B., 1977. Non-heme oxygen transport proteins. In: *Oxygen and Physiological Function*, ed. F. F. Jobsis, 177—220. Dallas, Texas, Professional Information Library.
- Bonaventura J., Wood S. C. (1980). Respiratory pigments: Overview, *Amer. Zool.*, 20, 5—6.
- Borgmann U., Moon T. W. (1975). A comparison of LDHs from an ectothermic and endothermic animal. *Can. J. Biochem.*, 53, 998—1004.
- Borowitzka L. J., Brown A. D. (1974). The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol.*, 96, 37—52.
- Borowitzka L. J., Demmerle S., Mackay M. A., Norton R. S. (1980). Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. *Science*, 210, 650—651.
- Botelho L. H., Friend S. H., Matthew J. B., Lehman L. D., Hanania G. I. H., Gurd F. R. N. (1978). Proton nuclear magnetic resonance study of histidine

- ionizations in myoglobins of various species. Comparison of observed and computed pK values. *Biochemistry*, 17, 5197—5205.
- Botelho L. H., Gurd F. R. N.* (1978). Proton nuclear magnetic resonance study of histidine ionizations in myoglobins of various species. Specific assignment of individual resonances. *Biochemistry*, 17, 5188—5196.
- Bowlus R. D., Somero G. N.* (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: Rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J. Expl. Zool.*, 208, 137—152.
- Brandts J. F.*, 1967. Heat effects on proteins and enzymes. In: *Thermobiology*, ed. H. Rose, 25—72, New York, Academic Press.
- Brauer R. W., Bekman M. Y., Keyser J. B., Nesbitt D. L., Sidelev G. N., Wright S. L.* (1980a). Adaptation to high hydrostatic pressures of abyssal gammarids from Lake Baikal in eastern Siberia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65A, 109—117.
- Brauer R. W., Bekman M. Y., Keyser J. B., Nesbitt D. L., Shvetzov S. G., Sidelev G. N., Wright S. L.* (1980b). Comparative studies of sodium transport and its relation to hydrostatic pressure in deep- and shallow-water gammarid crustaceans from Lake Baikal. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65A, 119—127.
- Brett J. R., Groves T. D. D.*, 1979. Physiological energetics. In: *Fish Physiology*, ed. W. A. Hoar, D. J. Randall, and J. R. Brett, 7, 279—352, New York, Academic Press.
- Brooks S. L., Rothwell N. J., Stock M. J., Goodbody A. E., Trayhurn P.* (1980). Increased proton conductance pathway in brown adipose tissue mitochondria of rats exhibiting diet-induced thermogenesis. *Nature*, 286, 274—276.
- Brown A. D., Borowitzka L. J.*, 1979. Halotolerance of *Dunaliella*. In: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, ed. M. Levandowsky, and S. H. Hutner (2nd ed.), 139—190, New York, Academic Press.
- Brown A. D., Simpson J. R.* (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.*, 72, 589—591.
- Brunori M.* (1975). Molecular adaptation to physiological requirements: The hemoglobin system of trout. *Current Topics in Cellular Regulation*, 9, 1—39.
- Bunn H. F., Higgins P. J.* (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science*, 213, 222—224.
- Burton R. F.* (1978). Intracellular buffering. *Respir. Physiol.*, 33, 51—58.
- Butler P. J., Jones D. R.* (1982). The comparative physiology of diving in vertebrates. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, 8, 179—364.
- Caldwell R. S., Vernberg F. J.* (1970). The influence of acclimation temperature on the lipid composition of fish gill mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34, 179—191.
- Caligiuri M., Robin E. D., Hance A. J., Robin D. A., Lewiston N., Theodore J.* (1981). Prolonged diving and recovery in the freshwater turtle, *P. scripta*. II. Magnitude of depression of O<sub>2</sub> requirements and the relation to body O<sub>2</sub> stores. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70A, 365—369.
- Carey F. G., Teal J. M., Kanwisher J. W., Lawson K. D., Beckett J. S.* (1971). Warm-bodied fishes. *Amer. Zool.*, 11, 135—143.
- Castellini M. A., Hochachka P. W.* (1982). Glucose and palmitate metabolism during rest and exercise in the gray seal. *The Physiologist*, 25 (4), 253.
- Castellini M. A., Somero G. N.* (1981). Buffering capacity of vertebrate muscle: Correlations with potentials for anaerobic function. *J. Comp. Physiol.*, 143, 191—198.
- Castellini M. A., Somero G. N., Kooyman G. L.* (1981). Glycolytic enzyme activities in tissues of marine and terrestrial mammals. *Physiol. Zool.*, 54 (2), 242—252.
- Cavanaugh C. M.* (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates. *Nature*, 320, 58—61.
- Cavanaugh C. M., Gardiner S., Jones M. L., Jannasch H. W., Waterbury J. B.*

- (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachytila*: Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science*, 213, 340—342.
- Chance B., Eleff S., Leigh J. S., Sokolow D., Sapega A. (1981). Mitochondrial regulation of phosphocreatine/inorganic phosphate ratios in exercising human muscle: A gated  $^{31}\text{P}$  NMR study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6114—6718.
- Childress J. J. (1975). The respiratory rates of midwater crustaceans as a function of depth of occurrence and relation to the oxygen minimum layer off southern California. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50A, 787—799.
- Childress J. J. (1977). Effects of pressure, temperature and oxygen consumption rate of the midwater copepod *Gaussia princeps*. *Mar. Biol.*, 39, 19—24.
- Childress J. J., Nygaard M. H. (1973). The chemical composition of midwater fishes as a function of depth of occurrence off southern California. *Deep-Sea Res.*, 20, 1093—1109.
- Childress J. J., Somero G. N. (1979). Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.*, 52, 273—283.
- Chotia C. (1975). Structural variants in protein folding. *Nature*, 254, 304—308.
- Clark M. E., Zounes M. (1977). The effects of selected cell osmolytes on the activity of lactate dehydrogenase from the euryhaline polychaete, *Nereis succinea*. *Biol. Bull.*, 153, 468—484.
- Clark M. G., Bloxham D. P., Holland P. C., Lardy H. A. (1973). Estimation of the fructose diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle in the flight muscle of *Bombus affinis*. *Biochem. J.*, 134, 589—597.
- Clegg J. S. (1962). Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp, *Artemia salina*, and its disappearance during development. *Biol. Bull.*, 123, 295—301.
- Clegg J. S. (1981). Metabolic consequences of the extent and disposition of the aqueous intracellular environment. *J. Exp. Zool.*, 215, 303—313.
- Cohen P. (1978). The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. In: *Current Topics in Cellular Regulation*, 14, 117—196.
- Collicutt J., Hochachka P. W. (1977). The anaerobic oyster heart. *J. Comp. Physiol.*, 115, 147—157.
- Corliss J. B., Dymond J., Gordon L. I., Edmond J. M., von Herzen R. P., Balhard R. D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T. H. (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, 203, 1073—1083.
- Cossins A. R., Friedlander M. J., Prosser C. L. (1977). Correlations between behavioral temperature adaptations of goldfish and the viscosity and fatty acid composition of their synaptic membranes. *J. Comp. Physiol.*, 120, 109—121.
- Cossins A. R., Prosser C. L. (1978). Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 2040—2043.
- Cowey C. B. (1967). Comparative studies on the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from cold- and warm-blooded animals with reference to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 31, 79—93.
- Crick F., 1981. *Life Itself*, Austin, Texas, S and X Press.
- Crowe J. H. (1971). Anhydrobiosis: An unsolved problem. *Amer. Naturalist*, 105, 563—573.
- Crowe J. H., Clegg J. S., 1978. *Dry Biological Systems*. New York, Academic Press.
- Crush K. G. (1970). Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34, 3—30.
- Dann L. G., Britton H. G. (1978). Kinetics and mechanism of action of muscle pyruvate kinase. *Biochem. J.*, 169, 39—54.

- Davey C. L. (1960). The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 303—308.
- Davis B. D. (1958). On the importance of being ionized. *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 497—509.
- Davis R. W. (1983). Lactate and glucose metabolism in the resting and diving harbor seal (*Phoca vitulina*). *J. Comp. Physiol.*, 153, 275—288.
- Deavers D. R., Musacchia X. J. (1980). Water metabolism and renal function during hibernation and hypothermia. *Fed. Proc.*, 39, 2969—2973.
- De Smedt H., Borghgraef R., Ceuterick F., Heremans K. (1979). Pressure effects on lipid-protein interactions in  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ . *Biophys. Acta*, 556, 479—489.
- DeVries A. L., 1974. Survival at freezing temperatures. In: *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, ed. D. C. Malins and J. R. Sargent, 289—330, New York, Academic Press.
- DeVries A. L., 1980. Biological antifreezes and survival in freezing environments. In: *Animals and Environmental Fitness*, ed. R. Gilles, 583—607, New York, Pergamon Press.
- De Vries A. L. (1982). Biological antifreeze in coldwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A, 627—640.
- De Zwaan A., 1983. Carbohydrate catabolism in bivalves. In: *The Mollusca*, ed. P. W. Hochachka, 1, 138—175, New York, Academic Press.
- De Zwaan A., Wijsman T. C. M. (1976). Anaerobic metabolism in *Bivalvia* (Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B, 313—324.
- Dhindsa D. S., Metcalfe J., Blackmore D. W., Koler R. D. (1981). Postnatal changes in oxygen affinity of rat blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A, 279—283.
- Dizon A. E., Brill R. W. (1979). Thermoregulation in tunas. *Amer. Zool.*, 19, 249—265.
- Drake A. (1982). Substrate utilization in the myocardium. *Basic Res. Cardiol.*, 77, 1—11.
- Duman J. G. (1977). The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle, *Meracantha contracta*. *J. Comp. Physiol.*, 115, 279—286.
- Duman J. G. (1979). Subzero temperature tolerance in spiders: The role of thermal-hysteresis-factors. *J. Comp. Physiol.*, 131, 347—352.
- Duman J. G. (1980). Factors involved in overwintering survival of the freeze-tolerant beetle, *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.*, 136, 53—59.
- Duman J. G., DeVries A. L. (1973). Freezing behavior of aqueous solutions of glycoproteins from the blood of an Antarctic fish. *Cryobiology*, 9, 469—472.
- Duman J. G., DeVries A. L. (1974). The effects of temperature and photoperiod on antifreeze production in cold-water fishes. *J. Exp. Zool.*, 190, 89—98.
- Duman J. G., DeVries A. L. (1976). Isolation, characterization, and physical properties of protein antifreezes from the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B, 375—380.
- Duman J. G., Horwath K. L., Tomchaney A., Patterson J. L. (1982). Anti-freeze agents of terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A, 545—555.
- Dunn J. R., Davison W., Maloiy G. M. O., Hochachka P. W., Guppy M. (1981). An ultrastructural and histochemical study of the axial musculature in the African lungfish. *Cell. Tiss. Res.*, 220, 599—609.
- Dunn J. R., Hochachka P. W., Davison W., Guppy M. (1983). Metabolic adjustments to diving and recovery in the African lungfish. *Amer. J. Physiol.*, 245, R651—R657.
- Edmond J. M., Measures C., Mangum B., Grant B., Sclater F. R., Collier R., Hudson A. (1979). On the formation of metal-rich deposits at ridge crests. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 46, 19—30.
- Edmond J. M., Von Damm K. L., McDuff R. E., Measures C. I. (1982). Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature*, 297, 187—191.

- Edsall J. T. (1980). Hemoglobin and the origins of the concept of allosterism. Fed. Proc., 39, 226—235.
- Emmett B., Hochachka P. W. (1981). Scaling of oxidative and glycolytic enzymes in the shrew. Resp. Physiol., 45, 261—267.
- Evered D. F. (1981). Advances in amino acid metabolism in mammals. Transactions Biochem. Soc., 9, 159—169.
- Everse J., Kaplan N. O. (1973). Lactate dehydrogenase: Structure and function. Adv. Enzymol., 37, 61—133.
- Felbeck H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). Science, 213, 336—338.
- Felbeck H. (1983). Sulfide oxidation and carbon fixation by the gutless clam *Solemya reidi*: An animal-bacteria symbiosis. J. Comp. Physiol., 152, 3—11.
- Felbeck H., Childress J. J., Somero G. N. (1981). Calvin—Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. Nature, 293, 291—293.
- Felbeck H., Somero G. N. (1982). Primary production in deep-sea hydrothermal vent organisms: Roles of sulfide-oxidizing bacteria. Trends in Biochem. Sci., 7, 201—204.
- Felbeck H., Somero G. N., Childress J. J., 1983. Biochemical interactions between molluscs and their symbionts. In: The Mollusca, ed. P. W. Hochachka, 2, 331—358, New York, Academic Press.
- Fersht A. R., 1977. Enzyme Structure and Mechanism. San Francisco, W. H. Freeman.
- Fersht A. R. (1980). Enzymic editing mechanisms in protein synthesis and DNA replication. Trends in Biochem. Sci., 5, 262—265.
- Fields J. H. A., Eng A. K., Ramsden W. D., Hochachka P. W., Weinstein B. (1980). Alanopine and strombine are novel imino acids produced by a dehydrogenase found in the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Biochem. Biophys., 201, 110—114.
- Forster R. P., Goldstein L. (1976). Intracellular osmoregulatory role of amino acids and urea in marine elasmobranchs. Amer. J. Physiol., 230, 925—931.
- French S. L., 1981. Mechanism of Halotolerance in Some Manganese-oxidizing Bacteria, Ph. D. diss., University of California, San Diego.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. Science, 201, 875—880.
- Fujii D. K., Fulco A. J. (1977). Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. Hyperinduction and modulation of desaturase biosynthesis. J. Biol. Chem., 252, 3660—3670.
- Furuya E., Uyeda K. (1980). Regulation of phosphofructokinase by a new mechanism. An «activation factor» binding to the phosphorylated enzyme. J. Biol. Chem., 255, 11656—11659.
- Gadian D. G., Radda G. K., Brown T. K., Chance E. M., Dawson M. J., Wilkie D. R. (1981). The activity of creatine kinase in frog skeletal muscle studied by saturation-transfer nuclear magnetic resonance. Biochem. J., 194, 215—228.
- Gekko K., Timasheff S. N. (1981a). Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. Biochemistry, 20, 4667—4676.
- Gekko K., Timasheff S. N. (1981b). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. Biochemistry, 20, 4677—4686.
- Giles M. A., Randall D. J. (1980). Oxygenation characteristics of the polymorphic hemoglobins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at different developmental stages. Comp. Biochem. Physiol., 65A, 265—271.
- Gilles R., ed., 1979. Mechanisms of Osmoregulation in Animals. Maintenance of Cell Volume. New York, Wiley-Interscience.
- Gillies R. J., Deamer D. W. (1979). Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. J. Cell Physiol., 100, 23—32.



