

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

**БИОХИМИЯ**  
**Конспект лекций**  
**Модуль 3**  
**Катаболизм**

Учебно-методическое пособие

Киров

2011

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

**Бессолицына Е. А.**

К

Биохимия конспект лекций модуль 3 «Катаболизм»: учебно-методическое пособие / Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 89 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Биохимия».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

## Метаболизм - катаболизм

Клетка состоит из множества различных молекул, часть из них обнаруживается у всех живых организмов, тогда как другая часть уникальна для клетки и/или отдельного организма. Соответственно, необходимо эти вещества синтезировать. В каждой клетке в одну единицу времени происходит множество химических реакций. Совокупность которых – метаболизм. В каком-то приближении клетку можно сравнить с посудой, в которой идет масса реакций, из чего можно считать клетку химической системой. Для описания таких систем и сформулированы законы термодинамики. Первый закон термодинамики гласит: **внутренняя энергия системы вместе с ее окружением остается постоянной.** Это одна из формулировок закона сохранения энергии. Она утверждает, что при любых изменениях системы внутренняя энергия не утрачивается и не приобретает. Вместе с тем внутри рассматриваемой системы энергия может переходить от одной ее части к другой или превращаться из одной формы в другую. Например, химическая энергия может переходить в тепло, превращаться в электрическую энергию, энергию излучения или в механическую энергию.

Второй закон термодинамики гласит: **энтропия системы при самопроизвольных процессах возрастает.** Энтропия служит мерой неупорядоченности, хаотичности системы и достигает максимума, когда система приходит в истинное равновесие. При постоянных температуре и давлении соотношение между изменением свободной энергии системы ( $\Delta G$ ) и изменением энтропии ( $\Delta S$ ) представляется следующим выражением, которое объединяет оба закона термодинамики:  **$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ .**  $\Delta G$  - изменение свободной энергии системы, то есть та часть изменения внутренней энергии системы, которая может превращаться в работу,  $\Delta H$  — изменение **энтальпии** (теплоты),  $T$  - абсолютная температура.

В условиях, при которых протекают биохимические реакции,  $\Delta H$  приблизительно равно  $\Delta E$ -изменению внутренней энергии системы в результате реакции. В этих условиях приведенное выше выражение можно записать в виде:  **$\Delta G = \Delta E - T \Delta S$**

Если  $\Delta G$  отрицательно, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют **экзергоническими**. Если к тому же  $\Delta G$  велико по абсолютной величине, то реакция идет практически до конца и ее можно рассматривать как необратимую. Если же  $\Delta G$  положительно, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такая реакция называется **эндергонической**. Если к тому же  $\Delta G$  велико, то система является устойчивой и реакция в этом случае практически не осуществляется. При  $\Delta G$  **равном нулю** система находится в равновесии. При чем ферменты не влияют на  $\Delta G$  реакции

$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$ . Ферменты ускоряют реакцию идущую самопроизвольно. Таким образом сдвинуть равновесие можно либо сообщая системе дополнительную энергию (проще всего нагреванием) либо увеличивая концентрацию реагентов. Реакция может протекать спонтанно только при отрицательном значении изменения свободной энергии ( $\Delta G$ ).  $\Delta G$  не зависит от пути, по которому идет реакция, и зависит только от природы реагирующих веществ и их активности (которую можно иногда примерно определять по их концентрации). Изменение свободной энергии реакции в условиях, когда активность реагирующих веществ и образующихся продуктов равна единице, называется изменением стандартной свободной энергии ( $\Delta G^0$ ). Измеряют изменение свободной энергии в стандартных условиях, то есть при давлении 1 атмосфера, 298<sup>0</sup> кельвина (или 25<sup>0</sup> C), а так же концентрации реагирующих веществ одинаковы и равны 1 М. В биологических системах данные параметры не соблюдаются, особенно относительно концентраций реагирующих веществ, в природе концентрация реагирующих веществ никогда и не соответствует стандартным, именно поэтому в биохимии используется понятие  $\Delta G^0$ , которое соответствует понятию свободной энергии в физической химии.

Если рассмотреть реакцию  $A + B \leftrightarrow C + D$ .

$\Delta G$  этой реакции дается уравнением

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \left( \frac{[C][D]}{[A][B]} \right)$$

где  $\Delta G^0$  - изменение стандартной свободной энергии, R-газовая постоянная, T-абсолютная температура, [A], [B], [C] и [D]-молярные концентрации (точнее активности) реагирующих веществ.  $\Delta G^0$ -изменение свободной энергии реакции при стандартных условиях, когда каждое из реагирующих веществ A, B, C и D присутствует в концентрации 1,0 М. Таким образом,  $\Delta G$  реакции зависит от природы реагирующих веществ.

Можно легко вывести соотношение между стандартной свободной энергией и константой равновесия реакции. В состоянии равновесия  $\Delta G = 0$ . Уравнение тогда приобретает следующий вид:

$$0 = \Delta G^0 + RT \ln \left( \frac{[C][D]}{[A][B]} \right)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

Ферменты не влияют на константу равновесия, следовательно, ускоряют только самопроизвольно идущие реакции, где  $\Delta G$  меньше нуля. Но в клетке множество реакции особенно в процессах биосинтеза изменение свободной энергии больше нуля, чтобы эта реакция прошла необходимо сообщать энергию системе, что в химии чаще всего происходит за счет нагрева системы, в биологических системах это невозможно из-за прежде всего денатурацию белка. Поэтому в биологических системах появился обходной путь: система сопряженных реакций. В точке пространства (в данном случае каталитическом центре) происходят одновременно две реакции: у одной  $\Delta G$  положительно, у другой отрицательно. Если суммарное  $\Delta G$  отрицательно то обе реакции идут спонтанно. Именно так обеспечивается приток энергии в систему. Наиболее распространенной сопряженной реакцией является гидролиз АТФ.

Главное определитель хода реакции – свободная энергия ( $\Delta G$ )

В клетке есть очень нужная реакция 1, но  $\Delta G_1 > 0$  – реакция 1 не идет, поэтому в каталитическом центре есть сопряженная реакция 2,  $\Delta G_2 < 0$  – реакция 2 идет. В каталитическом центре находятся субстраты обеих реакций.

Пойдет ли реакция 1 в этой точке определяется  $\Delta G_1 + \Delta G_2 = \Sigma \Delta G$

$\Sigma \Delta G > 0$  – реакция 1 не идет

$\Sigma \Delta G < 0$  – реакция 1 идет.

Необходима реакция 2 – универсальная и обеспечивающая  $\Sigma \Delta G < 0$ . Это реакция гидролиза молекулы.

АТФ, универсальная энергетическая валюта в биологических системах, представляет собою богатую энергией молекулу, что обусловлено наличием в ней двух ангидридных связей. Электростатическое отталкивание между этими отрицательно заряженными группами уменьшается при гидролизе АТФ. АДФ и *P<sub>i</sub>*, стабилизируются под действием резонанса в большей степени, чем АТФ. Гидролиз АТФ сдвигает равновесие сопряженной реакции примерно в  $10^8$  раз. Кроме того, АТФ достаточно устойчивая молекула и время ее жизни достаточно велико. Таким образом, для обеспечения процессов биосинтеза клетка постоянно нуждается в притоке энергии – АТФ. Кроме того, в ходе синтеза организм переводит более окисленные вещества в менее окисленные, для чего необходимы доноры протонов и электронов: NADH, NADPH и FADH<sub>2</sub>.

**Метаболизм** – это совокупность всех реакций, происходящих в клетке.

Метаболизм можно подразделить на два пути в первом осуществляется синтез молекул необходимых клетке (**анаболизм**) во втором происходит образование АТФ и NADPH, то есть “запасание энергии и восстановительных эквивалентов” необходимых для синтеза клеточных компонентов (**катаболизм**).

Катаболизм подразделяют на несколько направлений:

- окисление углеводов;
- окисление липидов;
- окисление белков.

Путей окисления углеводов несколько: гликолиз, пентозофосфатный путь и некоторые другие.

### Гликолиз

Гликолиз это совокупность реакций превращения глюкозы в пируват. У аэробных организмов гликолиз служит как бы прелюдией к циклу трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов, в ходе которых запасается большая часть свободной энергии, содержащейся в глюкозе. Открытие гликолиза последовало непосредственно за экспериментами Бюхнера, а также Гардена и Йонга по сбраживанию сахара дрожжевым соком. Вскоре с изучением спиртового брожения слились исследования другого направления, связанные с изучением мышц. Физиологи заинтересовались процессом, благодаря которому изолированная мышца могла получать энергию для

сокращения в отсутствие кислорода. Хилл показал, что энергию обеспечивает превращение гликогена в лактат, а несколько позднее Мейергоф продемонстрировал, что происходящие при этом химические реакции сходны с теми, которые наблюдаются при спиртовом брожении. Установление структуры изучению гликолиза, проведенными Эмбденом во Франкфурте и Парнасом в Польше. Таким путем вскоре была выяснена последовательность реакций гликолиза (путь Эмбдена— Мейергофа—Парнаса). Все ферменты, катализирующие отдельные стадии процесса, к настоящему времени выделены, закристиализованы и подробно изучены. Все десять реакций гликолиза протекают в **цитозоле**.

Основным моносахаридом поступающим в гликолиз является глюкоза. В животной клетке присутствуют как свободная глюкоза (поступившая через мембрану из внешней среды), так и продукт распада гликогена (животного полисахарида – мономером которого является глюкоза).