- Goldberg A. L., Chang T. W. (1978). Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. Fed. Proc., 37, 2301—2307.
- Goldberg A. L., Dice J. F. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Ann. Rev. Biochem., 43, 835—869.
- Goldberg A. L., St John A. C. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells, Part 2. Ann. Rev. Biochem., 45, 747—803.
- Goldspink G., 1977. Mechanics and energetics of muscle in animals of different sizes, with particular reference to the muscle fibre composition of vertebrate muscle. In: Scale Effects in Animal Locomotion, ed. T. J. Pedley, 37—55, New York, Academic Press.
- Gollnick P. D., Timson B. F., Moore R. L., Reidy M. (1981). Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats. J. Appl. Physiol., 50, 936—943.
- Gordon M. S., Tucker V. E. (1968). Further observations on the physiology and salinity adaptation in the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. J. Exp. Biol., 49, 185—193.
- Gottschalk G., 1979. Bacterial Metabolism. New York, Springer-Verlag.
- Graham J. B., Dickson K. A. (1982). Physiological thermoregulation in the albacore *Thunnus alalunga*. Physiol. Zool., 54, 470—486.
- Grainger J. L., Winkler M. M., Shen S. S., Steinhart R. A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. Dev. Biol., 68, 396—406.
- Graves J. E., Rosenblatt R. H., Somero C. N. (1983). Kinetic and electrophoretic differentiation of lactate dehydrogenases of teleost species-pairs from the Atlantic and Pacific Coasts of Panama. Evolution, 37, 30—37.
- Graves J. E., Somero G. N. (1982). Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of eastern Pacific barracudas from different thermal environments. Evolution, 36, 97—106.
- Greaney G. S., Powers D. A. (1977). Cellular regulation of an allosteric modifier of fish haemoglobin. Nature, 270, 73—74.
- Greaney G. S., Powers D. A. (1978). Allosteric modifiers of fish hemoglobins: In vitro and in vivo studies of the effect of ambient oxygen and pH on erythrocyte ATP concentrations. J. Exp. Zool., 203, 339—350.
- Greaney G. S., Somero G. N. (1979). Effects of anions on the activation thermodynamics and fluorescence emission spectrum of alkaline phosphatase: evidence for enzyme hydration changes during catalysis. Biochemistry, 18, 5322—5332.
- Greaney G. S., Somero G. N. (1980). Contributions of binding and catalytic rate constants to evolutionary modification in  $K_m$  of NADH for muscle-type ( $M_4$ ) lactate dehydrogenases. J. Comp. Physiol., 137, 115—121.
- Greenwalt D. E., Bishop S. H. (1980). Effect of aminotransferase inhibitors on the pattern of free amino acid accumulation in isolated mussel hearts subjected to hyperosmotic stress. Physiol. Zool., 53, 262—269.
- Guppy M., Hochachka P. W. (1978). Role of dehydrogenase competition in metabolic regulation: The case of lactate and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases. J. Biol. Chem., 253, 8465—8469.
- Guppy M., Hulbert W. C., Hochachka P. W. (1979). Metabolic sources of heat and power in tuna muscles. II. Enzyme and metabolite profiles. J. Exp. Biol., 82, 303—320.
- Gustafsson L., Norkrans B. (1976). On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol., 110, 177—183.
- Guy P. S., Snow D. H. (1977). The effect of training and detraining on lactate dehydrogenase isoenzymes in the horse. Biochem. Biophys. Res. Comm., 75, 863—869.
- Hahn P., 1982. Nutrition and metabolic development in mammals. In: Nutrition,

- Pre- and Postnatal Development, ed. M. Winick, 1—39, New York, Plenum Press.
- Hahn P., Koldovsky O., 1966. Utilization of Nutrients During Postnatal Development. Oxford, Pergamon Press.
- Hand S. C., Somero G. N. (1982). Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase. Catalytic stability and aggregation state as a function of pH and temperature. *J. Biol. Chem.*, 257, 734—741.
- Hand S. C., Somero G. N. (1983a). Phosphofructokinase of the hibernator, *Citellus beecheyi*: Temperature and pH regulation of activity via influences on the tetramer-dimer equilibrium. *Physiol. Zool.*, 56, 380—388.
- Hand S. C., Somero G. N. (1983b). Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals: adaptation to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, 165, 167—181.
- Hazel J. R. (1972). The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L). Properties of the enzyme and effect of lipid extraction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43B, 837—861.
- Hazel J. R. (1984). Effects of temperature upon the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Amer. J. Physiol.*, in press.
- Hazel J. R., Garlick W. S., Sellner P. A. (1978). The effects of assay temperature upon the pH optima of enzymes of poikilotherms: A test of the imidazole alaphstat hypothesis. *J. Comp. Physiol.*, 123, 97—104.
- Hazel J. R., Prosser C. L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.*, 54, 620—677.
- Hazlewood C. F., 1979. A view of the significance and understanding of the physical properties of cell-associated water. In: *Cell-Associated Water*, ed. W. Drost-Hansen and J. Clegg, 165—259, New York, Academic Press.
- Hedrick P. W., Givevan M. E., Ewing E. P. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environment. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 7, 1—32.
- Heinrich B. (1971). Temperature regulation of the sphinx moth, *Manduca sexta*. II. Regulation of heat loss by control of blood circulation. *J. Exp. Biol.*, 54, 153—166.
- Heinrich B. (1974a). Thermoregulation in endothermic insects, *Science*, 185, 747—756.
- Heinrich B. (1974b). Thermoregulation in bumblebees. I. Brood incubation by *Bombus vosnesenskii* queens. *J. Comp. Physiol.*, 88, 129—140.
- Heinrich B. (1979). Keeping a cool head: Honeybee thermoregulation. *Science*, 205, 1269—1271.
- Henderson L. J., 1913. *The Fitness of the Environment*. Boston, Beacon Press.
- Hew C. L., Fletcher G. L. (1979). The role of pituitary in regulating antifreeze protein synthesis in the winter flounder. *FEBS Letters*, 99, 337—339.
- Hill H. A. O. (1981). Oxygen, oxidases and essential trace metals. *Phil. Trans. Royal Soc., London Series B* 294, 119—128.
- Hinkle P. C., 1981. Coupling ratios of proton transport in mitochondria. In: *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. V. P. Skulachev and P. C. Hinkle, 49—58. Reading, Mass, Addison-Wesley.
- Hinton H. E. (1968). Reversible suspension of metabolism and the origin of life. *Proc. Royal Soc., Ser. B* 171, 43—57.
- Hintz C. S., Chi M. M. Y., Feel R. D., Ivy J. L., Kaiser K. K., Lowry C. V., Lowry O. H. (1982). Metabolite changes in individual rat muscle fibers during stimulation. *Amer. J. Physiol.*, 242, C218—C228.
- Hochachka P. W., 1973. Comparative intermediary metabolism. In: *Comparative Animal Physiology*, ed. C. L. Prosser, 212—278. Philadelphia, W. B. Saunders.
- Hochachka P. W. (1974). Regulation of heat production at the cellular level. *Fed. Proc.*, 33, 2162—2169.
- Hochachka P. W. (1975). Fitness of enzyme binding sites for their physical

- environment: Coenzyme and substrate binding sites for  $M_4$  lactate dehydrogenases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B, 25—31.
- Hochachka P. W., 1979. Cell metabolism, air-breathing, and the origins of endothermy. In: *Evolution of Respiratory Processes, A Comparative Approach*, ed. C. Lenfant and S. C. Wood, Monograph 13, 253—288, New York, Marcel Dekker.
- Hochachka P. W., 1980. Living Without Oxygen: Closed and Open Systems in Hypoxia Tolerance. Cambridge, Mass., Harvard University Press.
- Hochachka P. W. (1981). Brain, lung, and heart functions during diving and recovery. *Science*, 212, 509—514.
- Hochachka P. W., 1982. Anaerobic metabolism: living without oxygen. In: *A Companion to Animal Physiology*, ed. C. R. Taylor, K. Johansen, and L. Bolis, 138—150, Cambridge, Cambridge University Press.
- Hochachka P. W., Dobson G. P., Mommsen T. P., 1983. Role of isozymes in metabolic regulation during exercise: Insights from comparative studies. In: *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, ed. M. C. Ratzzi, J. G. Scandalios, and G. S. Whitt, 8, 91—113, New York, Alan R. Liss.
- Hochachka P. W., Dunn J. R., 1984. Metabolic arrest: The most effective means of protecting tissues against hypoxia. In: *Third Banff International Hypoxia Symposium*, 297—309. New York, Alan R. Liss.
- Hochachka P. W., Fields J. H. A. (1983). Arginine, glutamate, and proline as substrates for oxidation and for glycogenesis in cephalopod tissues. *Pacific Science*, 36, 325—336.
- Hochachka P. W., Fields J. H. A., Mommsen T. P., 1983. Metabolic and enzyme regulation during rest-to-work transition: A mammal vs. mollusc comparison. In: *The Mollusca*, ed. P. W. Hochachka. Vol. 1, 56—89. New York, Academic Press.
- Hochachka P. W., Guppy M., 1977. Variations on a theme by Embden and Meyerhof. In:  $O_2$  in the Organism, ed. F. Jobsis, 292—310. Dallas, Texas, Prof. Publ. Co.
- Hochachka P. W., Guppy M., Guderley H. E., Storey K. B., Hulbert W. C. (1978). Metabolic biochemistry of water- vs. air-breathing fishes: Muscle enzymes and ultrastructure. *Can. J. Zool.*, 56, 736—750.
- Hochachka P. W., Liggins G. C., Zapol W. M. (1977). Pulmonary metabolism during diving: Conditioning blood for the brain. *Science*, 198, 831—834.
- Hochachka P. W., Mommsen T. P. (1983). Protons and anaerobiosis. *Science*, 219, 1391—1397.
- Hochachka P. W., Murphy B., 1979. Metabolic status during diving and recovery in marine mammals. *Intl. Review Physiol.* Vol. 3, *Environmental Physiol.*, ed. D. Robertshaw 253—287. Baltimore, University Park Press.
- Hochachka P. W., Norberg C., Baldwin J., Fields J. H. A. (1975). Enthalpy-entropy compensation of oxamate binding by homologous lactate dehydrogenases. *Nature*, 260, 648—650.
- Hochachka P. W., Randall D. J. (1978). Water-air breathing transition in vertebrates of the Amazon: Alpha Helix Amazon expedition, September-October 1976. *Can. J. Zool.*, 56, 713—716.
- Hochachka P. W., Somero G. N., 1973. *Strategies of Biochemical Adaptation*. Philadelphia, W. B. Saunders.
- Hochachka P. W., Storey K. B. (1975). Metabolic consequences of diving in animals and man. *Science*, 197, 613—621.
- Hoh J. F. Y. (1983). Myosin isoenzymes and muscular contractility. *Proc. Intl. Union Physiol. Sci.*, 25, 467.05, 387.
- Holbrook J. J., Liljas A., Steindal S. J., Rossman M. G. (1975). Lactate dehydrogenase. *The Enzymes*, 11, 191—292.
- Holloszy J. O., Booth F. W. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 38, 273—291.
- Holloszy J. O., Winder W. W., Fitts R. H., Rennie M. J., Hockson R. C., Con-