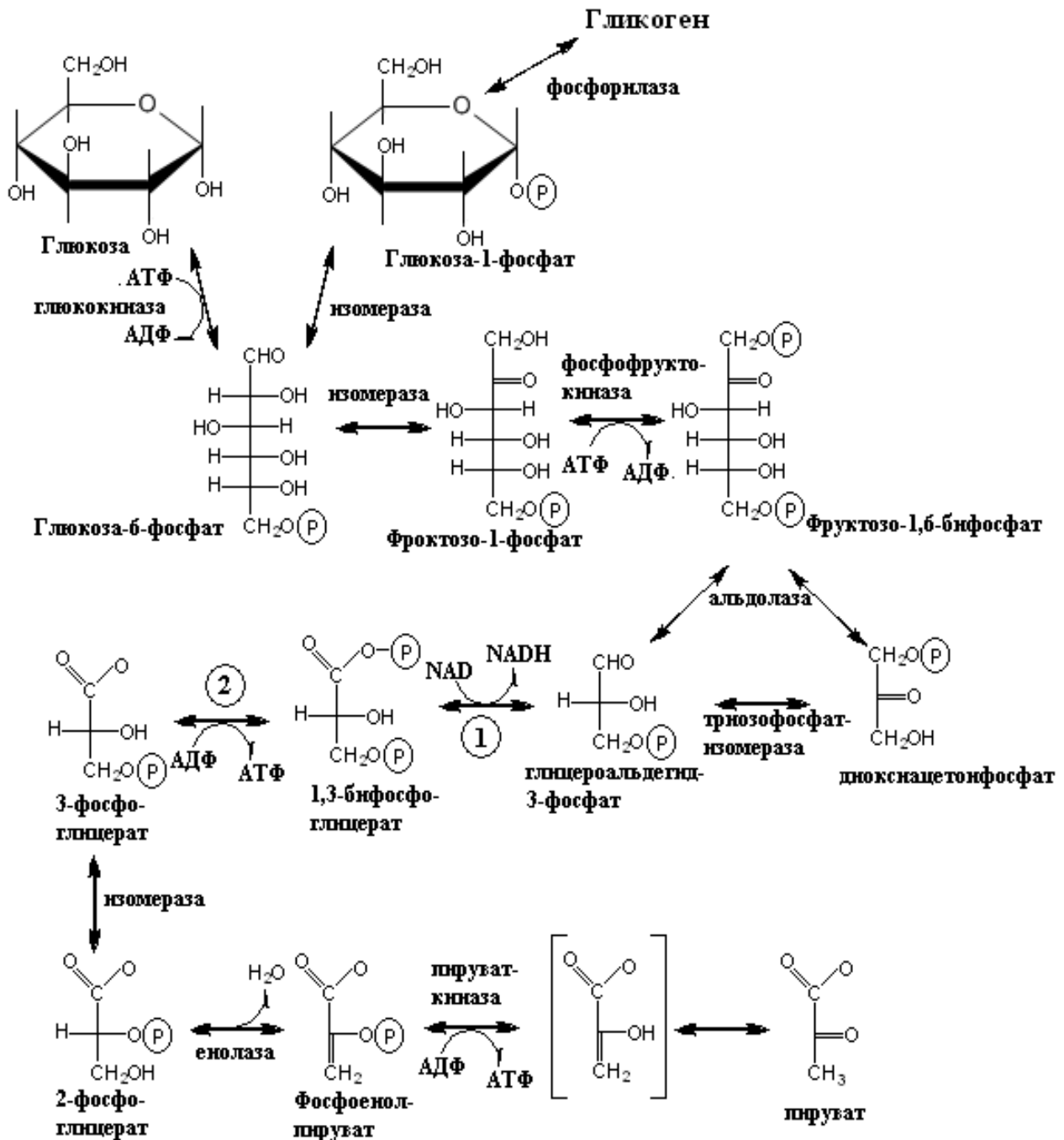
Вся последовательность реакций гликолиза может быть разбита на четыре стадии:

- подготовка к разрыву цепи;
- разрыв цепи и установление равновесия между триозофосфатами;
- окислительное образование АТФ
- превращение 3-фосфоглицерата в пируват.

#### **Первый этап — подготовка к разрыву цепи:**

В гликолиз могут поступать различные свободные моносахариды глюкозу или фруктозу, а также глюкоза из гликогена. В первой реакции происходит фосфорилирование молекулы глюкозы ее осуществляет фермент гексокиназа во всех органах и тканях или глюкокиназа в печени. Оба фермента относятся к классу трансфераз, и осуществляют перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на молекулу глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, АТФ в данном случае является как донором энергии, так и донором фосфатной группы, за счет затраты АТФ происходит, во-первых, образование активной формы моносахарида, глюкозо-фосфата, во-вторых, обеспечивается необратимость реакций гликолиза. Разница между ферментами заключается в специфичности (глюкокиназа более специфична взаимодействует только с глюкозой, гексокиназа менее специфична фосфорелирует все гексозы); в распределении в организме (глюкокиназа в печени, гексокиназа в остальных тканях организма); в регуляции (смотри ниже). Второй путь входа через глюкозо-1-фосфат. Так входят в гликолиз глюкоза из гликогена и галактоза. Как известно из раздела «Углеводы» гликоген запасующий полисахарид животных состоящий из  $\alpha$ -D-глюкозы, под действием гликоген фосфорилазы происходит отщепление остатков глюкозы от полимерной цепи гликогена, параллельно происходит присоединение фосфатной группы к молекуле глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата, донором и энергии, и фосфатной группы является молекула АТФ. Через образование глюкозо-1-фосфата в гликолиз поступает галактоза. К галактозе присоединяется УТФ с образованием УДФ-галактозы,

которая под действием эпимеразы превращается в УДФ-глюкозу. УДФ-глюкоза распадается на глюкозо-1-фосфат и УМФ, данную реакцию катализирует УДФ-глюкозопирофосфорилаза. Образовавшийся глюкозо-1-фосфат изомеризуется в глюкозо-6-фосфат фосфоглюкоизомеразы. Таким образом образуется активная форма глюкозы глюкозо-6-фосфат. Затем происходит изомеризация глюкозо-6-фосфата в фруктозо-6-фосфат под действием изомеразы. Фруктозо-6-фосфат может образовываться и из свободной фруктозы под действием гексокиназы. Образовавшийся фруктозо-6-фосфат под действием фосфофруктокиназы



**Рисунок 1: Схема реакций гликолиза, цифрами в кружках названия ферментов. 1 - глицероальдегид-3-фосфат оксидоредуктаза фосфорилирующая; 2 - 1,3-бифосфоглицераткиназа**

превращается в 1,6-фруктозобифосфат. Фосфофруктокиназа также относится к классу трансфераз. Донором энергии и фосфатной группы в этой реакции является молекула АТФ. То есть затрачивается еще одна молекула АТФ. Это делает последовательность реакции гликолиза окончательно необратимой, а кроме того образуется симметричная молекула, что важно для второго этапа гликолиза.

### **Вторая стадия –разрыв цепи и установление равновесия между триозофосфатами**

После образования 1,6-фруктозо бифосфата начинается вторая стадия гликолиза. Расщепление фруктозодифосфата катализируется альдолазой; в результате образуются глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Между этими двумя триозофосфатами в результате действия изомеразы устанавливается равновесие. Таким образом, обмен обеих половинок гексозы может пойти по пути превращения в пируват через глицеральдегид-3-фосфат. В то же время для диоксиацетонфосфата существует и другой путь, связанный с восстановлением в глицерофосфат — предшественник липидов и в промежуточный продукт в некоторых типах брожения. Но в случае гликолиза дигидроксиацетонфосфат под действием триозофосфатизомеразы легко преобразуется в глицероальдегид-3-фосфат, и между этими продуктами устанавливается равновесие, но глицеральдегид-3-фосфат, постоянно изымается в следующие реакции гликолиза, поэтому равновесие сдвигается в сторону изомеризации дигидроксиацетонфосфата в глицероальдегид-3-фосфат, и это происходит практически количественно, поэтому считается, что весь дигидроксиацетонфосфат преобразуется в глицероальдегид-3-фосфат, и принято удваивать продукты всех последующих реакций. Глицероальдегид-3-фосфат поступает в третью стадию.

### **Вторая стадия –разрыв цепи и установление равновесия между триозофосфатами**

Глицеральдегид-3-фосфат окисляется под действием глицеральдегид-3-фосфат оксидоредуктазы фосфорелирующей акцептором электронов является  $NAD^+$ , восстанавливающийся до  $NADH$ . В результате образуется короткоживущий промежуточный продукт 1,3-бифосфоглицерат, вторая фосфатная группа поступает из раствора. 1,3-бифосфоглицерат является нестабильным соединением, причем  $\Delta G$  гидролиза связи между карбоксильной и фосфатной группировками в 1 положении меньше нуля, а по модулю больше энергии гидролиза фосфоангидридной связи АТФ. Такие соединения называют макроэргическими. 1,3-бифосфоглицерат распадается под действием 1,3-бифосфоглицераткиназы и отщепляемая фосфатная группа переносится на молекулу АДФ и в результате образуются 3-фосфоглицерат и АТФ. Такой тип синтеза АТФ называют субстратным фосфорилированием. То есть фосфатная группа переносится с макроэргического соединения (энергия гидролиза фосфатной группы по модулю больше энергии гидролиза АТФ, поэтому



выделившейся энергии достаточно для фосфорилирования АДФ и образования АТФ). Образовавшийся 3-фосфоглицерат поступает в 4-й этап гликолиза.

#### **Четвертая стадия – превращение 3-фосфоглицерата в пируват**

3-фосфоглицерат, изомеризуется в 2-фосфоглицерат под действием 3-2 фосфоглицерат изомеразы. 2-фосфоглицерат дегидратируется енолазой (2-фосфоглицератгидролизом), происходит отщепление молекулы воды образуется фосфоенолпируват (ФЕП), который является «макроэргическим» соединением, фосфорильная группа которого может быть легко перенесена на АДФ (под действием фермента пируваткиназы); остающийся при этом енол пировиноградной кислоты самопроизвольно превращается в значительно более устойчивый пируват. Поскольку на каждую молекулу глюкозы образуются две молекулы фосфоенолпирувата, этот процесс восполняет затраты двух молекул АТФ, происходящую на начальных стадиях образования фруктозо-1,6-дифосфата из глюкозы.

Суммарная реакция гликолиза:

**Глюкоза + 2АТФ + 2NAD + 4АДФ = 2Пируват + 2АДФ + 4АТФ + 2NADH**  
Суммарный энергетический выход всего 2 АТФ .

Энергетическая выгода гликолиза не велика, и используется организмами либо имеющими доступ большим количеством субстратов (моносахаридов), на пример паразитические организмы, либо из-за условий среды (анаэробные организмы).

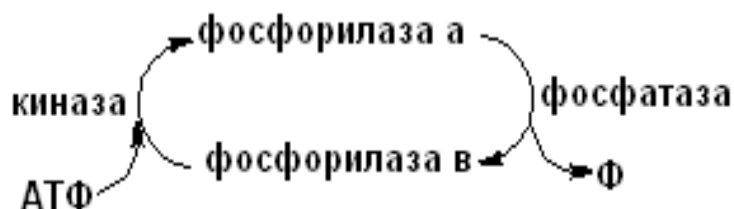
Гликолиз — это один из древнейших метаболических путей, по некоторым данным считается первые живые организмы получали энергию путем гликолиза. Поэтому механизмы регуляции гликолиза очень хорошо отрегулированы и направлены на обеспечение клетки энергией с одной стороны, но при этом на сохранение ресурсов клетки с другой. Механизмы регуляции гликолиза изучены достаточно хорошо.

### **Регуляция гликолиза**

Регуляция гликолиза происходит на трех этапах:

1. Вход глюкозы в гликолиз (это естественно так как если процесс не нужен, то его проще не запускать вообще, а не обрывать на половине).
2. Фосфофруктокиназная реакция (реакция необратима, кроме того в ней затрачивается АТФ).
3. Пируваткиназная реакция (реакция также необратима, а кроме того важным является процесс утилизации образующегося пирувата).

Теперь необходимо рассмотреть эти этапы более подробно.

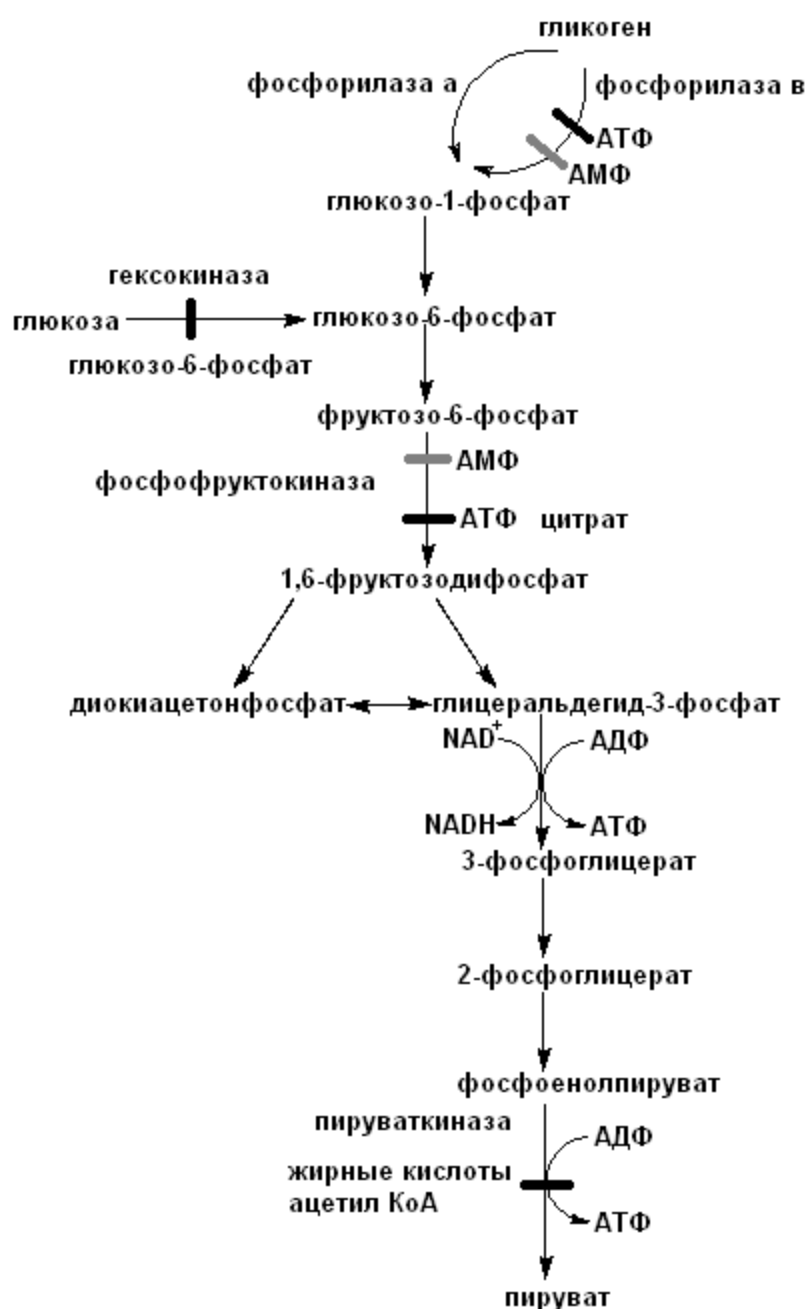


#### **Вход глюкозы в гликолиз**

Как было рассмотрено выше глюкоза входит в гликолиз из свободной глюкозы или из гликогена. Свободная глюкоза фосфорилируется гексокиназой,

**Рисунок 2: Схема перехода двух форм фосфорелазы.**

активность этого фермента регулируется: происходит ингибирование продуктом реакции глюкозо-6-фосфатом. Поэтому накопление глюкозо-6-фосфата резко снижает скорость гексокиназной реакции, в результате нет затрат АТФ, так как глюкозо-6-фосфат во всех тканях кроме печени направляется на реакции окисления. Тогда как в печени накопление глюкозо-6-фосфата не происходит, так как излишки запасаются в виде гликогена, поэтому в печени работает другой фермент — глюкокиназа, не ингибируемый продуктом реакции.



**Рисунок 3: Схема регуляции гликолиза. Серыми полосами через стрелку обозначены вещества активирующие реакцию, черными - ингибирующие реакцию**

При входе глюкозы из гликогена первая реакция гликогена фосфорилазная, регуляция гликогена фосфорилазы происходит двумя путями. Первый вариант посттрансляционная модификация. В скелетных мышцах этот фермент присутствует в двух формах - в каталитически активной фосфорелированной форме (фосфорилаза а) и в значительно менее активной дефосфорелированной форме (фосфорилаза б). Фосфорилаза а была получена в кристаллическом виде (мол. масса 190 кДа). Ее молекулы состоят из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит существенный для каталитической активности остаток серина в фосфорилированной форме. Скорость превращения структурных единиц гликогена в глюкозо-1-фосфат регулируется в мышцах

соотношением активной фосфорилазы а и менее активной фосфорилазы b. Взаимопревращения двух этих форм гликогенфосфорилазы происходят под действием специфичных ферментов, катализирующих процесс ковалентной модификации фосфорилазы. Фосфорилаза а превращается в менее активную фосфорилазу b под действием фермента, называемого фосфатной фосфорилазы а; этот фермент, катализируя гидролитический разрыв связей, удаляет из молекулы фосфорилазы а фосфатные группы, необходимые для каталитической активности.