- lee R. K., 1978. Energy production during exercise. In: 3rd Intl. Symp. on Biochemistry of Exercise, ed. F. Landry and W. A. R. Orban, 61—74. Miami, Symposia Specialists.
- Howald H., von Glutz G., Billeter R., 1978. Energy stores and substrates utilization in muscle during exercise. In: 3rd Intl. Symp. on Biochemistry of Exercise, ed. F. Landry and W. A. R. Orban, 75—86. Miami, Symposia Specialists.
- Hultman E., 1978. Regulation of carbohydrate metabolism in the liver during rest and exercise with special reference to diet. In: 3rd Intl. Symp. on Biochemistry of Exercise, ed. F. Landry and W. A. R. Orban, 99—126. Miami, Symposia Specialists.
- Jacobs H. K., Kuby S. A. (1980). Studies on muscular dystrophy. A comparison of the steady-state kinetics of the normal human ATP-creatine transphosphorylase isoenzymes (creatine kinases) with those from tissues of Duchenne muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, 255, 8477—8482.
- Jacobus W. E., Moreadith R. W., Vandegaer K. M. (1982). Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J. Biol. Chem.*, 257, 2397—2402.
- Johansen K., Weber R. E., 1976. On the adaptability of haemoglobin function to environmental conditions. In: Perspectives in Experimental Biology, ed. P. Spencer Davies, 1, 219—234. Oxford, Pergamon Press.
- Johnson F. H., Eyring H., Stover B. J., 1974. The Theory of Rate Processes in Biology and Medicine. New York, Wiley.
- Johnston I. A. (1979). Calcium regulatory proteins and temperature acclimation of actomyosin ATPase from a eurythermal teleost (*Carassius auratus* L.). *J. Comp. Physiol.*, 129, 163—167.
- Johnston I. A., 1981. Specialization of fish muscle. In: Development and Specialization of Muscle, ed. G. Goldspink, 123—148. Cambridge, Cambridge University Press.
- Johnston I. A., Walesby N. J. (1977). Molecular mechanisms of temperature adaptation in fish myofibrillar adenosine triphosphatases. *J. Comp. Physiol.*, 119, 195—206.
- Jones M. L. (1981). *Riftia pachyptila* Jones: Observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science*, 213, 333—336.
- Jones R. M. (1980). Metabolic consequences of accelerated urea synthesis during seasonal dormancy of spadefoot toads, *Scaphiopus couchi* and *Scaphiopus multiplicatus*. *J. Exp. Zool.*, 212, 255—267.
- Kanno T., Sudo K., Takeuchi I., Kanda S., Honda N., Nishimura Y., Oyama K. (1980). Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase M-subunit. *Clinica Chim. Acta*, 108, 267—276.
- Kanwisher J. (1955). Freezing in intertidal animals. *Biol. Bull.*, 109, 56—63.
- Karl D. M., Wirsen C. O., Jannasch H. W. (1980). Deep-sea primary production at the Galapagos hydrothermal vents. *Science*, 207, 1345—1347.
- Kasai R., Kitajima Y., Martin C. E., Nozawa Y., Skriver L., Thompson G. A., Jr. (1976). Molecular control of membrane properties during temperature acclimation. Membrane fluidity regulation of fatty acid desaturase action. *Biochemistry*, 15, 5228—5233.
- Katzen H. M., Soderman D. D., 1975. The hexokinase isozymes: Sulfhydryl considerations in the regulation of the particle-bound and soluble states. In: Isozymes II — Physiological Function, ed. C. L. Markert, 797—817. New York, Academic Press.
- Kauss H., 1979. Osmotic regulation in algae. In: Progress in Phytochemistry, ed. L. Reinhold et al., 5, 1—27. Oxford, Pergamon Press.
- Kauss H., Thomson K. S., Thomson M., Jeblick W. (1979). Osmotic regulation. Physiological significance of proteolytic and nonproteolytic activation of iso-floridoside-phosphate synthase. *Plant Physiol.*, 63, 455—459.

- Keilin D. (1959). The problem of anabiosis or latent life: history and current concepts. Proc. Royal. Soc., Ser. B, 150, 149—191.
- Kitajima Y., Thompson G. A., Jr. (1977). *Tetrahymena* strives to maintain the fluidity interrelationships of all its membranes constant. Electron microscope evidence. J. Cell Biol., 72, 744—755.
- Kjekshus J. K., Bilix A. S., Eisner R., Hol R., Amundsen E. (1982). Myocardial blood flow and metabolism in the diving seal. Amer. J. Physiol., 242, R97—R104.
- Kleiber M. 1965. Respiratory exchange and metabolic rate. In: Handbook of Respiration, ed. W. O. Fenn and H. Rahn, Sec. 3, Vol. 2, 927—938. Washington, D. C., The American Physiological Society.
- Koehn R. K. (1969). Esterase heterogeneity: Dynamics of a polymorphism. Science, 163, 943—944.
- Kooyman G. L., Campbell W. B. (1972). Heart rates in freely diving Weddell seals, *Leptonychotes weddelli*. Comp. Biochem. Physiol., 43A, 31—36.
- Kooyman G. L., Castellini M. A., Davis R. W. (1981). Physiology of diving in marine mammals. Ann. Rev. Physiol., 43, 343—356.
- Kooyman G. L., Wahrenbrock E. A., Castellini M. A., Davis R. W., Sinnett E. E. (1980). Aerobic and anaerobic metabolism during voluntary diving in Weddell seals: Evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior. J. Comp. Physiol., 138, 335—346.
- Koshland D. E. (1973). Protein shape and biological control. Sci. Amer., 229, 52—64.
- Krebs H. A., Woods H. F., Alberti K. G. M. M. (1975). Hyperlactataemia and lactic acidosis. Essays in Medical Biochemistry, 1, 81—103.
- Krietsch W. K. G., Bucher T. (1970). 3-phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast. Eur. J. Biochem., 17, 568—580.
- Krog J. O., Zachariassen E. K., Larsen B., Smidsrod O. (1979). Thermal buffering in Afro-alpine plants due to nucleating agent-induced water freezing. Nature, 282, 300—301.
- Kuhn T. S., 1970. The Structure of Scientific Revolutions, 2nd ed., Chicago, University of Chicago Press.
- Laidler K. J., Bunting P. S., 1973. The Chemical Kinetics of Enzyme Action, London, Oxford University Press.
- Lanyi J. (1974). Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriol. Rev., 38, 272—290.
- Lanyi J. (1978). Light energy conversion in *Halobacterium halobium*. Microbiol. Rev., 42, 682—706.
- Lehninger A. L., 1975. Biochemistry. New York, Worth.
- Lenfant C., Elsner R., Kooyman G. L., Drabek C. M. (1969). Respiratory function of blood of the adult and fetus Weddell seal *Leptonychotes weddelli*. Amer. J. Physiol., 216, 1595—1597.
- Liggins G. C., Quist J., Hochachka P. W., Murphy B., Greasy R., Schneider R., Snider M., Zapol W. M. (1980). Fetal cardiovascular and metabolic responses to simulated diving in the Weddell seal. J. Appl. Physiol., 49, 424—430.
- Lin Y. (1979). Environmental regulation of gene expression: In vitro translation of winter flounder antifreeze messenger RNA. J. Biol. Chem., 254, 1422—1426.
- Lin Y., Long D. J. (1980). Purification and characterization of winter flounder antifreeze peptide messenger ribonucleic acid, Biochemistry, 19, 1111—1116.
- Ling G. N., 1979. The polarized multilayer theory of cell water according to the association hypothesis. In: Cell-Associated Water, ed. W. Drost-Hansen and J. Clegg, 261—269. New York, Academic Press.
- Longmuir I. S., Knopp J. A., Benson D. M., 1979. The heterogeneity of intracellular oxygen. 11th Int. Congress Biochemistry Abstracts, 428.
- Lovelock J. E., 1979. Gaia: A new Look at Life on Earth. Oxford, Oxford University Press.

- Low P. S., Somero G. N. (1974). Temperature adaptation of enzymes: a proposed molecular basis for the different catalytic efficiencies of enzymes from ectotherms and endotherms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 307—312.
- Low P. S., Somero G. N. (1975). Pressure effects on enzyme structure and function in vitro and under simulated in vivo conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52B**, 67—74.
- Low P. S., Somero G. N. (1976). Adaptation of muscle pyruvate kinases to environmental temperatures and pressure. *J. Exp. Zool.*, **198**, 1—12.
- Lukton A., Olcott H. S. (1958). Content of free imidazole compounds in muscle tissue of aquatic animals. *Food Res.*, **23**, 611—618.
- Lumry R., Biltonin R. (1969). Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformations in relation to physiological function. In: *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, ed. S. N. Timasheff and G. D. Fasman, 65—212, New York, Marcel Dekker.
- Lutz H., Weber H., Billetter R., Jenny E. (1979). Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits. *Nature*, **281**, 142—144.
- Lutz P. L., La Manna J. C., Adams M. R., Rosenthal M. (1980). Cerebral resistance to anoxia in the marine turtle. *Resp. Physiol.*, **41**, 241—251.
- McClanahan L., Jr. (1967). Adaptations of the spadefoot toad, *Scaphiopus couchi* to desert environments. *Comp. Biochem. Physiol.*, **20**, 73—99.
- McClanahan L., Jr., Stinner J. N., Shoemaker V. H. (1978). Skin lipids, water loss, and energy metabolism in a South American tree frog (*Phyllomedusa sauvagei*). *Physiol. Zool.*, **51**, 179—187.
- McGilveray R. W. (1975). The use of fuels for muscular work. In: *Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise*, ed. H. Howald and J. R. Poortmans, 12—30. Basel, Birkhauser Verlag.
- McGilveray R. W. (1979). *Biochemistry, A Functional Approach*, Philadelphia, W. B. Saunders.
- McLane J. A., Holloszy J. O. (1979). Glycogen synthesis from lactate in the three types of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **254**, 6548—6553.
- Mahler M., 1980. Kinetics and control of oxygen consumption in skeletal muscle. In: *Exercise Bioenergetics and Gas Exchange*, ed. P. Cerretelli and B. J. Whipp, 53—66. Amsterdam, Elsevier/North Holland.
- Malan A. (1978). Intracellular acid-base state at a variable temperature in air-breathing vertebrates and its representation. *Resp. Physiol.*, **33**, 115—119.
- Maloiy G. M. O., ed., 1979. *Comparative Physiology of Osmoregulation in Animals*, 2 vols, New York, Academic Press.
- Malpica J. M., Vassallo J. M. (1980). A test for the selective origin of environmentally correlated allozyme patterns. *Nature*, **286**, 407—408.
- Mangum C. P., Towle D. W. (1977). Physiological adaptation to unstable environments. *Amer. Sci.*, **65**, 67—75.
- Mansingh A. (1971). Physiological classification of dormancies in insects. *Can. Entomol.*, **103**, 983—1009.
- Manwell C. (1960). Histological specificity of respiratory pigments I. Comparisons of the coelom and muscle hemoglobins of the polychaete worm, *Travisia pupa* and the echinuroid worm, *Arhynchite pugettensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 267—276.
- Margules D. L. (1979). Beta-endorphin and endoloxone: Hormones of the autonomic nervous system for the conservation or expenditure of bodily resources and energy in anticipation of famine or feast. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **3**, 155—162.
- Markert C. L., 1963. Epigenetic control of specific protein synthesis in differentiating cells. In: *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, ed. M. Locke, 65—84. New York, Academic Press.
- Marsh R. L. (1981). Catabolic enzyme activities in relation to premigratory fattening and muscle hypertrophy in the gray catbird (*Dumetella carolinensis*). *J. Comp. Physiol.*, **141**, 417—423.

- Marshall N. B., 1979. Deep-Sea Biology. Developments and Perspectives. New York and London, Garland STPM Press.
- Matthew J. B., Hanania G. J. H., Gurd F. R. N. (1979a). Electrostatic effects in hemoglobin: Hydrogen ion equilibria in human deoxy- and oxyhemoglobin A. *Biochemistry*, 18, 1919—1928.
- Matthew J. B., Hanania G. J. H., Gurd F. R. N. (1979b). Electrostatic effects in hemoglobin: Bohr effect and ionic strength dependence of individual groups. *Biochemistry*, 18, 1928—1936.
- Measures J. C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature*, 257, 398—400.
- Merritt R. B. (1972). Geographic distribution and enzymatic properties of lactate dehydrogenase allozymes in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Amer. Nat.*, 196, 173—184.
- Meschia G., Battaglia F. C., Hay W. W., Sparks J. W. (1980). Utilization of substrates by the ovine placenta in vivo. *Fed. Proc.*, 39, 245—249.
- Mink J. W., Blumenschine R. J., Adams D. B. (1981). Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: Its constancy and functional basis. *Amer. J. Physiol.*, 241, R203-R212.
- Mitchell P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, *Science*, 206, 1148—1159.
- Mommsen T. P., Ballantyne J., MacDonald D., Gosline J., Hochachka P. W. (1981). Analogues of red and white muscle in squid mantle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3274—3278.
- Mommsen T. P., French C. J., Hochachka P. W. (1980). Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.*, 58, 1785—1799.
- Mommsen T. P., Hochachka P. W. (1981). Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, 120, 345—350.
- Moon T. W., Hochachka P. W. (1971). Temperature and enzyme activity in poikilotherms: Isocitrate dehydrogenase in rainbow trout liver. *Biochem. J.*, 123, 695—705.
- Moreadith R. W., Jacobus W. E. (1982). Creatine kinase of heart mitochondria. Functional coupling of ADP transfer to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.*, 257, 899—905.
- Mori M., Miura S., Morita T., Tatibana M., 1982. Transport of ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria. 12th Intl. Congress Biochemistry Abstracts, 359.
- Moser H. G. (1974). Development and distribution of juveniles of *Sebastolobus* (Pisces; Family Scorpaenidae). *U.S. Nat. Mar. Fish. Ser. Fishery Bull.*, 72, 865—884.
- Munro H. N. (1980). Placenta in relation to nutrition. *Fed. Proc.*, 39, 236—238.
- Murphy B. J., Hochachka P. W., Zapol W. M., Liggins G. C. (1982). Free amino acids in the blood of fetal and maternal Weddell seals. *Amer. J. Physiol.*, 242, R85—R88.
- Murphy B. J., Zapol W. M., Hochachka P. W. (1980). Metabolic activities of heart, lung, and brain during diving and recovery in the Weddell seal. *J. Appl. Physiol.*, 48, 596—605.
- Murphy D. J., Pierce S. K., Jr. (1975). The physiological basis for changes in the freezing tolerance of intertidal molluscs. I. Response to subfreezing temperatures and the influence of salinity and temperature acclimation. *J. Exp. Zool.*, 193, 313—322.
- Musick W. D. L., Rossmann M. G. (1979). The structure of mouse testicular lactate dehydrogenase isoenzyme C<sub>4</sub> at 2.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 254, 7611—7620.
- Nelson R. A. (1980). Protein and fat metabolism in hibernating bears. *Fed. Proc.*, 39, 2955—2958.

- Newsholme E. A., 1978. Control of energy provision and utilization in muscle in relation to sustained exercise. 3rd Intl. Symp. Biochemistry of Exercise (ed. F. Landry and W. A. R. Orban), 3—27, Miami, Simposia Specialists.
- Newsholme E. A., Crabtree B., Higgins S. J., Thornton S. D., Start C. (1972). The activities of fructose diphosphatase in flight muscles from the bumble-bee and the role of this enzyme in heat generation, *Biochem. J.*, **128**, 89—97.
- Newsholme E. A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism. New York, Wiley-Interscience.
- Nicholls D. G. (1976). The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Letters*, **61**, 103—110.
- Nicholls D. G. (1979). Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 1—29.
- Nuccitelli R., Deamer D. W., 1982. Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, and Utilization in Cellular Function. New York, Allen R. Liss.
- Nuccitelli R., Heiple J. M., 1982. Summary of the evidence and discussion concerning the involvement of  $\text{pH}_i$  in the control of cellular functions. In: Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, and Utilization in Cellular Function, ed. R. Nuccitelli and D. W. Deamer, pp. 567—586. New York, Allen R. Liss.
- Ohe M., Kajita A. (1980). Changes in  $\text{pK}_a$  values of individual histidine residues of human hemoglobin upon reaction with carbon monoxide. *Biochemistry*, **19**, 4443—4450.
- Ohno S., 1970. Evolution by Gene Duplication. Berlin, Springer-Verlag.
- Oshima T., 1979. Molecular basis for unusual thermostabilities of cell constituents from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. In: Strategies of Microbial Life in Extreme Environments, ed. M. Shilo, 455—469. Berlin, Dahlem Konferenzen 1979.
- Parkhouse W. S., McKenzie D. C., Hochachka P. W., Mommsen T. R., Ovalle W. K., Shinn S. L., Rhodes E. C., 1982. The relationship between carnosine levels, buffering capacity, fiber type, and anaerobic capacity in elite athletes. 5th Intl. Symp. Biochemistry of Exercise Abstracts, 2.
- Patterson J. L., Duman J. G. (1979). Composition of a protein antifreeze from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. *J. Exp. Zool.*, **210**, 361—367.
- Patterson J. L., Kelley T. J., Duman J. G. (1981). Purification and composition of a thermal hysteresis producing protein from the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J. Comp. Physiol.*, **142**, 539—542.
- Patton J. S. (1975). The effect of pressure and temperature on phospholipid and triglyceride fatty acids of fish white muscle: A comparison of deepwater and surface marine species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52B**, 105—110.
- Penniston J. T. (1971). High hydrostatic pressure and enzymatic activity: Inhibition of multimeric enzymes by dissociation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 322—332.
- Perutz M. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, **228**, 726—734.
- Perutz M., Bauer C., Gros G., Leclercq F., Vandecasserie C., Schnek A. G., Braunitzer G., Friday A. E., Joysey K. A. (1981). Allosteric regulation of crocodilian haemoglobin. *Nature*, **291**, 682—684.
- Pettigrew D. W., Frieden C. (1978). Rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3623—3627.
- Pfeiler E. (1978). Effects of hydrostatic pressure on  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  and  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  in gills of marine teleost fish. *J. Exp. Zool.*, **205**, 393—402.
- Phelps M. E., Kuhl D. E., Mazziotta J. C. (1981). Metabolic mapping of the brain's response to visual stimulation: studies on humans. *Science*, **211**, 1445—1448.
- Pike C. S., Berry J. A. (1980). Membrane phospholipid phase separations in plants adapted to or acclimated to different thermal regimes. *Plant Physiol.*, **66**, 238—241.



- Place A. R., Powers D. A. (1979). Genetic variation and relative catalytic efficiencies: Lactate dehydrogenase B allozymes of *Fundulus heteroclitus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 2354—2358.
- Podesta R. B., Mustafa T., Moon T. W., Hulbert W. C., Mettrick D. F., 1976. Anaerobes in a aerobic environment: Role of CO<sub>2</sub> in energy metabolism of *Hymenolepis diminuta*. In: Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships, ed. Van den Bossche, 81—88. New York, North-Holland Press.
- Pollard A., Wyn Jones R. G. (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. Planta, 144, 291—298.
- Powell E. N., Crenshaw M. A., Rieger R. M. (1980). Adaptations to sulfide in sulfide-system meiofauna. Endproducts of sulfide detoxification in three Turbellarians and a Gastrotrich, Mar. Ecol. Prog. Ser., 2, 169—177.
- Powell M. A., Somero G. N. (1983). Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*. Science, 219, 297—299.
- Powers D. A. (1972). Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes. Science, 177, 360—362.
- Powers D. A., Greaney G. S., Place A. R. (1979). Physical correlation between lactate dehydrogenase genotype and haemoglobin function in killifish. Nature, 277, 240—241.
- Prosser C. L., 1973. Comparative Animal Physiology, Philadelphia, W. B. Saunders.
- Prusiner S., Poe M. (1968). Thermodynamic considerations of mammalian thermogenesis. Nature, 220, 235—237.
- Quetin L. B., Childress J. J. (1976). Respiratory adaptations of *Pleuroncodes planipes* to its environment off Baja California. Mar. Biol., 38, 327—334.
- Rahn H., 1982. Comparison of embryonic development in birds and mammals: Birth weight, time, and cost. In: A Companion to Animal Physiology, ed. C. R. Taylor, K. Johansen, and L. Bolis, 124—137, Cambridge, Cambridge University Press.
- Rahn H., Reeves R. B., Howell B. J. (1975). Hydrogen ion regulation, temperature and evolution. Amer. Rev. Respir. Dis., 112, 165—172.
- Raison J. K., Berry J. A., Armond P. A., Pike C. S., 1980. Membrane properties in relation to the adaptation of plants to temperature stress. In: Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress, ed. N. C. Turner and P. J. Kramer, 261—273, New York, Wiley.
- Raison J. K., Roberts J. K. M., Berry J. A. (1982). Correlation between the thermal stability of chloroplasts (thylakoid membranes) and the composition and fluidity of the polar lipids upon acclimation of the higher plant, *Nerium oleander*, to growth temperatures. Biochim. Biophys. Acta, 688, 218—228.
- Ramsay J. A. (1964). The rectal complex of the mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), Phil. Trans. Royal Soc., London, Series B, 248, 279—314.
- Rau G. H. (1981). Hydrothermal vent clam and tube worm <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C: Further evidence of nonphotosynthetic food sources. Science, 213, 338—340.
- Raymond J. A., DeVries A. L. (1977). Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 2589—2593.
- Raymond J. A., Lin Y., DeVries A. L. (1975). Glycoprotein and protein antifreezes in two Alaskan fishes, J. Exp. Zool., 193, 125—130.
- Reeves R. B. (1972). An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: Tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. Resp. Physiol., 14, 219—236.
- Reeves R. B. (1977). The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates, Ann. Rev. Physiol., 39, 559—586.
- Riddiford L. M., Truman J. W., 1978. Biochemistry of insect hormones and insect

- growth regulators. In: Biochemistry of Insects, ed. M. Rockstein, 308—357. New York, Academic Press.
- Riedesel M. L., Steffen J. M. (1980). Protein metabolism and urea recycling in rodent hibernators. Fed. Proc., 39, 2959—2963.
- Rigby B. J. (1968). Temperature relationships of poikilotherms and the melting temperature of molecular collagen. Biol. Bull., 135, 223—229.
- Riggs A. (1960). The nature and significance of the Bohr effect in mammalian hemoglobins. J. Gen. Physiol., 43, 737—752.
- Robin E. D., Ensink J., Hance A. J., Newman M. D., Lewiston N., Cornell L., Davis R. W., Theodore J. (1981). Glucoregulation and prolonged diving in the harbor seal, *Phoca vitulina*. Amer. J. Physiol., 241, R293—R300.
- Robin E. D., Lewiston N., Newman A., Simon L. M., Theodore J. (1979). Bioenergetic patterns of turtle brain and resistance to profound loss of mitochondrial ATP generation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 3922—3926.
- Rolph T. P., Jones C. T. (1981). Glucose metabolism in the perfused heart of the foetal guinea pig, Biochem. Soc. Transactions, 9, 65.
- Rossi-Fanelli A., Antonini E. (1960). Oxygen equilibrium of hemoglobin from *Thunnus thynnus*. Nature, 186, 895—896.
- Rosso P., Cramoy C., 1982. Nutrition and pregnancy. In: Nutrition, Pre- and Postnatal Development, ed. M. Winick, 133—210. New York, Plenum Press.
- Rutledge P. S. (1981). Effects of temperature acclimation on crayfish hemocyanin oxygen binding. Amer. J. Physiol., 240, R93—R98.
- Sacktor B. (1976). Biochemical adaptations for flight in the insect. Biochem. Soc. Symp., 41, 111—131.
- Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1975). Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: Kinetic properties and regulatory action of  $Mg^{2+}$  ions. Eur. J. Biochem., 57, 273—290.
- Salt R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. Ann. Rev. Entomol., 6, 55—76.
- Saz H. J. (1981). Energy metabolism of parasitic helminths: Adaptations to parasitism. Ann. Rev. Physiol., 43, 323—341.
- Schade B. C., Rudolph R., Ludemann H.-D., Jaenicke (1980). Reversible high-pressure dissociation of lactic dehydrogenase from pig muscle. Biochemistry, 19, 1121—1126.
- Schmidt-Nielsen K., 1979. Animal Physiology: Adaptation and Environment. Cambridge, Cambridge University Press.
- Schneiderman H. A., Williams C. M. (1953). The physiology of insect diapause. VII. The respiratory metabolism of cecropia silkworm during diapause and development. Biol. Bull., 105, 320—334.
- Schneppenheim R., Theede H., 1979. Abstracts of the First European Society of Comparative Physiology and Biochemistry Conference. In: Animal and Environmental Fitness, p. 97. Oxford, Pergamon Press.
- Schneppenheim R., Theede H. (1980). Isolation and characterization of freezing-point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor*. Comp. Biochem. Physiol., 67B, 561—568.
- Schoffeniels E. (1976). Adaptations with respect to salinity. Biochem. Soc. Symp., 41, 179—204.
- Scholander P. F. (1940). Experimental investigations in diving mammals and birds. Hvalrad. Skr., 22, 1—131.
- Scholander P. F., Flagg W., Hoch R. J., Irving L. (1953). Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic. J. Cell. Comp. Physiol. Suppl., 1, 1—56.
- Schöttler U. (1977). The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in anaerobic mitochondria of *Tubifex* sp., Comp. Biochem. Physiol., 58B, 151—156.

- Setlow B., Setlow P. (1980). Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77, 2472—2476.
- Shaklee J. B., Christiansen J. A., Sidell B. D., Prosser C. L., Whitt G. S. (1977). Molecular aspects of temperature acclimation in fish: Contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. *J. Exp. Zool.*, 201, 1—20.
- Shoubridge E. A., Hochachka P. W. (1981). The origin and significance of metabolic carbon dioxide production in the anoxic goldfish. *Molec. Physiol.*, 1, 315—338.
- Sidell B. D. (1977). Turnover of cytochrome C in skeletal muscle of green sunfish (*Lepomis cyanellus*, R.) during thermal acclimation. *J. exp. Zool.*, 199, 233—250.
- Sidell B. D., Wilson F. R., Hazel J., Prosser C. L. (1973). Time course of thermal acclimation in goldfish. *J. Comp. Physiol.*, 84, 119—127.
- Siebenaller J. F., Somero G. N. (1978). Pressure-adaptive differences in lactate dehydrogenases of congeneric fishes living at different depths. *Science*, 210, 255—257.
- Siebenaller J. F., Somero G. N. (1979). Pressure-adaptive differences in the binding and catalytic properties of muscle-type ( $M_4$ ) lactate dehydrogenases of shallow- and deep-living marine fishes. *J. Comp. Physiol.*, 129, 295—300.
- Siebenaller J. F., Somero G. N. (1982). The maintenance of different enzyme activity levels in congeneric fishes living at different depths. *Physiol. Zool.*, 55, 171—179.
- Siebenaller J. F., Somero G. N., Haedrich R. L. (1982). Biochemical characteristics of macrourid fishes differing in their depths of distribution, *Biol. Bull. (Woods Hole)*, 163, 240—249.
- Sinensky M. (1974). Homeoviscous adaptation — a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 522—525.
- Singer S. J., Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720—731.
- Singleton R., Jr., Amelunxen R. E. (1973). Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 37, 320—342.
- Singleton R., Jr., Middaugh C. R., MacElroy R. D. (1977). Comparison of proteins from thermophilic and nonthermophilic sources in terms of structural parameters inferred from amino acid composition. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 10, 39—50.
- Slaughter D., Fletcher G. L., Ananthanarayanan V. S., Hew C. L. (1981). Anti-freeze proteins from the sea raven, *Hemitripteris americanus*. *J. Biol. Chem.*, 256, 2022—2026.
- Smith C., Velick S. F. (1972). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of liver and muscle. *J. Biol. Chem.*, 247, 273—284.
- Smith H. W. (1930). Metabolism of the lungfish *Protopterus aethiopicus*. *J. Biol. Chem.*, 88, 97—130.
- Smith K. L., Jr. (1978). Metabolism of the abyssopelagic rattail *Coryphaenoides armatus* measured *in situ*. *Nature*, 274, 362—364.
- Smith K. L., Jr., Hessler R. R. (1974). Respiration of benthopelagic fishes: *in situ*-measurements at 1230 meters. *Science*, 184, 72—73.
- Snapp B. D., Heller H. C. (1981). Suppression of metabolism during hibernation in ground squirrels (*Citellus lateralis*). *Physiol. Zool.*, 54, 297—307.
- Snell K. (1980). Muscle alanine synthesis and hepatic gluconeogenesis. *Transaction Biochem. Soc.*, 8, 205—213.
- Somero G. N. (1969). Pyruvate kinase variants of the Alaskan king-carb. *Biochem. J.*, 114, 237—241.
- Somero G. N., 1975. The role of isozymes in adaptation to varying temperatures. In: *Isozymes II: Physiological Function*, ed. by C. L. Markert, pp. 221—234. New York, Academic Press.