Фосфорилаза b вновь превращается в активную фосфорилазу а под действием фермента, называемого киназой фосфорилазы b; он катализирует реакцию, в ходе которой АТФ фосфорилирует остатки серина в активном центре молекулы фосфорилазы b, что и приводит к образованию фосфорилазы а. Таким образом, благодаря действию двух ферментов, фосфатазы фосфорилазы а и киназы фосфорилазы b, соотношение активной фосфорилазы а и сравнительно мало активной фосфорилазы b в клетке может изменяться. В мышцах действует второй механизм регуляции гликогенфосфорилазной активности, Фосфорилаза b, сравнительно мало активная форма, может становиться более активной в результате нековалентного связывания с аллостерическим модулятором этого фермента, которым является АМФ; концентрация же АМФ в мышцах возрастает по мере распада АТФ в сократительных системах. Активации фосфорилазы b под действием АМФ препятствует АТФ, выступающий в роли отрицательного модулятора. Таким образом, активность фосфорилазы b определяется соотношением АМФ и АТФ. В отличие от фосфорилазы b фосфорилаза а не активируется АМФ; поэтому фосфорилазу а называют иногда АМФ-независимой формой, а фосфорилазу b АМФ-зависимой. Итак, есть два механизма регуляции, которым подчиняется гликогенфосфорилаза скелетной мышцы: 1) ковалентная модификация посредством фосфорелирования или дефосфорелирования остатков серина в активном центре фермента и 2) аллостерическая регуляция фосфорилазы b путем нековалентного связывания с АМФ или АТФ. В покое мышце почти вся фосфорилаза находится в неактивной, или b -форме, поскольку в такой мышце концентрация АТФ. В печени гликогенфосфорилаза также присутствует в а- и b-форме; в принципе ферменты печени функционируют подобно мышечным, от которых они, впрочем, несколько отличаются по своей структуре и регуляторным свойствам. Расщепление гликогена в печени имеет иное назначение, нежели в мышцах; этот процесс служит источником свободной глюкозы крови. Под действием фосфорилазы печени образуется глюкозо-1-фосфат, который затем превращается в глюкозо-6-фосфат, являющийся уже непосредственным предшественником свободной глюкозы. Реакция, в ходе которой образуется D-глюкоза крови, катализируется ферментом глюкозо-6-фосфатазой.

Фосфофруктокиназа (ФФК) это сложный аллостерический фермент, управляемый многими аллостерическими положительными и отрицательными модуляторами. В скелетных мышцах активность фосфофруктокиназы

определяется концентрациями субстратов этого фермента (АТФ и фруктозо-6-фосфата) и его продуктов (АДФ и фруктозо-1,6-дифосфата); все эти соединения играют роль аллостерических регуляторов. Очень важны также в качестве регуляторов АМФ, цитрат, ионы  $Mg^{2+}$ , фосфат и некоторые другие метаболиты, присутствующие в мышечной ткани. Однако, хотя регуляции ФФК зависит от сложного взаимодействия ряда факторов, главными отрицательными модуляторами этого фермента являются АТФ и цитрат, а самыми активными положительными модуляторами АМФ и фруктозо-1,6-дифосфат. Всякий раз, когда при очень активном мышечном сокращении концентрация АТФ падает, а энергии требуется больше, фосфофруктокиназная активность усиливается, даже если концентрация фруктозо-6-фосфата очень низка. Если, однако, уровень АТФ в клетке уже высок по сравнению с уровнем АДФ и АМФ, то кажущееся сродство фосфофруктокиназы к фруктозо-6-фосфату сильно. В этом случае фосфофруктокиназа будет катализировать реакцию лишь при сравнительно высокой концентрации фруктозо-6-фосфата. Цитрат, один из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, усиливает ингибирование фосфофруктокиназы высокими концентрациями АТФ. В то же время повышение концентрации АМР, образующегося в результате аденилаткиназной реакции в сокращающейся мышце, служит очень мощным стимулирующим модулятором и противодействует ингибирующему влиянию АТФ на фосфофруктокиназную реакцию. В результате всех этих сложных аллостерических взаимодействий скорость реакции, катализируемой фосфофруктокиназой, возрастает иногда в сотни раз при переходе скелетной мышцы из состояния покоя к состоянию максимальной активности. Вторым регулируемым этапом гликолиза является пируваткиназная реакция. Пируваткиназа также принадлежит к числу аллостерических ферментов. Этот фермент встречается, по меньшей мере, в трех изоформах, которые отличаются друг от друга по распределению в тканях и по реакции на различные модуляторы. При высоких концентрациях АТФ кажущееся сродство пируваткиназы к фосфоенолпирувату сравнительно невелико и соответственно невелика скорость пируваткиназной реакции при обычных концентрациях фосфоенолпирувата. Пируваткиназу ингибируют также ацетил-СоА и высокомолекулярные жирные кислоты - соединения, играющие важную роль в качестве топлива для цикла лимонной кислоты. Таким образом, когда в клетке уже велика концентрация АТФ или когда в ней уже достаточно топлива для процесса дыхания, обеспечивающего клетку энергией, гликолиз ингибируется за счет либо фосфофруктокиназы, либо пируваткиназы (в зависимости от условий). В то же время при низких концентрациях АТФ кажущееся сродство пируваткиназы к фосфоенолпирувату возрастает, и это позволяет ферменту переносить фосфатные группы от фосфоенолпирувата на АДФ даже при относительно низкой концентрации фосфоенолпирувата. Некоторые аминокислоты также действуют как модуляторы пируваткиназной активности, главным образом в печени. Во всех клетках гликолиз регулируется с очень

высокой эффективностью, напоминающей действие компьютера, а потому изменения концентрации различных метаболитов могут влиять на его общую скорость.

У аэробов пируват постоянно выводится из реакции в цикл Кребса и направление реакций сдвинуто в сторону образования.

У анаэробов такого нет. Поэтому появилась «надстройка» - брожение. Для окисления NADH и сдвига реакций в сторону образования пирувата.

### Брожение

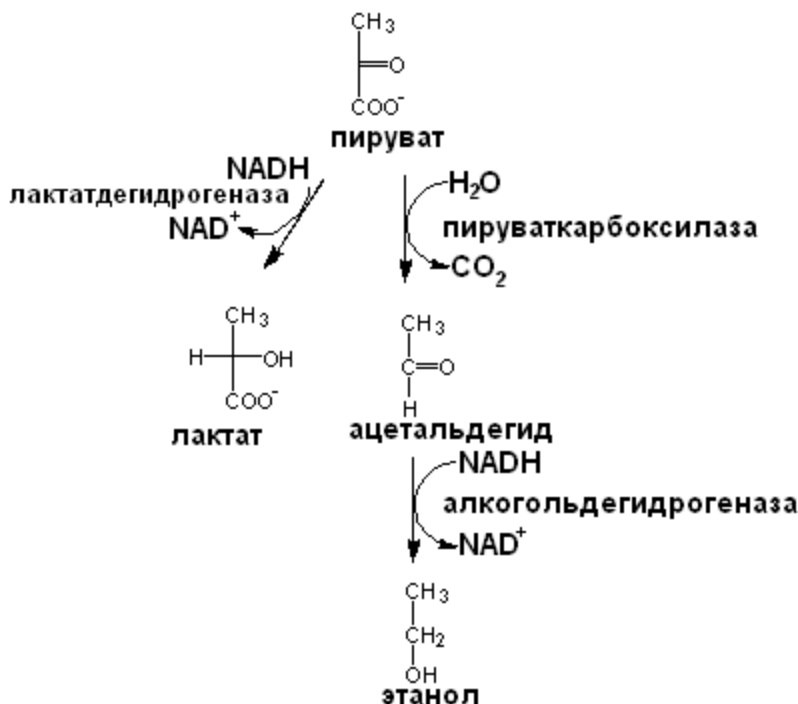
У аэробных организмов пируват и NADH, образовавшиеся в ходе гликолиза, утилизируются в ходе клеточного дыхания. У анаэробных организмов этого не происходит, поэтому необходима надстройка. Этой надстройкой является процесс брожения.

**Брожение** – это тип анаэробного окисления пирувата.

Существует множество типов прокариотического брожения.

У эукариот – всего 2: гомоферментативное молочнокислое и спиртовое.

**Гомоферментативное молочнокислое брожение** получило свое название, из-за того что происходит одна реакция осуществляемая ферментом лактат



дегидрогеназой молекула пирувата восстанавливается до лактата и донором протонов и электронов является NADH. Данный тип брожения характерен для многих бактерий. Многие возбудители заболеваний, на пример, стафилококки и стрептококки, осуществляют этот тип брожения. Но данный брожения встречается и у полезных бактерий. Молочнокислые бактерии используются при

**Рисунок 4: Схема реакций гомоферментативного молочнокислого и спиртового видов брожения** изготовления молочнокислых продуктов, сыров, при квашении капусты, засолке огурцов, силосовании при заготовке кормов. Также молочнокислое брожение встречается и у эукариот. Паразиты крови простейшие, паразитирующие в крови млекопитающих (возбудители малярии, сонной болезни), также используют данный тип утилизации пирувата. Лактатдегидрогеназа присутствует и в тканях млекопитающих. Хотя в обычных

условиях наши мышцы получают вполне достаточные количества кислорода, чтобы произошло окисление пирувата и образование АТФ аэробным путем, бывают обстоятельства, когда поступление кислорода оказывается недостаточным. Например, при крайнем напряжении сил, когда уже весь запас кислорода израсходован, мышечные клетки образуют лактат путем брожения. Более того, в белых мышцах рыб или домашней птицы аэробный метаболизм относительно невелик, и основным конечным продуктом оказывается L-лактат. В организме человека есть такие ткани, которые слабо снабжаются кровью, например, хрусталик и роговица глаза. В клетках этих тканей окислительный метаболизм выражен слабо, а энергия в основном образуется при сбраживании глюкозы в лактат. Часть лактата, образующегося в мышцах и других тканях, поступает в кровь и переносится в печень, где он снова окисляется в пируват. Меньшая часть пирувата затем окисляется в цикле трикарбоновых кислот, но большая его часть снова превращается в глюкозу. Последняя может опять поступать в кровь и возвращаться в мышцы. Весь этот процесс называется циклом Кори.