- Somero G. N. (1978). Temperature adaptation of enzymes: Biological optimization through structure-function compromises. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **9**, 1—29.
- Somero G. N. (1981). pH-temperature interactions on proteins: Principles of optimal pH and buffer system design. *Marine Biol. Letters*, **2**, 163—178.
- Somero G. N., 1982. Physiological and biochemical adaptations of deep-sea fishes: Adaptive responses to the physical and biological characteristics of the abyss. In: *The Environment of the Deep Sea*, ed. W. G. Ernst and J. G. Morin, pp. 256—278. Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, Inc.
- Somero G. N., Bowlus R. D. (1983). Solute compatibility with enzyme structure and function. In: *The Mollusca*, ed. P. W. Hochachka, **2**, 77—100. New York, Academic Press.
- Somero G. N., Childress J. J. (1980). A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger size fishes. *Physiol. Zool.*, **53**, 322—337.
- Somero G. N., Doyle D. (1973). Temperature and rates of protein degradation in the fish *Gillichthys mirabilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **46B**, 463—474.
- Somero G. N., Low P. S. (1976). Temperature: A «shaping force» in protein evolution. *Biochem. Soc. Symp.*, **41**, 33—42.
- Somero G. N., Low P. S. (1977). Eurytolerant proteins: mechanisms for extending the environmental tolerance range of enzyme-ligand interactions. *Amer. Nat.*, **111**, 527—538.
- Somero G. N., Siebenaller J. F. (1979). Inefficient lactate dehydrogenases of deep-sea fishes, *Nature*, **282**, 100—102.
- Somero G. N., Siebenaller J. F., Hochachka P. W. (1983). Biochemical and physiological adaptations of deep-sea animals. In: *The Sea*, ed. G. T. Rowe, **8**, 261—330, New York, Wiley.
- Somero G. N., Yancey P. H. (1978). Evolutionary adaptation of  $K_m$  and  $k_{cat}$  values: Fitting the enzyme to its environment through modifications in amino acid sequences and changes in the solute composition of the cytosol. *Symp. Biol. Hungarica*, **21**, 249—276.
- Sonoda T., Kawamoto S., Mori M., Tatibana M., 1982. 12th Intl. Congress of Biochemistry Abstracts, 312.
- Spiess F. N., Macdonald K. C., Atwater T., Ballard R., Carranza A., Cordoba D., Cox C., Diaz Garcia V. M., Francheteau J., Guerrero J., Hawkins J., Haymon R., Hessler R., Juteau T., Kastner M., Larson R., Luyendyk B., Macdougall J. D., Miller S., Normark W., Orcutt J., Rangin C. (1980). East Pacific rise: hot springs and geophysical experiments. *Science*, **207**, 1421—1433.
- Steinberg D., Khoo J. C. (1977). Hormone-sensitive lipase of adipose tissues. *Fed. Proc.*, **36**, 1986—1990.
- Stevens E. D., Fry F. E. J. (1971). Brain and muscle temperature in ocean caught and captive skipjack tuna. *Comp. Biochem. Physiol.*, **38A**, 203—211.
- Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. (1979). Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **505**, 215—278.
- Storey K. B., Baust J. G., Storey J. M. (1981). Intermediary metabolism during low temperature acclimation in the overwintering gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *J. Comp. Physiol.*, **144**, 183—190.
- Storey K. B., Hochachka P. W. (1974a). Enzymes of energy metabolism from a vertebrate facultative anaerobe, *Pseudemys scripta*. Turtle heart phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1417—1422.
- Storey K. B., Hochachka P. W. (1974b). Enzymes of energy metabolism in a vertebrate facultative anaerobe, *Pseudemys scripta*. Turtle heart pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1423—1427.
- Storey K. B., Storey J. M., 1983. Carbohydrate metabolism in cephalopods. In: *The Mollusca*, ed. P. W. Hochachka, 92—136. New York, Academic Press.
- Sugiyama T., Schmitt M. R., Ku S. B., Edwards G. E. (1979). Differences in cold

- lability of pyruvate,  $P_i$  dikinase among  $C_4$  species. *Plant Cell Physiol.*, 20, 965—971.
- Sullivan K. M., Somero G. N. (1980). Enzyme activities of fish skeletal muscle and brain as influenced by depth of occurrence and habits of feeding and locomotion. *Mar. Biol.*, 60, 91—99.
- Swan H., Schatte C. L. (1977). Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus*. *Science*, 195, 84—85.
- Swezey R. R., Somero G. N. (1982a). Polymerization thermodynamics and structural stabilities of skeletal muscle actins from vertebrates adapted to different temperatures and hydrostatic pressures. *Biochemistry*, 21, 4496—4503.
- Swezey R. R., Somero G. N. (1982b). Skeletal muscle actin content is strongly conserved in fishes having different depths of distribution and capacities of locomotion. *Marine Biol. Letters*, 3, 307—315.
- Theede H., Schneppenheim R., Beress (1976). Frostschutz-Glycoproteine bei *Mytilus edulis*? *Mar. Biol.*, 36, 183—189.
- Thomas D. P., Fregin G. F. (1981). Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in the horse. *J. Appl. Physiol.*, 50, 864—868.
- Torres J. J., Belman B. W., Childress J. J. (1979). Oxygen consumption rates of midwater fishes off California. *Deep-Sea Res.*, 26A, 185—197.
- Tracy C. R. (1977). Minimum size of mammalian homeotherms: Role of the thermal environment. *Science*, 198, 1034—1035.
- Trivedi B., Danforth W. H. (1966). Effects of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 241, 4110—4112.
- Tsai M. Y., Gonzalez F., Kemp R. G., 1975. Physiological significance of phosphofructokinase isozymes. In: *Isozymes II. Physiological Function*, ed. C. L. Markert, 819—835, New York, Academic Press.
- Tuttle J. H., Wirsén C. O., Jannasch H. W. (1983). Microbial activities in the emitted hydrothermal waters of the Galapagos rift vents. *Marine Biol.*, 73, 293—299.
- Ullsch G. R., Jackson D. C. (1982). Long-term submergence at 3 °C of the turtle, *Chrysemys picta bellii*, in normoxic and severely hypoxic water. *J. Exp. Biol.*, 96, 11—28.
- Uyeda K., Furuya E., Luby L. J. (1981). The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 256, 8394—8399.
- Uyeda K., Racker E. (1965). Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 240, 4682—4688.
- Vaghy P. L. (1979). Role of mitochondrial oxidative phosphorylation in the maintenance of intracellular pH. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11, 933—940.
- Van Voorhies W. V., Raymond J. A., DeVries A. L. (1978). Glycoproteins as biological antifreeze agents in the cod, *Gadus ogac* (Richardson). *Physiol. Zool.*, 51, 347—353.
- Van den Thillart G. (1982). Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. *Molec. Physiol.*, 2, 49—62.
- Vary T. C., Reibel D. K., Neely J. R. (1981). Control of energy metabolism of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 43, 419—430.
- Vik S. B., Capaldi R. A. (1977). Lipid requirements for cytochrome *c* oxidase activity. *Biochemistry*, 16, 5755—5759.
- Von Hippel P., Schleich T., 1969. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, ed. S. N. Timascheff and G. D. Fasman. 417—574, New York, Marcel Dekker.
- Wald G. (1964). The origins of life. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 52, 595—611.
- Walsh P. J. (1981). Purification and characterization of glutamate dehydrogenase from three species of sea anemones: Adaptation to temperature within and among species from different thermal environments. *Marine Biol. Letters*, 2, 289—299.

- Walsh P. J., Somero G. N. (1982). Interactions among pyruvate concentration, pH, and  $K_m$  of pyruvate in determining in vivo  $Q_{10}$  values of the lactate dehydrogenase reaction. *Can. J. Zool.*, 60, 1293—1299.
- Wang L. C. H., 1978. Energetic and field aspects of mammalian torpor: The Richardson's ground squirrel. In: *Strategies in Cold — Natural Torpidity and Thermogenesis*, ed. L. C. H. Wang and J. W. Hudson, 109—145, New York, Academic Press.
- Wann K. T., Macdonald A. G. (1980). The effects of pressure on excitable cells, *Comp. Biochem. Physiol.*, 66A, 1—12.
- Watt W. B. (1977). Adaptation at specific loci. I. Natural selection on phosphoglucose isomerase of *Colias* butterflies: biochemical and population aspects, *Genetics*, 87, 177—194.
- Weber R. E., Bonaventura J., Sullivan B., Bonaventura C. (1978). Oxygen equilibrium and ligand-binding kinetics of erythrocyte hemoglobins from two burrowing polyphagous of different modes of life, *Marphysa sanguinea* and *Diopatra cuprea*. *J. Comp. Physiol.*, 123, 177—184.
- Weeda E., Koopmanschap A. B., de Kort C. A. D., Beenackers A. M. Th. (1980). Proline synthesis in fat body of *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem.*, 10, 631—636.
- Weibel E. R., Taylor C. R. (1981). Design of the mammalian respiratory system, *Resp. Physiol.*, 44, 1—164.
- Whalen R. G., Sell S. M., Butler-Browne G. S., Schwartz K., Bouveret P., Pinset-Harstrom I. (1981). Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292, 805—809.
- White F. N., Somero G. N. (1982). Acid-base regulation and phospholipid adaptations to temperature: Time courses and physiological significance of modifying the milieu for protein function. *Physiol. Rev.*, 62, 40—90.
- Wiggins P. M. (1971). Water structure as a determinant of ion distribution in living tissue. *J. Theor. Biol.*, 32, 131—146.
- Wiggins P. M., 1979. Metabolic control of the properties of intracellular water as a universal driving force for active transport. In: *Cell-Associated Water*, ed. W. Drost-Hansen and J. Clegg, 69—114. New York, Academic Press.
- Williams P. M., Smith K. L., Druffel E. M., Linick T. W. (1981). Dietary carbon sources of mussels and tubeworms from Galapagos hydrothermal vents determined from tissue  $^{14}\text{C}$  activity. *Nature*, 292, 448—449.
- Williamson J. R., Safer B., LaNoue K. F., Smith C. M., Walajtys E. (1973). Mitochondrial-cytosolic interactions in cardiac tissue: role of the malate-aspartate cycle in the removal of glycolytic NADH from the cytosol. *Soc. Exp. Biol. Symp.*, 27, 241—281.
- Wilson D. F., Erecinska M., Drown C., Silver I. A. (1979). The oxygen dependence of cellular energy metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 195, 485—493.
- Wilson F. R., Somero G. N., Prosser C. L. (1974). Temperature — metabolism relations of two species of *Sebastes* from different thermal environments. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B, 485—491.
- Wilson J. E. (1980). Brain hexokinase, the prototype ambiguous enzyme, *Curr. Top. Cell. Reg.*, 16, 1—44.
- Wolfe R. R., Hochacka P. W., Trelstad R. L., Burke J. F. (1979). Lactate oxidation in perfused rat lung. *Amer. J. Physiol.*, 236, E276—282.
- Wood S. C., Johansen K. (1972). Adaptation to hypoxia by increased  $\text{HbO}_2$  affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature New Biol.*, 237, 278—279.
- Wood S. C., Johansen K. (1973). Organic phosphate metabolism in nucleated red cells. Influence of hypoxia on eel  $\text{HbO}_2$  affinity. *Neth. J. Sea Res.*, 7, 328—338.
- Wood S. C., Johansen K. (1974). Oxygen uptake and cardiac output in eel adapted to hypoxia. *Physiologist*, 17, 362.
- Wu T. F. L., Davis E. J. (1981). Regulation of glycolytic flux in an energetically

- controlled cell-free system: the effects of adenine nucleotide ratios, inorganic phosphate, pH, and citrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 85—99.
- Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**, 1214—1222.
- Yancey P. H., Somero G. N. (1978a). Temperature dependence of intracellular pH: its role in the conservation of pyruvate apparent  $K_m$  values of vertebrate lactate dehydrogenases. *J. Comp. Physiol.*, **125**, 129—134.
- Yancey P. H., Somero G. N. (1978b). Urea-requiring lactate dehydrogenases of marine elasmobranch fishes. *J. Comp. Physiol.*, **125**, 135—141.
- Yancey P. H., Somero G. N. (1979). Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem. J.*, **183**, 317—323.
- Yancey P. H., Somero G. N. (1980). Methylamine osmoregulatory solutes of elasmobranch fishes counteract urea inhibition of enzymes, *J. Exp. Zool.*, **212**, 205—213.
- Zachariassen K. E. (1980). The role of polyols and nucleating agents in cold-hardy beetles. *J. Comp. Physiol.*, **140**, 227—234.
- Zapol W. M., Liggins G. C., Schneider R. C., Qvist J., Snider M. T., Creasy R. K., Hochachka P. W. (1979). Regional blood flow during simulated diving in the conscious Weddell seal. *J. Appl. Physiol.*, **47**, 968—973.
- Zuber H., 1979. Structure and function of enzymes from thermophilic microorganisms. In: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*, ed. M. Shilo, 393—415, Berlin, Dahlem Konferenzen 1979.

# Предметный указатель

- Адаптация биологических растворов 337—389
- — — буферные системы и pH 371—383
  - — — влияние на белки 358—362, 369—371
  - — — мочевина, значение 360—364
  - — — осмолиты 342—358, 369—370
  - — — основные стратегии 338
  - — — у галофильных бактерий 364—369
  - гемоглобинов у позвоночных 318—326
  - дыхательных белков у беспозвоночных 331—332
  - и гомеостаз 11
  - и энантиостаз 11
  - к беременности 293—294
  - к давлению гидростатическому 490—493
  - — — липидные системы 509—512
  - — — энергия активации 501
  - — — изменение осмотического давления 338—339
  - к морским глубинам 487—534, *См. также* Глубины морские
  - — — биохимические изменения 500—512
  - — — в гидротермальных источниках 524—532
  - к нырянию *см.* Ныряние, адаптация
  - к работе длительной 135—138
  - — — кратковременной интенсивной 116—118
  - к температуре 390—486
  - — — аллозимы 440
  - — — белки 412—459
  - — — изозимы 437
  - — — липиды 459—471
  - — — нерешенные проблемы 484—486
  - — — толерантность к замораживанию 471—484
  - — — эктотермия 411—412
  - — — эндотермия 396—411
  - — — энергия активации 501
  - к физической нагрузке 98—164
  - — — выработка энергии 138—142
  - — — гликолиз 112—116
  - — — жиры 119—123
  - — — метаболизм и работа мышц 99—100, 103—111
  - — — митохондрии 129—135
  - — — окислительные процессы 118, 142—146
  - — — у беспозвоночных 146—149
  - — — цикл Кребса 123—127
  - к холоду *см.* Адаптация к температуре и Акклимация к температуре
  - компенсаторная 19
  - макромолекулярных компонентов 13
  - метаболическая *см.* Метаболическая адаптация
  - механизмы 12—13
  - микросреды 12—15
  - молочных желез 303—305
  - наступательная 19
  - немедленная 18
  - «оборудования» и его производительности 26—27
  - парадигма 9
  - развитие 279—310
  - скорость 17—19
  - стратегии 12, 98—99
  - у отъемышей 305—306
  - ферментов 63, 90—91
  - формы 10
- Аденилаты в регуляции метаболизма 84
- запасание энергии 27—30
- Аденозиндифосфат (ADP) при гликолизе 111—112
- Аденозиндифосфат-синтетаза *см.* Комплекс  $P_1-P_0$
- Аденозинмонофосфат (AMP) 25
- Аденозинтрифосфат (АТР), гидролиз, образование  $H^+$  187—188
- выход при окислении 54, 59—61
  - как сопрягающий фактор 24
  - как универсальный преобразователь энергии 24
  - как химическое «топливо» 26—30
  - ресинтез, соотношение с образованием  $H^+$  191—192
  - синтез при переносе электронов 22, 52, 54—57
  - — — брожении 177
  - эквивалент (АТР-эквивалент) 26—27
- Аденозинтрифосфатаза (АТРаз), активация при мышечной работе 159
- влияние температуры 510
  - мембран, при температурной адаптации 471



- Аденозинтрифосфат - пирофосфатаза (АТФ-пирофосфатаза) 93  
Акклиматизация 18  
Акклимация 18  
— к температуре 243. *См. также* Адаптация к температуре  
Аконитаза в цикле Кребса 37  
Актин, полимеризация и тепловая денатурация 457  
— сборка субъединиц при температурной адаптации 456  
Аланин 36  
Аланиндегидрогеназа 44  
Аланопин, продукт анаэробного обмена 36  
Аланопиндегидрогеназа 151  
Аллозимы 12  
— и температурная адаптация 440  
Алlostерия 76  
Альфастатическая регуляция 372, 431. *См. также*  $\alpha$ -Имидазол  
Аминоацил-тРНК-синтетаза 92  
Аминокислоты в биологических растениях 350  
— как источник энергии 103  
— метаболизм в печени 47  
— — при внутриутробном развитии 290—291  
— — при зимней спячке 259—261  
— при летней спячке у рыб, схема 254—256  
— углеродный скелет, судьба 41—43, 46—48  
Аммиак ( $\text{NH}_4^+$ ), судьба 44—45  
Аммонийтелические формы 44, 46  
Анабиоз 23  
Анаплеротические реакции 47, 49  
Анаэробноз, образование  $\text{H}^+$  191—192  
Анаэробные животные, системы автономного жизнеобеспечения 172—173  
— условия, влияние тренировки на биохимию 156—157  
— — работа мышц, фосфагены 118, 155—156  
— — тренировка, механизмы 153  
Анаэробный обмен у беспозвоночных 198—199  
Анаэробы, первые живые организмы 166—167  
— энергообеспечение 118  
Ангидробноз 230—233  
— биологическое значение 240—241  
— у нематод, «пробуждение» 239—240. *См. также* Нематоды почвенные  
Аноксия 166—205  
— гликоген печени у рыб и черепах 207—209  
— жизнеобеспечение 203—205  
— образование  $\text{H}^+$  191—192  
— проблема конечных продуктов 183—198  
— устойчивость у разных видов 174  
Антифризы высокомолекулярные 477—480  
— механизм действия 480—482  
— синтез и расщепление 483  
— у насекомых 482  
Аргинин 36  
— метаболизм у моллюсков 200  
Аргининфосфат у беспозвоночных 104. *См. также* Фосфагены  
— у моллюсков 199  
Аскарида, адаптация к температуре 447  
Аспартат, обмен при гликолизе 35. *См. также* Аминокислоты, обмен  
Аспартат-аминотрансфераза, усиление цикла Кребса 127  
— при челночном переносе водорода 54  
Ацетилглутамат, регуляция цикла мочевины 261—262  
Ацидоз, предотвращение 195  
Ацил-CoA-синтетаза 39  
Аэробное жизнеобеспечение 118  
Аэробные условия, механизмы адаптации 158  
— — мышечная работа 118  
— — тренировка 158, 163  
  
Бактерии, брожение *см.* Брожение у бактерий  
— галофильные *см.* Галофильные бактерии  
— денитрификация при аноксии 168, 172  
— метаболизм, схема 172  
— термофильные *см.* Термофильные бактерии  
Бактерии-эндосимбионты хемолитотрофные 529  
Белки (белок), адаптивные изменения 412—459  
— адаптированные к мочеvine 360—362  
— ассоциация субъединиц, влияние температуры и pH 453—456  
— галофильные *см.* Галофильные белки  
— гидролиз 41—42  
— дыхательные 311—336  
— — аналоги ферментов 312—315

- — переносчики  $O_2$  313
- как источники энергии 41, 103
- — — при спячке у рыб 254
- катаболизм 41
- конформация, влияние давления 494
- метаболизм при спячке 273—276
- синтез, отбор аминокислот 92
- структура, влияние растворенных веществ 358—360
- — первичная, вторичная, третичная 67
- судьба углерода 42
- термостабильность 446—447
- у глубоководных рыб 504—509
- фосфорилирование 90
- Беннетта — Рубена гипотеза* 410
- Беременность, адаптация материнского организма 293—294
- Беспозвоночные, адаптация к физической нагрузке 146—149
- анаэробный обмен, конечные продукты 198—199
- в горячих водах 524
- гемоглобины 313
- морские, окислительный метаболизм 63
- факультативно-анаэробные, гипоксия 209
- фосфагены 104
- Бикарбонат, выведение из организма 266—268
- Биологические растворы, «конструкция» 385
- — растворенные вещества взаимокompенсирующие 355—358. *См. также Осмолиты*
- Бора эффект* 317, 323—324
- Брожение, главные пути у животных 31. *См. также Гликолиз*
- истинное 167—169
- при аноксии 192—193
- пропионатное, стехиометрия  $H^+$  187
- сопряженное с АТФазной реакцией 189—191
- спиртовое, баланс  $H^+$  197—198
- с повышенной энергетической эффективностью 177—181
- стехиометрия  $H^+$  186—187
- сущность 169—170
- у бактерий, общая организация 170—172
- Буферная емкость мышц *см. Мышцы*, буферная емкость
- — оптимум pH 371—381
- Буферные системы внутриклеточные, свойства 379—381
- Буферы дипептидные 380
- Бычок, адаптация к температуре 427
- Вода вицинальная и связанная 235
- при спячке 270—272
- растворяющая способность и эволюция 383—389
- удержание в организме, роль мочевины 270—271
- Водород, перенос через мембрану в митохондриях 53
- Восстановительная сила (восстановительные эквиваленты) при диапаузе 245—250
- Вскармливание, метаболическая адаптация у матери 302—303
- Галофильные бактерии, стратегия адаптации 364—369
- Гексокиназа в онтогенезе, изозимы 285—286
- Гельминты, гликолиз 36
- дыхательная цепь 63
- Гемоглобин(ы) 313
- модуляция 317—318, 326—331
- позвоночных, функция 315—316, 318—324
- саламандры,  $P_{50}$ , влияние pH 325
- связывание  $O_2$ , графики 314
- у разных видов 319, 323—325
- функциональные свойства у кижуча 323
- человека 319
- эффект Бора 324
- Гемоцианин(ы) 313, 331
- Гемозитрин(ы) 313, 331, 335
- Гидратация 494
- Гидротермальные источники 524—527, 531—534
- Гиперосмотичность 339
- Гипоосмотичность 339
- Гистерезис температурный 477, 480
- Гистидин, имидазольная группа 372—373
- Гликоген, акклимация к температуре 243
- брожение пропионатное 187
- мобилизация 88
- мышц при анаэробной работе 155—156,
- — и печени, влияние аэробной тренировки 162
- — позвоночных, превращения 108
- при аноксии, перезарядка депо 201—203
- при диапаузе 245
- связанный с мембраной 32
- «топливо» для мышц 99—100, 103

- формы хранения 32, 174—176
- эндогенный субстрат в красных мышцах 118—120
- $\alpha$ - и  $\beta$ -частицы 32
- Гликогенолиз, образование протонов, стехиометрия 185—186
- Гликогенфосфорилаза, изоэзимы 107
- каскадная регуляция 106—108
- стратегическое положение 87
- Гликогенфосфорилазы *a* и *b*, регуляторная цепь 88—89
- Гликолиз 30—32. *См. также* Брожение
- анаэробный 112, 113
- образование протонов, стехиометрия 184—186
- обращение реакции 81
- регуляция 111—112
- связь с обменом аминокислот 35
- Гликолитические ферменты 161—162
- Глицерол, значение при обезвоживании 236, 238, 240
- роль при акклимации к температуре 243
- судьба 38—39
- у *Dunaliella*, регуляция концентрации 354
- $\alpha$ -Глицеролфосфатдегидрогеназа (ГФДГ) 33—34, 54
- $\alpha$ -Глицерофосфатный цикл 54
- челнок 55
- Глицин 36
- Глубоководные животные, метаболизм 512—524
- условия 487—490
- Глутаматдегидрогеназа 43
- синтез аминокислот 352
- Глюкоза как источник энергии, преимуществ 371
- метаболизм, регуляция 83
- — связь с обменом жиров 119
- окисление АТФ 59
- — энергетический баланс 57—59
- печени, влияние аэробной тренировки 162
- сбраживание, протонный баланс 186—187
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, влияние солей и глицерола 349
- Глюконеогенез, обращение реакций 81
- при внутриутробном развитии 291—292
- Голодание и спячка 257—259
- роль жирных кислот 37—38
- Гомеостаз водный 270—272
- вязкости 459, 462
- и адаптация 11
- метаболический, восстановление после аноксии 198—205
- Гомойотермия 395
- эндотермная 409
- Гофмейстера ряд 345, 367
- Грызуны, зимняя спячка 256—261
- Давление гидростатическое, влияние на АТФазы 510
- — — белки 504—509
- — и адаптация 490—512
- Дегидрогеназы конечные, у моллюсков 151—153
- Дезаминирование 42—43
- Декарбоксилирование и перенос электронов 50
- Десатураза, регуляция активности 465
- Диапауза у насекомых 241—250
- Диацилглицеролы (диглицериды) 124
- Дигидроксиацетонфосфат как сопрягающий агент 25
- 1,3-Дифосфоглицерат 29, 31, 34
- 2,3-Дифосфоглицерат 34
- Дифференцировка, сопряжение с катаболизмом 22—23
- Дождевой червь, адаптация к температуре 447
- Дрожжи, метаболизм (схема) 172
- Дрожь и термогенез 403
- Дыхательная цепь 51—52
- Дыхательные белки *см.* Белки дыхательные
- Жвачные, кислотно-щелочной баланс 270
- Жидкомозаичная модель 462
- Жидкость внутриклеточная, рН 381—383
- Жирные кислоты, метаболизм 38—40
- — в онтогенезе 289—290
- — при температурной адаптации 463—464
- Жировые клетки 122
- Жиры, использование в мышцах 121—122
- мобилизация в жировой ткани 122—123
- обмен, связь с обменом глюкозы 119
- окисление 37—40
- «топливо» для мышц 100
- эндогенный субстрат для мышечной работы 118—120
- Замерзание, толерантность и резистентность 471—484
- Золотая рыбка, адаптация к температуре 427, 466