### **Спиртовое брожение**

У дрожжей и у других микроорганизмов, сбраживающих глюкозу не до лактата, а до этанола и  $\text{CO}_2$ , путь ферментативного расщепления глюкозы совпадает с описанным выше для анаэробного гликолиза на всем протяжении, за исключением этапа, катализируемого лактатдегидрогеназой. В дрожжевых клетках, которые не содержат фермента, аналогичного лактатдегидрогеназе мышечной ткани, этот этап заменен двумя другими реакциями. В первой из них продукт расщепления глюкозы пируват теряет свою карбоксильную группу под действием пируватдекарбоксилазы. Эта реакция представляет собой простое декарбоксилирование; реального окисления пирувата при этом не происходит. В клетке эта реакция необратима. Для проявления каталитической активности пируватдекарбоксилазе требуется  $\text{Mg}^{2+}$ . С молекулой этого фермента прочно связан кофермент тиаминпирофосфат. На последнем этапе спиртового брожения ацетальдегид восстанавливается до этанола за счет NADH, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата; эта реакция катализируется алкогольдегидрогеназой. Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и  $\text{CO}_2$ , а не лактат. Отметим, что суммарное отношение атомов водорода к атомам углерода не изменяется, когда молекула D-глюкозы сбраживается до двух молекул этанола и двух молекул  $\text{CO}_2$ .

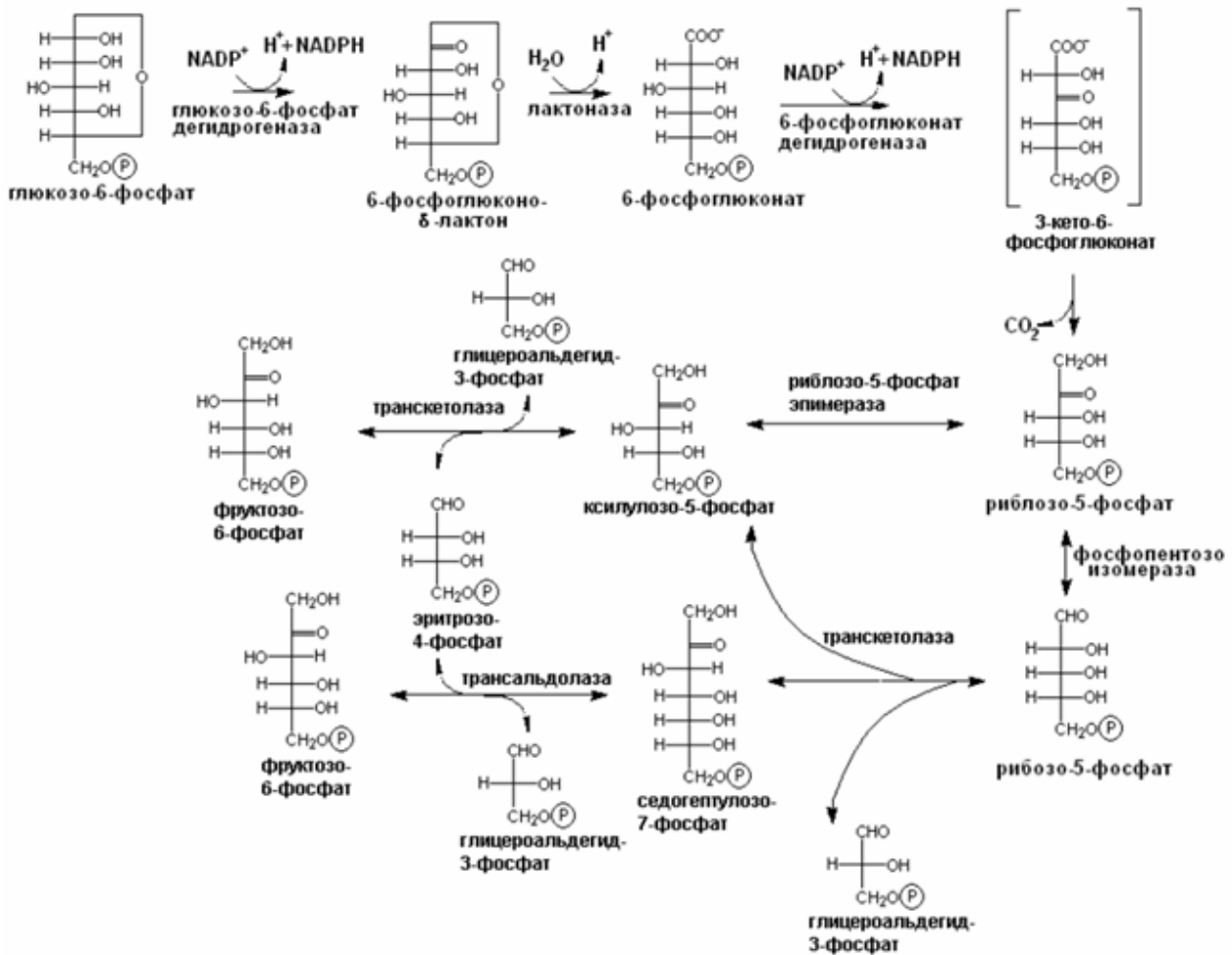
И вообще при всех анаэробных брожениях отношение Н/С в исходных веществах и в продуктах оказывается одинаковым. Пируватдекарбоксилаза содержится в клетках пивных дрожжей и других микроорганизмов, осуществляющих спиртовое брожение. В животных тканях этот фермент отсутствует. Лишены пируватдекарбоксилазы также организмы, осуществляющие молочнокислое брожение, например молочнокислые бактерии. Биохимия спиртового брожения лишь недавно изучена настолько хорошо, чтобы можно было представить этот процесс в виде ряда

последовательных ферментативных реакций. Что же касается виноделия и пивоварения, то это весьма древние искусства, освоенные людьми за сотни лет до того, как родилась сама наука химия. Более того, сами старинные рецепты приготовления пива и вина сыграли в свое время важную роль, послужив ключом к некоторым фундаментальным открытиям на заре развития биологии и биохимии. Так, в 1856 г. Луи Пастер впервые убедительно показал, что сбраживание сахара в спирт вызывается микроорганизмами, а не какими-то магическими влияниями. Французские виноделы пригласили Пастера для того, чтобы он помог им выяснить, почему в иные годы вино не удается и превращается в уксус. Пастер в своих экспериментах, ставших классическими, показал, что в стерильных растворах глюкозы брожения не происходит, тогда как в растворах, соприкасающихся с непрофильтрованным воздухом, брожение идет, и причина этого заключается в том, что в раствор попадают из воздуха споры дрожжей и других микроорганизмов. Из налета на гроздьях свежесрезанного винограда Пастер выделил культуры дрожжей и доказал, что именно дрожжи ответственны за брожение, происходящее в соке, отжатом из раздавленного винограда. Он выяснил также, что превращение спирта в уксусную кислоту вызывается другими видами микроорганизмов – уксуснокислыми бактериями; эти аэробные организмы окисляют этанол с образованием уксусной кислоты.

Моносахариды вообще и глюкоза в частности используются не только для генерирования энергии в ходе гликолиза, но и в других метаболических путях, причем как в катаболических так и анаболических. К таким цепям реакций относятся: пентозофосфатный путь и окисление глюкозы до аскорбиновой кислоты.

### **Пентозофосфатный путь**

Пентозофосфатный путь является альтернативным путем окисления



**Рисунок 5:** Схема реакций пентозофосфатного шунта

глюкозы. Он включает несколько циклов, в результате функционирования которых из трех молекул глюкоза-6-фосфата образуются три молекулы CO<sub>2</sub> и три молекулы пентоз. Последние используются для регенерации двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Поскольку из двух молекул глицеральдегид-3-фосфата можно регенерировать молекулу глюкоза-6-фосфата, глюкоза может быть полностью окислена при превращении по пентозофосфатному пути.

У растений часть реакций пентозофосфатного пути участвует также в образовании гексоз из CO<sub>2</sub> при фотосинтезе. Пентозофосфатный путь называют иногда пентозным шунтом, гексозомонофосфатным путем или фосфоглюконатным окислительным путем. Открытие Отто Варбургом (Otto Warburg) в 1931 г. глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, первого фермента этого пути, сделало возможной его полную расшифровку, которую осуществили Фриц Липман, Фрэнк Дикенс, Бернард Хорекер и Эфроим Рэкер.

Пентозофосфатный цикл не приводит к синтезу АТФ, он выполняет две главные функции: 1) образование NADPH для восстановительных синтезов, таких, как



синтез жирных кислот и стероидов; 2) обеспечение рибозой синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Ферменты пентозофосфатного пути локализованы во **внемитохондриальном** пространстве клеточной цитозоле. Как и в процессе гликолиза, окисление осуществляется путем дегидрогенирования, однако акцептором водорода в этом случае служит не NAD, а NADP.

Последовательность реакций пути можно разделить на две фазы: окислительную и неокислительную. В реакциях первой фазы глюкозо-6-фосфат дегидрогенируется и декарбоксилируется с образованием рибулозо-5-фосфата. В ходе второй фазы рибулозо-5-фосфат превращается снова в глюкозо-6-фосфат в результате серии реакций, в которых главную роль играют два фермента: **транскетолаза и трансальдолаза**

Окислительная фаза пентозофосфатного пути начинается с дегидрирования глюкозо-6-фосфата при C-1, реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой.