- — гликолиз 36
- — метаболизм при аноксии 174

### Изозимы (изоферменты) 12

- в онтогенезе 285—289
- значение 70—71
- и температурная акклимация 437
- связь с аллозимами 12

### Изоосмотичность 339

### Изоферменты см. Изозимы

### Изофторидозид 354—355

### Изоцитратдегидрогеназа 110

### — NAD<sup>+</sup>-зависимая 37

### Имидазол, протонирование 429

### $\alpha$ -Имидазол ( $\alpha$ имид) 372—376, 429—431. См. также Альфа-статическая регуляция

### Имидазольная группа гистидина и адаптация к водным растворам 372—373

### Иминокислоты 36

### — образование у моллюсков 151

### Ионизация метаболитов, значение 381—383

### Кажущаяся $K_m$ см. Константа Михаэлиса кажущаяся

### Калорийность пищевых продуктов 60

### Кальвина — Бенсона цикл 467

### Кальмары, мышечная работа 149

### Кальмодулин 90

### Карбамоилфосфат в цикле мочевины 45

### Карнитин в обмене жирных кислот 39

### Карнитин-ацилтрансферазы 40

### Карп 427

### Катаболизм 22

### — липидов см. Липиды, катаболизм

### — у эукариот, особенности 22

### Кетонные тела, образование в печени 47

### Кислород ( $O_2$ ), потребление при тяжелой работе 99

### Кислородная емкость дыхательных белков 313—315

### Кислотно-щелочная регуляция у хозяина и симбионта 270

### Кожный воск 471

### Комплекс $F_1 - F_2$ 57

### Константа Михаэлиса кажущаяся 424—429

### — — — влияние гидростатического давления 495—497

### Конформация 67

### Кооперативность отрицательная 74—76

### — положительная 72—74

### — связывания субстрата 72

### Кооперативный фермент 80

### Кори цикл у моллюсков головоногих 200

### «Корректирование», стратегия и механизм 91—94

### Кошлэнда — Немети — Филмера модель 73

### Коэффициент P/O 57—59

### Креатинфосфат и перенос энергии 129. См. также Фосфагены

### — мышц 99, 103, 155—156

### — фосфаген у позвоночных 104

### Креатинфосфатаза митохондрий 129—131

### — цитозоля 129

### Кребса цикл 37—40, 47

### — — амфиболическая и анаплеротическая роль 47

### — — контроль 37

### — — при диапаузе 247—250

### — — промежуточные продукты 47—50, 126—127

### — — регуляция 123—126

### — — у факультативных анаэробов (схема) 172

### — — усиление функции 127

### — — — в летательных мышцах пчелы 148

### Криптобиоз 233. См. также Ангидробиоз

### Кровеносная система и регуляция теплоотдачи 407

### Кровообращение, адаптивные особенности 406

### Кролик, адаптация к давлению 501

### — — к температуре 416—417, 426, 447

### — буферная емкость мышц 115

### Крыса, адаптация к температуре 427

### — метаболизм при аноксии 174

### Курица, адаптация к температуре 447

### Лактат, минимизация накопления 193—194

### — у позвоночных при аноксии 201

### Лактатдегидрогеназа, изозимы в онтогенезе 286—289

### — субъединицы 12—13

### — у рыб 114, 500—504, 515—517

### — электрофоретические и кинетические свойства 434—438

### — $K_m$ , влияние солей 348

### Лактация, липогенез 303—304

### Лактоза, синтез в молочных железах 304—305

### Лизопин 36

- Лизосомы 35  
Липазы 39  
Липидные системы, адаптация к давлению 509—512  
Липиды, биологические мембраны 461  
— влияние температуры 459—471  
— депо и катаболизм 37  
Липогенез при внутриутробном развитии 292—293  
— — при лактации 303  
Лосось, мышечное дыхание 62  
Лягушка, темневая адаптация 427
- Магний ( $Mg^{2+}$ ) при гликолизе, влияние 184—185  
Малат-аспартатный челнок 53—54  
Малатдегидрогеназа, перенос водорода 54  
Медведи, спячка 232, 272—276  
Мембраны, АТРаза 470  
— биологические 460—465  
— липиды 461  
— температурная адаптация 469—471  
Метаболизм активный, выключение 230—278  
— клетки, блок-схема 23  
— — «конструкция» 15  
— на ранних стадиях развития 306—308  
— необходимые условия 224  
— при адаптации к нагрузке 99—100  
— — аноксии 166—205  
— — паузе 242—245  
— — спячке 276—278  
— у беспозвоночных, разветвление путей (схема) 178  
— у глубоководных животных 512—524  
— у животных гидротермальных зон 531—534  
— функциональные блоки 22—25  
— эволюция 383  
Метаболиты, эволюция и адаптация 387  
Метаболическая адаптация у кормящей матери 296—305  
Метиламины, влияние на ферменты 356—358  
— и адаптация к биологическим растворам 362—364  
— регуляция концентрации 362—363  
— эффекты 363—364  
Млекопитающие, адаптация к нырянию 224  
— — при индивидуальном развитии 279—310  
— цикл мочевины 265  
Микромолекулы 15  
Микроокружение 15—16  
Митохондрии, влияние аэробной тренировки 160  
— дыхание, модели 55  
— и регуляция фосфорилирования 127—129  
— и регуляция ADP-зависимая 132  
— дыхательная цепь 51—54  
— метаболизм, регуляция 61—64  
— мышечные, насыщение ADP, влияние тренировки 134  
— трансмембранный перенос протонов 401  
— ферменты, значение сродства к ADP 131—132  
Михаэлиса константа ( $K_m$ ) 70  
— — кажущаяся 424—429, 495—497  
Михаэлиса — Ментен уравнение 69, 71, 74  
Модуляторы ферментативной активности 77—81  
Модуляция гемоглобина адаптивная 326—331  
Моллюски 35, 151—153, 199—200  
Молоко материнское, адаптация к нему 299—302  
Молочная кислота, переработка при нырянии 225—226  
Молочные железы, липогенез 303—304  
— — синтез лактозы 304—305  
Моносахариды, взаимодействие с белками 371  
Моно — Уаймена — Шанжэ модель 73  
Морские глубины см. Глубоководные условия  
Мочевая кислота, пути выделения 44—46  
Мочевина, влияние на ферменты 356—358  
— и адаптация к биологическим растворам 360—364  
— и удержание воды при спячке 270—271  
— использование вторичное при спячке 268  
— регуляция концентрации 362—363  
— синтез 44  
— эффекты 363—364  
Мочевинный цикл, появление в филогенезе 45—46  
— — регуляция 261—266  
— — — кислотно-щелочного баланса 270  
— — удаление бикарбоната 266—267

- Мышечная работа, «топливо» 99—100
- Мышцы, адаптация к нагрузке 99—100
- белые 101, 105—108
- у рыб, влияние глубины 518—519
- буферная емкость и способность к анаэробной работе 114—116
- «быстрые» и «медленные» 62, 101
- волокна быстрые («гликолитические»), адаптивные изменения 101, 154—155
- гипертрофия рабочая 153—154
- гликогенфосфоорилаза 106—108
- млекопитающих, дипептидные буферы 380
- при аэробной тренировке 159
- позвоночных, гликоген 105—108
- скелетные, мощность 100
- снабжение  $O_2$ , влияние тренировок 163
- типы волокон 100—102, 118
- Мышь, метаболизм при аноксии 174
- Насекомые, диапауза *см.* Диапауза у насекомых
- источники энергии 33, 62—63
- мышцы скелетные, работа 146
- Нематоды почвенные, ангидриобиоз 237—240
- Ныряние, адаптация 206—229
- анаэробные и аэробные функции 219—220
- аэробное жизнеобеспечение 218—219
- кормовое и исследовательское 220—222
- оборот АТФ 222
- потребление  $O_2$  217—218
- преимущества аэробного метаболизма 228—229
- проблема конечных продуктов 224—226
- продолжительность, влияние размеров тела 222—223
- снижение интенсивности метаболизма 212—213
- энергетические потребности 214—217
- Ныряющие животные, буферная емкость мышц 115
- — восстановление гомеостаза 226—228
- — лактатдегидрогеназы и буферная емкость 116
- NADP (NADPH и NADP<sup>+</sup>) 25
- Обезвоженное состояние 230
- Обезвоженные организмы 233
- $\beta$ -Окисление в мышцах 121
- $\beta$ -Спираль 40—41
- Окислительно-восстановительный потенциал при гликолизе 36
- Окислительный метаболизм, влияние аэробной тренировки 160
- — преимущества перед анаэробным 141
- 2-Оксоглутаратдегидрогеназа 37
- Октопин 31, 36, 150, 152
- Октопиндегидрогеназа у моллюсков 151
- Окунь, метаболизм при аноксии 174
- Омар, температурная адаптация 416—417
- Онтогенез *см.* Развитие
- Орнитин и цикл мочевины 45, 262—263
- Осмолиты (*см. также* Растворенные вещества)
- взаимодействие с белками и водой 369—370
- взаимокompенсирующие 355—358
- концентрация 340—341
- накопление 342—344
- совместимые 344—355
- Осмолиты-антагонисты, стратегия 344
- Осмотическая регуляция 341
- Осмотическое давление, регуляция 339
- Паракват, токсичность 94
- Пальмитил-CoA 39
- Пирролин-5-карбоксилат 50
- Пируват в мышцах позвоночных 427
- ключевая роль 37
- конечный продукт анаэробного обмена 31, 36, 49
- при аноксии у рыб 194
- при брожении 31
- роль в окислительно-восстановительной регуляции 31, 49
- Пируватдегидрогеназа 37, 50
- Пируваткарбоксилаза 49
- Плацента 280, 282
- Поведенческие функции, влияние температуры 465—466
- Погонофоры гигантские 524
- Пролин в цикле Кребса 50
- как источник энергии 61
- Пролиндегидрогеназа 50
- Пропионат, образование при брожении 31
- Пропионил-CoA 35
- Протеиназы 42

- Протонный баланс при сбраживании глюкозы и гликогена 186—187  
— градиент 56—57  
Протоны ( $H^+$ ), баланс при спиртовом брожении 197—198  
— влияние на биологические системы 371  
— и модуляция гемоглобинов 317—318  
— метаболический интермедиат 183—184  
— реакции с их потреблением 195—197  
— стехиометрия образования при гликолизе и гликогенолизе 184—185, 189—191  
— хемиосмотическая теория 56—57  
Птицы, адаптация к нырянию
- Радикалы повреждающие, защитные механизмы 94—96  
Развитие внутриутробное, аминокислоты 290—291  
— — глюконеогенез 290—292  
— — липогенез 292—293  
— — ограничения, связанные с размером тела 294—296  
— индивидуальное, окисление жирных кислот 289—290  
— — ранние стадии, метаболизм 306—308  
— у млекопитающих, изозимы 285—289  
— — — источники энергии у плода 282—285  
— — — стадии 279—281  
Растворенные вещества взаимокompенсирющие 355—358. *См. также* Осмолиты  
— — влияние на структуру белка 358—360  
— — совместимые, регуляция концентрации 352—355  
Растворы биологические 339—342  
Регуляторные механизмы каскадного типа 90—91  
Регуляция концентрации совместимых осмолитов 352—355  
— метаболическая 13  
— сущность проблемы 65—66  
— уровень регуляции 66—68  
Рибонуклеазы, температура плавления, влияние растворенных веществ 359—360  
Роды, метаболическая адаптация 296—297
- Рыбы, адаптация к температуре 447  
— адаптивные изменения мышц 106  
— акклимация к гипоксии 327  
— глубоководные 500—504, 522  
— двигательные системы 100—101  
— двоякодышащие, ферменты 32, 207—209  
— — метаболическая адаптация 209, 251  
— — летняя спячка 231, 250—256  
— — костистые, адаптивные изменения 115  
— — глубина обитания 498  
— морские, ферменты 518—519  
— мышечные волокна 114
- Саламандра, гемоглобин 325  
Серин, дезаминирование 43  
Сероводород, детоксикация 194—195  
Синапсомы при температурной адаптации 464  
Сипункулиды, гемозритрин 335  
Собака, адаптация к температуре 427  
Совместимость растворенных веществ 352—355  
Сопрягающие агенты 24—25  
Сорбитол (и акклимация к температуре) 243  
Спирты многоатомные, образование 245  
— — значение при обезвоживании 238—239  
Спячка зимняя 230  
— — и голодание 257—259  
— — кислотно-щелочная регуляция 270  
— — типы 232  
— — у грызунов 256—257  
— — у крупных млекопитающих 232, 272—276  
— — у мелких млекопитающих 259—261  
— — пробуждение кратковременное 260  
— вторичное использование мочевины 268—271  
— источники воды 271  
— летняя 231  
— — у двоякодышащих рыб 250—256  
— — подавление метаболизма 276—278  
— почки 261  
— роль симбиотических организмов 269—270  
— у мелких животных, использование мочевины 268—271