Фермент высокоспецифичен в отношении NADP<sup>+</sup>; K<sub>m</sub> для NAD<sup>+</sup> примерно в тысячу раз выше, чем для NADP<sup>+</sup>. Продуктом реакции является 6-фосфоглюконо-δ-лактон, внутримолекулярный эфир, с эфирной связью между C-1-карбоксильной группой и гидроксильной группой при C-5. Следующий этап - гидролиз 6-фосфоглюконо-δ-лактона специфической лактоназой, дающий 6-фосфо-глюконат. Этот шестиуглеродный сахар подвергается затем окислительному декарбоксилированию 6-фосфоглюконат - дегидрогеназой с образованием рибулозо-5-фосфата. Акцептором электронов вновь служит NADP<sup>+</sup>. (смотри рисунок). Конечным этапом синтеза рибозо-5-фосфата является изомеризация рибулозо-5-фосфата фосфопентозо-изомеразой. Эта реакция подобна гликолитическим реакциям:

Глюкозо-6-фосфат ↔ Фруктозо-6-фосфат

Дигидроксиацетонфосфат ↔ Глицеральдегид-3-фосфат.

Все три кетозо-альдозные изомеризации идут через образование эндиольного промежуточного продукта.

Существует группа наследственных болезней человека, при которых активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (этот фермент представлен изоформами с различной активностью, которые могут быть выявлены с помощью электрофореза или других методов) и некоторых других ферментов пентозофосфатного пути понижена или вообще отсутствует. У таких больных наблюдается патологический гемолиз – разрушение эритроцитов с выделением из них (через поврежденную мембрану) гемоглобина, что приводит к развитию анемии. Состояние резко ухудшается под влиянием некоторых лекарственных препаратов, особенно под влиянием противомаларийного препарата примахина. В Африке и Азии от этих наследственных болезней страдают многие миллионы людей.

Окислительная фаза пентозофосфатного пути иногда считается основной и неокислительная рассматривается как связка с гликолизом. Это связано с тем фактом, что эти фазы могут идти как независимо друг от друга, так вместе. В

ходе неокислительной фазы пентозофосфатного пути происходит регенерация рибозо-5-фосфата в глюкозо-6-фосфат. Основную роль в этом процессе играют два фермента: транскетолаза и трансальдолаза. Эти же ферменты создают обратимую связь между пентозофосфатным путем и гликолизом, катализируя следующие три реакции:

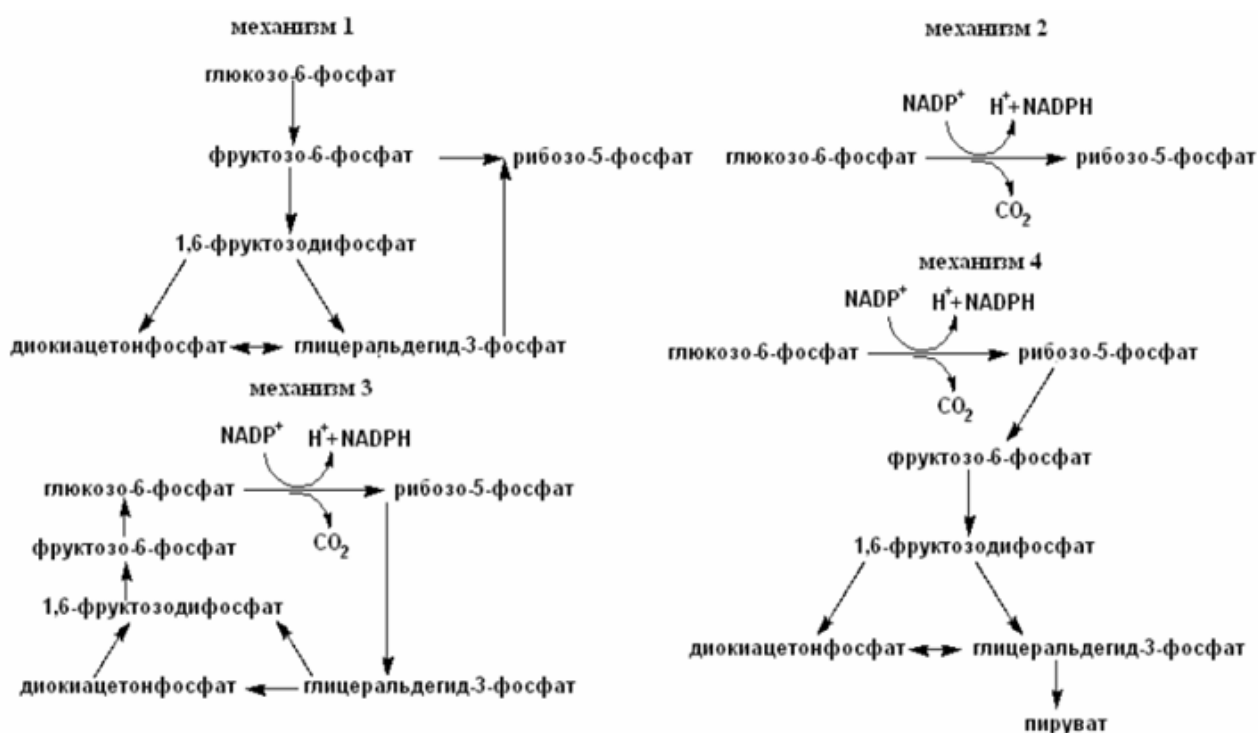
Транскетолаза переносит двухуглеродную группу, включающую 1-й и 2-й атомы углерода кетозы, на альдегидный углерод альдозного сахара. Происходит, следовательно, превращение кетосахара в альдозу, содержащую на два атома углерода меньше, и одновременное превращение альдосахара в кетозу, содержащую на два атома углерода больше. Коферментом реакции является тиаминдифосфат (в его состав входит тиамин — витамин группы В), для ее протекания необходимы ионы Mg<sup>2+</sup>. Переносимая двухуглеродная группа является, вероятно, гликоальдегидом, связанным с тиаминдифосфатом, т.е. «активным гликольальдегидом». Транскетолаза катализирует перенос двухуглеродной группы с ксилулозо-5-фосфата на рибозо-5-фосфат с образованием семиуглеродной кетозы седогептулозо-7-фосфата и альдозы глицеральдегид-3-фосфата. Эти два продукта далее вступают в следующую реакцию, называемую трансальдолазной. Трансальдолаза осуществляет перенос трехуглеродного фрагмента, «активного дигидроксиацетона» (атомы углерода 1 — 3), с кетозы седогептулозо-7-фосфата на альдозу глицеральдегид-3-фосфат; в результате образуются кетоза фруктоза-6-фосфат и четырехуглеродная альдоза эритрозо-4-фосфат. Следующая реакция снова катализируется транскетолазой. В этой реакции ксилулозо-5-фосфат служит донором «активного гликоальдегида». Роль акцептора выполняет образовавшийся ранее эритрозо-4-фосфат. Продуктами этой реакции являются фруктоза-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат. Рибозо-5-фосфат ↔ 2фруктозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат.

Итак, избыток рибозо-5-фосфата, образованный в пентозофосфатном пути, может количественно превращаться в промежуточные продукты гликолиза.

Значение метаболического пути для различных тканей можно оценить по его активности. Пентозофосфатный путь активно протекает в печени, жировой ткани, коре надпочечников, щитовидной железе, эритроцитах, семенниках и в молочных железах в период лактации; он неактивен в нелактирующей молочной железе и малоактивен в скелетных мышцах. Все ткани, в которых активность данного пути высока, используют в реакциях восстановительного синтеза **NADPH**, например в реакциях синтеза жирных кислот, стероидов, аминокислот (с участием глутаматдегидрогеназы) или восстановленного глутатиона в эритроцитах. Вероятно, в условиях активного липогенеза или при наличии любой системы, утилизирующей **NADPH**, возрастает активная деградация глюкозы по пентозофосфатному пути в связи с увеличением отношения **NADP: NADPH**. В условиях, которые возникают после приема пищи, может индуцироваться синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы.

## Регуляция скорости функционирования пентозофосфатного пути

Первая реакция окислительной ветви пентозофосфатного пути, дегидрирование



**Рисунок 6:** Схема регуляции направлений пентозофосфатного шунта

глюкозо-6-фосфата, по существу необратима. Действительно, при физиологических условиях эта реакция лимитирует скорость процесса и выполняет функцию «контрольного пункта». Наиболее важным регуляторным фактором является концентрация  $NADP^+$ , акцептора электронов при окислении глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконо-лактон. Кроме того,  $NADPH$  конкурирует с  $NADP^+$  за связывание с ферментом, и  $ATP$  конкурирует с глюкозо-6-фосфатом. Отношение концентрации  $NADP^+$  к концентрации  $NADPH$  в цитозоле печени крыс, содержащихся на полноценном рационе, составляет примерно 0,014, что на несколько порядков ниже отношения  $[NAD^+]/[NADH]$ , которое при этих же условиях равно 700. Выраженное действие концентрации  $NADP^+$  на скорость превращений по окислительной ветви пентозофосфатного пути подтверждает, что генерирование  $NADPH$  тесно сопряжено с его использованием в восстановительных биосинтезах. Вопрос о регуляции неокислительной ветви пентозофосфатного пути до сих пор остается открытым.

### Регуляция направления пентозофосфатного шунта

Судьба глюкозо-6-фосфата зависит от потребности в  $NADPH$ , рибозо-5-фосфате и  $ATP$

В данном случае возможно четыре различные ситуации.

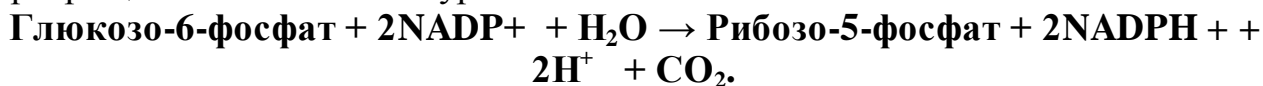
**1. Потребность в рибозо-5-фосфате значительно превышает потребность в  $NADPH$ .** Большая часть глюкозо-6-фос-фата превращается во фруктозо-6-

фосфат и глицеральдегид-3-фосфат по гликолитическому пути. Затем две молекулы фруктозо-6-фосфата и одна молекула глицеральдегид-3-фосфата превращаются под действием трансальдолазы и транскетолазы в три молекулы рибозо-5-фосфата путем обращения реакции, описанной ранее. Стехиометрия этого превращения следующая:



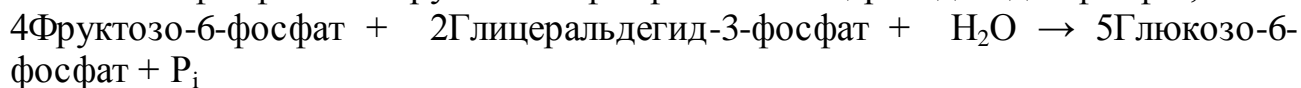
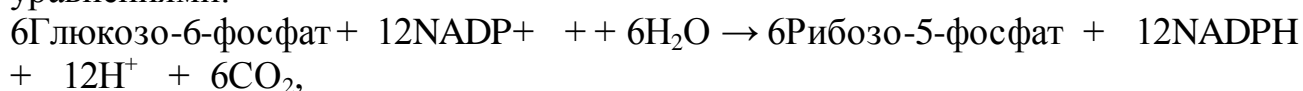
Из чего можно заключить, что в данном случае идет только неокислительная фаза.

**2. Потребность в NADPH и рибозо-5-фосфате сбалансирована.** При таких условиях преобладающей реакцией является образование двух молекул NADPH и одной молекулы рибозо-5-фосфата из одной молекулы глюкозо-6-фосфата по окислительной ветви пентозофосфатного пути. Стехиометрия этого превращения описывается уравнением



Из чего можно заключить, что в данном случае идет только окислительная фаза.

**3. Потребность в NADPH значительно превышает потребность в рибозо-5-фосфате; глюкозо-6-фосфат полностью окисляется в CO<sub>2</sub>.** В этой ситуации активно протекают три группы реакций. Во-первых, по окислительной ветви пентозофосфатного пути образуются два NADPH и один рибозо-5-фосфат. Далее рибозо-5-фосфат превращается во фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат под действием транс-кетотлазы и трансальдолазы. Наконец, происходит ресинтез глюкозо-6-фосфата из фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата по пути глюконеогенеза (рассматривается ниже в этой главе). Стехиометрия указанных реакций описывается следующими уравнениями:



Суммируя эти реакции, получается



Таким образом, эквивалент глюкозо-6-фосфата может быть полностью окислен до CO<sub>2</sub> с одновременным генерированием NADPH. Смысл указанных реакций состоит в том, что рибозо-5-фосфат, образовавшийся по пентозофосфатному пути, вновь превращается в глюкозо-6-фосфат под действием транскетолазы, трансальдолазы и некоторых ферментов глюконеогенеза. То есть происходят обе фазы пентозофосфатного пути.

**4. Потребность в NADPH значительно превышает потребность в рибозо-5-фосфате: глюкозо-6-фосфат превращается в пируват.** Возможен и другой путь; рибозо-5-фосфат образовавшийся по окислительной ветви

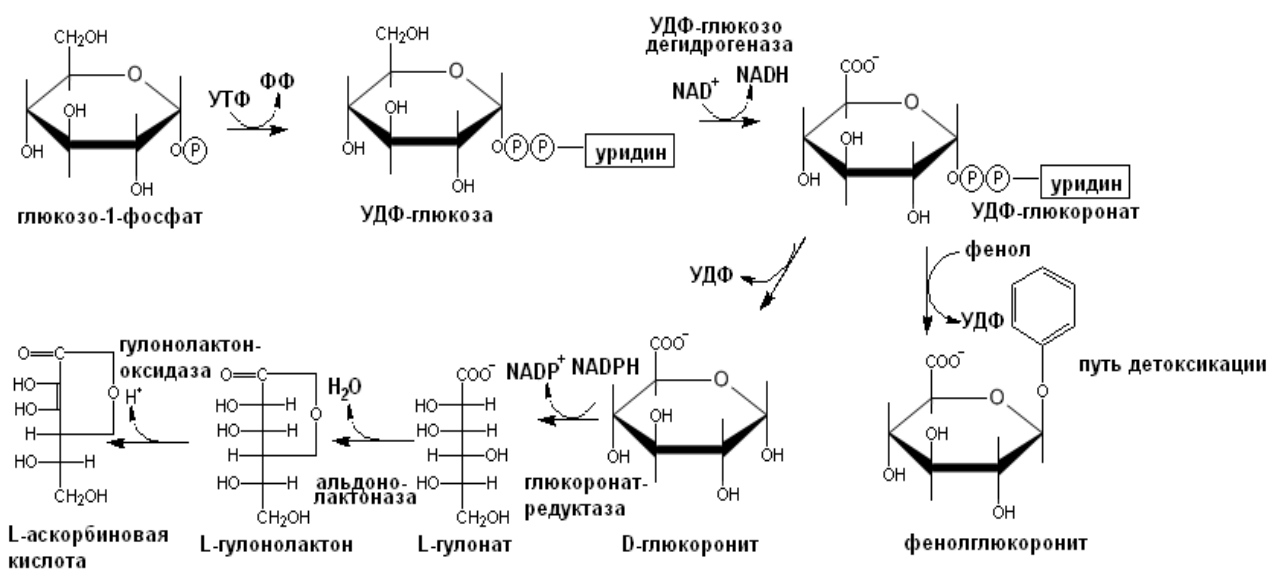
пентозофосфатного пути, превращается в пируват. Фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат, происходящие из рибозо-5-фосфата, вступают на гликолитический путь обмена, а не подвергаются обратному превращению в глюкозо-6-фосфат. Согласно изложенному механизму, происходит одновременное генерирование АТФ и NADPH и пять из шести атомов углерода глюкозо-6-фосфата появляются в пирувате:



Образовавшийся в этих реакциях пируват может окисляться с образованием дополнительного количества АТФ или может быть использован в качестве строительного блока в различных биосинтетических процессах.

### Вторичный путь, по которому происходит превращение глюкозы в глюкуроновую и аскорбиновую кислоты

По другому вторичному пути катаболизма глюкозы в животных тканях образуются два специализированных продукта: D-глюкуронат, важная роль которого связана с обезвреживанием и выведением из организма чужеродных органических веществ, и L-аскорбиновая кислота (витамин С). В этом случае



**Рисунок 7: Схема реакций биосинтеза аскорбиновой кислоты (витамина**  
D-глюкозо-1-фосфат сначала взаимодействует с УДФ и превращается в УДФ-глюкозу. Затем глюкозная часть молекулы УДФ-глюкозы подвергается ферментативному дегидрированию с образованием УДФ-D-глюкуроната. Эта реакция представляет собой еще один пример использования УДФ-производных в качестве промежуточных продуктов при ферментативных превращениях сахаров. УДФ-D-глюкуронат способствует обезвреживанию некоторых чужеродных веществ или лекарственных препаратов (например, фенола) и таким образом усиливает их выведение через почки. Кроме того, УДФ-глюкуронат служит предшественником D-глюкуронатных остатков в структурных полисахаридах, и промежуточным продуктом в процессе

превращения D- глюкозы в L-аскорбиновую кислоту. Он восстанавливается за счет NADPH до шестиуглеродной сахарной кислоты L-гулоната, которая затем превращается в соответствующий лактон. L-гулонолактон дегидрируется до L-аскорбиновой кислоты, или витамина С, при участии флавопротеина гулополактон-оксидазы. Именно этим путем синтезируется L-аскорбат в растениях и у тех животных, которые способны обеспечивать себя этим витамином. В организме человека, морской свинки, обезьян, некоторых видов птиц и индийской плодоядной летучей мыши витамин С не синтезируется; эти виды должны получать его в готовом виде, с пищей. Человек, морская свинка и разные виды обезьян не синтезируют витамин С потому, что у них отсутствует фермент гулонолактон - оксидаза. Можно думать, что некогда все организмы располагали набором ферментов, необходимых для синтеза аскорбата, но затем какие-то виды утратили эту способность к синтезу вследствие мутации, которая, однако, не оказалась для них летальной, поскольку обычную пищу данного вида составляли богатые витамином С растения. Доля глюкозы, отвлекаемой на этот вторичный путь, очень невелика, по сравнению с большим ее количеством, расщепляемым в процессе гликолиза и через цикл лимонной кислоты. Однако продукты таких вторичных путей жизненно необходимы организму.