Стратегия адаптации 12  
 Стромбин 36, 151, 152  
 Стромбиндегидрогеназа 151  
 Структура белков, уровни 67  
 Сукцинатдегидрогеназа 37  
 Сукцинат-тиокиназа в цикле Кребса 37, 138  
 Сукцинил-СоА 35  
 Сукцинил-СоА-синтетаза 50  
 Сульфид, источник энергии в гидро-  
 термальных источниках 527—531  
 Супероксиддисмутаза, защитная  
 роль 95—96

Температура, влияние на активность  
 АТФазы 510

— — — ассоциацию белковых субъ-  
 единич 453—456

— — — испарение воды у лягушки  
 472

— — — катализ 413

— — — липиды 459—471

— — — потребление  $O_2$  413

— — — равновесие реакций 393

— — — скорость реакции 391

— — — энергию молекул 392

— — —  $K_m$  428, 430, 435, 439

— связь с pH 428

— тела, регуляция 396—411

Температурная адаптация *см.* Адап-  
 тация к температуре

— акклимация *см.* Акклимация к  
 температуре

— толерантность 412

Температурные эффекты 390—396

Температурный стресс 432

Тепловая адаптация *см.* Адаптация  
 к температуре

Теплоизоляция, адаптивные особен-  
 ности 406

Теплообменники противоточные 408

Теплоотдача 406—407, 409

Термогенез 403

Терморегуляция в жаркое время 231

— и кожный воск 471

Термофильные бактерии 449

Трансаминирование 42—43

Транскрипция, регуляция concentra-  
 ции ферментов 66

Трансляция, регуляция концентрации  
 ферментов 66—67

Трегалоза и акклимация к темпера-  
 туре 243

— при обезвоживании 236, 238, 240

Треонин, дезаминирование 43

Треска, температурная адаптация 416

Триацилглицеролы (триглицериды) 37

— гидролиз 124

— при аэробной тренировке 162—163

— энергетический ресурс 103

Триацилглицероллипаза 122

Триглицериды *см.* Триацилглицеролы

Трофосома 529

Тунец, мышечное дыхание 62

Тюлень Уэдделла 212—219, 228

Убихинон 51

Углеводы как источник энергии 99,  
 119

Угорь, адаптация к температуре 427

Углекислота ( $CO_2$ ), метаболические  
 источники 50

— образование в цикле Кребса 50

Улитки, летняя спячка 231

Уреотелические формы 44—46

Урикотелические формы 44—46

Ферменты, адаптивные изменения  
 13—15

— адаптация к метаболическим  
 функциям 65—97

— аллостерический контроль при  
 адаптации 388

— ассоциация субъединиц 494

— влияние давления 500—504

— в онтогенезе 307

— в цикле Кребса 37

— гетеротропные и гомотропные 77

— гликолитические и окислительные,  
 каталитический потенциал 142—  
 146

— как защитные приспособления  
 94—96

— кинетика насыщения 68

— кинетические свойства, адаптация  
 к гидростатическому давлению  
 493—500

— ключевые, регуляция 86—87

— конформация 77—78

— при адаптации 418

— — — в процессе развития 308—  
 310

— — — к температуре 415, 417

— регуляторные в обходных путях  
 81—86

— регуляция 76, 78—81, 87—91

— сродство к субстрату 70

— стабилизация субстрата 71

— у глубоководных рыб в мышцах  
 518—519

— энергия активации 459

Физическая нагрузка, метаболизм и  
 работа мышц 99—100



- — стратегия адаптации 98—99  
Флавинадениндинуклеотид ( $\text{FAD}^+$  и  $\text{FADH}_2$ ) 51—52  
Форель, гемоглобин 319  
— метаболизм при аноксии 174  
— температурная адаптация 427  
Фосфаген(ы) 103—105  
— при работе 152  
Фосфоацилглицерол (фосфоглицерид), регуляция метаболизма 34  
Фосфоенолпируват, регуляторная роль 35  
— точка разветвления пути гликолиза 35  
Фосфоенолпируват - карбоксикиназа, анаплеротическая роль, 49  
Фосфорилирование, сопряженное с образованием сукцината 179  
— субстратное 50  
Фосфофруктокиназа, влияние модуляторов 79  
— — pH 377  
— дрожжевая 75  
— и гликолиз 111—112  
— мышечная 109—111  
Фотосинтез, влияние температуры 467—468  
— температурная акклимация 444  
Фруктозобисфосфатаза при адаптации 83  
FAD см. Флавинадениндинуклеотид
- Хемномотическая теория 47, 55—57  
Хилла уравнение 73—74  
Холостые циклы 403—404
- Цикл лимонной кислоты см. Кребса цикл  
— мочевины см. Мочевинный цикл  
— трикарбоновых кислот см. Кребса цикл  
Циста артемии 233—237  
Цитрат-синтаза в цикле Кребса 37
- Челнок глицерофосфатный 55  
— малат-аспартатный 53—54  
Челночные механизмы 53—55  
Челночный перенос макроэргических фосфатов 130  
Черпахи, адаптация к нырянию 224
- гликоген при гипоксии 207—209  
— метаболизм под водой 209—212  
— — при аноксии 174  
«Черные курильщики» 526  
Чудесная сеть 408
- Шмель, адаптация к температуре 404—407
- Эволюция, роль воды 383—389  
Эйгена модель 73  
Экотермия 411—412  
Экотермные организмы 14, 395  
Электроны, перенос при декарбоксилировании 50  
Электрон-транспортная цепь, адаптация 63—64  
— — перенос пары электронов 55  
— — последовательность 51—52  
— — протонный градиент 56—59  
— — схема 52.  
Энактиостаз 11  
Эндотермия и регуляция температуры тела 396—411, 403—404  
Энергетические потребности организма 174—183  
Энергия активации 392  
— — при адаптации к температуре и давлению 501  
— в первые часы жизни, источники 297—299  
— использование при работе 103  
— молскул, влияние температуры 392  
— перенос и запасаение 27—30, 129  
— пути выработки 138—141  
— связывания и энергия активации 42  
Энергообеспечение аэробное и анаэробное, сравнение 142  
Энтальпия активации 392, 414  
— при образовании слабых связей 393  
— при окислении субстратов 399  
— связь с энтропией 421  
— у глубоководных рыб 508  
Энтропия, связь с энтальпией 424  
— у глубоководных рыб 508  
Эстивация см. Спячка летняя
- Яблочный фермент 49—50  
Ящерицы 447

# Указатель латинских названий

*Anphiuma* 332  
— *means* 342—325

*Anguilla* 329

*Anoplopoma fimbria* 498

*Antimora rostrata* 496, 498, 501, 519

*Aphelenchus avena* 237, 240

*Arapaima gigas* 106

*Arenicola* 35

*Artemia* 230, 233, 234

*Atherinops affinis* 518

*Atriplex sabulosa* 468

*Auxis thazard* 518

*Bacillus licheniformis* 168

*Balanus nubilus* 340

*Bombus* 403

*Bufo marinus* 447

*Bythograea thermydron* 532

*Caliptogena magnifica* 530, 532

*Catastomus* 31

— *clarkii* 321—322

*Caulolatilus princeps* 518, 519

Chironomidae 231

*Chironomus* 36, 197, 248

*Chromis punctipennis* 518, 519

*Citellus lateralis* 276

*Coelorinchus carminatus* 498

*Coryphaenoides acrolepis* 496, 498—  
499, 507, 519—521

— *armatus* 457, 498, 502, 506—509,  
519—521

— *carapinus* 498, 519

— *leptolepis* 498, 519

*Cyprinodon* 463

*Dasyatis americana* 341, 363

*Debaryomyces hansenii* 351

*Diopatra cupres* 331

*Dipsosaurus dorsalis* 509

*Dissostichus mawsoni* 479

*Dunaliella* 351, 354, 369

— *tertiolecta* 349, 352

— *viridis* 340, 349, 352

*Engraulis mordax* 518

*Eriocheir sinensis* 340, 350

*Escherichia coli* 91, 93, 171

*Eurosta* 242, 243, 247

*Euthyrnus lineatus* 518

*Fasciola* 35, 181

*Fundulus* 326, 329

— *heteroclitus* 326—328, 334

*Genyonemus lineatus* 518, 519

*Gillichthys* 430

— *mirabilis* 427, 518

*Glycera* 313

*Halobacterium cutirubrum* 366

— *halobium* 342, 364, 367—368

— *salinarium* 341, 366

*Halococcus* 366

*Halosauropsis macrochir* 457, 496—  
499, 501, 506—509, 519

*Histiobranchus bathybius* 498, 519

*Homarus vulgaris* 350

*Hoplerythrinus* 106

*Hoplias* 106

*Hordeum vulgare* 340

*Illex* 149—150

*Klebsiella aerogenes* 341

*Latimeria* 341

— *chalumnae* 343

*Limulus polyphemus* 332

- Manduca sexta* 407  
*Marphysa sanguinea* 331  
*Medialuna californiensis* 518, 519  
*Modiolus demissus* 353  
*Mugil cephalus* 447  
*Mytilus* 79, 174, 176, 179—183  
*Myxine glutinosa* 341
- Nezumia bairdii* 498, 519
- Oncorhynchus kisutch* 322, 323  
*Osteoglossum bicirrhosum* 106
- Pachygrapsus crassipes* 347, 349  
*Pacifastacus leniusculus* 332  
*Pagothenia* 430  
— *borchgrevinkii* 417, 496, 498, 501  
*Paralabrax clathratus* 144, 518, 519  
— *maculatofaciatus* 518  
— *nebulifer* 144, 518, 519  
— *rosaceus* 519  
*Parastichopus* sp. 341  
*Phanerodon furcatus* 518  
*Phyllomedusa sauvagei* 472  
*Platyrrhinoidis triseriata* 357  
*Pleuronectes flesus* 341  
*Pogonophora* 529  
*Polypedilum vanderplanki* 230  
*Poterioochromonas malhamensis* 354  
*Protopterus* 250  
*Pseudomonas fluorescens* 366  
*Pseudopleuronectes americanus* 479
- Rana* 264  
— *cancrivora* 363  
— *catesbiana* 263  
*Raja erinacea* 341
- Rhacochilus toxotes* 518  
*Riftia pachyptila* 524—525, 528—530, 532—533
- Salmo gairdneri* 518  
— *irideus* 318, 320  
*Sarcina lutea* 366  
*Scaphiopus* 364  
— *couchi* 363  
*Scorpaena guttata* 496, 498, 518, 519  
*Sebastes mystinus* 518  
*Sebastolobus* 501, 507  
— *alascanus* 496, 498, 501, 521—522  
— *altivelis* 496, 498, 501, 521—522  
*Sepia* 199  
— *officinalis* 341  
*Solemia reidi* 531  
*Sphyræna argentea* 435  
— *ensis* 435, 518  
— *lucasana* 435  
*Squalus acanthias* 357, 341, 518  
*Strombus* 152  
*Synechococcus* 352
- Tetrahymena* 465  
— *pyriformis* 463  
*Themiste zosteriolum* 331, 335  
*Thunnus alalunga* 518  
— *albacares* 518  
— *thynnus* 501  
*Triglochin maritima* 340  
*Tubifex* 179
- Urolophus halleri* 357
- Xenopus* 263, 264
- Zoarcidae

# Оглавление

Предисловие редактора перевода . . . . .	5
Предисловие . . . . .	7
Глава 1. Биохимическая адаптация: основные механизмы и стратегии . . . . .	9
Глава 2. «Конструкция» клеточного метаболизма . . . . .	21
Глава 3. Адаптация ферментов к метаболическим функциям . . . . .	65
Глава 4. Адаптация к физической нагрузке . . . . .	98
Глава 5. Особенности метаболизма в условиях аноксии . . . . .	165
Глава 6. Метаболические адаптации к нырянию . . . . .	206
Глава 7. Выключение активного метаболизма: от ангидробриоза до зимней спячки . . . . .	230
Глава 8. Адаптации, связанные с развитием, у млекопитающих . . . . .	279
Глава 9. Дыхательные белки . . . . .	311
Глава 10. Адаптации, связанные с водными растворами: эволюционные и регуляторные аспекты . . . . .	337
Глава 11. Адаптация к температуре . . . . .	390
Глава 12. Адаптация к морским глубинам . . . . .	487
Литература . . . . .	535
Предметный указатель . . . . .	556
Указатель латинских названий . . . . .	566

Научное издание

Питер Хочачка, Джордж Сомеро

## БИОХИМИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев  
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова. Старший научный редактор Ю. И. Лашкевич  
Младший редактор О. В. Шагинян. Художник М. Н. Кузьмина  
Художественный редактор А. Я. Мусин. Технический редактор Е. В. Алехина  
Корректор Л. Д. Панова

ИБ № 6289

Сдано в набор 02.06.88. Подписано к печати 05.10.88. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага книжно-журнальная. Печать высокая. Гарнитура литературная.  
Объем 17,75 бум. л. Усл. печ. л. 35,50. Усл. кр.-отт. 35,50. Уч.-изд. л. 36,59.  
Изд. № 4/5280. Тираж 6500 экз. Зак. 323. Цена 5 р. 10 к.

Издательство «Мир» В/О «Совэксспорткнига» Государственного комитета СССР  
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 129820, ГСП, Москва, И-110  
1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР  
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва,  
Нагатинская ул., д. 1.