### **Клеточное дыхание**

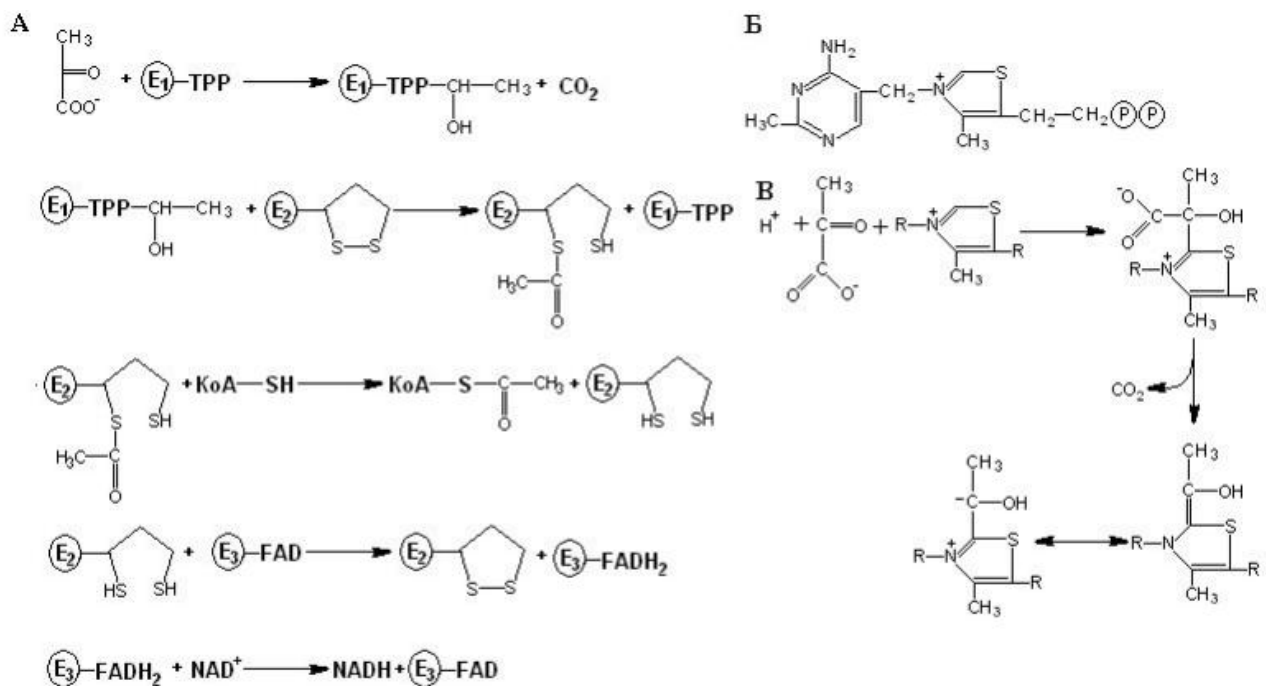
Как и говорилось выше у аэробных организмов пируват образовавшийся в ходе гликолиза поступает в процесс клеточного дыхания, который дает значительно больше молекул АТФ, чем гликолиз.

Клеточное дыхание включает три стадии:

1. окислительное образование ацетил-СоА из пирувата, жирных кислот и аминокислот,
2. расщепление ацетильных остатков в цикле лимонной кислоты, в результате которого образуются  $\text{CO}_2$  и атомы водорода,
3. перенос электронов на молекулярный кислород, сопряженный с окислительным фосфорилированием ADP до АТФ.

### **Образование ацетил КоА**

В аэробных условиях конечный продукт гликолиза пируват подвергается сначала дегидрированию и декарбокотированию с образованием ацетил-Со А и  $\text{CO}_2$ . Катализирует этот процесс пируватдегидрогеназный комплекс, располагающийся во внутренней мембране митохондрии и состоящий из трех последовательно действующих ферментов, важным коферментом которого



**Рисунок 8: А - схема работы пируватдегидрогеназного комплекса; Б - структура тиаминпирофосфата; В - схема реакции с тиаминпирофосфатом**

является тиамин пирофосфат (производное витамина В1 или ТПФ). Недостаток витамина В1, или тиамина, обуславливает заболевание, известное под названием бери-бери. Теперь нам ясно, что в организме животных, лишенных тиамина, оказывается невозможным нормальное окисление пирувата. Особенно сильно влияет такое нарушение на мозг, который обычно получает всю необходимую энергию путем аэробного окисления глюкозы и для которого поэтому окисление пирувата жизненно необходимый процесс. Превращение пирувата в ацетил-СоА происходит в четыре стадии. На первой стадии пируват соединяется с ТПФ и затем подвергается декарбосилированию. Реакция катализируется пируват-дегидрогеназным оппонентом мультиферментного комплекса. Решающее значение для данного процесса имеет следующая особенность ТПФ, простетической группы пируватдегидрогеназного компонента: очень кислый характер атома углерода, находящегося между атомами азота и серы тиазолового кольца. Он ионизируется, образуя карбанион, который легко присоединяется к карбонильной группе пирувата. Положительно заряженный азот в кольце ТПФ принимает на себя электроны, стабилизируя формирование отрицательного заряда, необходимого для декарбосилирования. Затем протонирование приводит к образованию гидроксиэтиламинпирофосфата. На второй стадии гидроксиэтильная группа, связанная с ТПФ, окисляется с образованием ацетильной группы и одновременно переносится на липоамид. Окислителем в этой реакции служит дисульфидная группа липоамида, которая превращается в сульфгидрильную группу. Реакция катализируется дигидролипоил трансацетилазным

компонентом комплекса и приводит к образованию ацетиллипоамида. На третьей стадии ацетильная группа переносится с ацетиллипоамида на CoA, образуя ацетил-CoA. Процесс также катализируется дигидролипоилтрансацилазой. При переходе ацетильной группы на CoA сохраняется богатая энергией тиоэфирная связь. На четвертой, завершающей стадии происходит регенерирование окисленной формы липоамида. Реакция катализируется дигидролипоил-дегидрогеназным компонентом комплекса, Окислителем в ней служит  $NAD^+$ , а роль простетической группы фермента выполняет FAD. Молекулярная масса данного комплекса составляет 4600 кДа и размер 300 А. В состав комплекса входит 48 полипептидных цепей, ядро комплекса образуют трансацилазные цепи, пируват и липоил дегидрогеназные комплексы присоединяются к ядру с внешней стороны. Структурное объединение трех видов ферментов делает возможным координированный катализ при осуществлении сложной реакции. Все промежуточные продукты реакции окислительного декарбоксилирования пирувата прочно связываются с комплексом. Тесная близость между ферментами увеличивает суммарную скорость процесса и сводит к минимуму побочные реакции. Активированные промежуточные продукты переносятся от одного активного центра к другому липоамидной простетической группой трансацилазы. Присоединение липоильной группы к  $\epsilon$ -аминогруппе лизинового остатка трансацилазы создает гибкий рычаг для реакционноспособного кольца. Этот молекулярный рычаг в 14 А способствует взаимодействию липоильной части трансацилазной субъединицы с тиаминпирофосфатным компонентом соседней пируват-дегидрогеназной субъединицы и с флавиновым компонентом соседней липоилдегидрогеназы. Кроме того, липоильные компоненты мультиферментного комплекса могут реагировать друг с другом, образуя сеть взаимодействующих реакционноспособных групп. Заряд липоильного компонента в течение цикла его превращений составляет 0, — 1 или — 2 при полной ионизации сульфгидрильных групп. Эти изменения заряда могут служить движущей силой для направленного движения липоильной группы.

Суммарная реакция пируватдегидрогеназного комплекса:



Скорость реакции пируватдегидрогеназной реакции регулируется.

### Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса

Реакция образования ацетил-CoA, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом, регулируется в животных тканях при помощи ковалентной модификации этого комплекса. Когда концентрация АТФ в митохондриях относительно велика и когда ацетил-CoA, а также промежуточные продукты цикла Кребса имеются в достаточном количестве, обеспечивающем удовлетворение энергетических нужд клетки, дальнейшее образование ацетил-



CoA приостанавливается. В этих условиях, которые служат сигналом для такой приостановки, АТФ является положительным модулятором, активирующим вспомогательный фермент - **киназу пируватдегидрогеназы**. Этот фермент использует АТФ для фосфорелирования остатка серина в активном центре молекулы пируватдегидрогеназы, в результате чего образуется неактивная форма фермента - фосфопируватдегидрогеназа. Если, однако, потребность в АТФ возрастает и уровень АТФ соответственно снижается, то неактивная, фосфорелированная, форма пируватдегидрогеназы может быть вновь активирована. Это происходит в результате гидролитического отщепления от молекулы пируватдегидрогеназы ингибирующей фосфатной группы. Катализирует эту реакцию другой фермент - **фосфатаза фосфопируватдегидрогеназы**. Стимулирующее действие на этот фермент оказывает повышение концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , играющих роль важного метаболического посредника; концентрация ионов  $Ca^{2+}$  увеличивается всякий раз, когда возникает потребность в АТФ. Киназа пируватдегидрогеназы и фосфатаза фосфопируватдегидрогеназы присутствуют в пируватдегидрогеназном комплексе. Этот комплекс, следовательно, представляет собой очень сложную, независимую и саморегулирующуюся систему. Пируватдегидрогеназный комплекс регулируется также путем аллостерической модуляции. Сильное ингибирующее действие оказывают на него (помимо АТФ) ацетил-CoA и NADH, которые являются продуктами пируватдегидрогеназной реакции и в то же время играют роль аллостерических ингибиторов этой системы. Аллостерическое ингибирование окисления пирувата резко усиливается в присутствии высокомолекулярных жирных кислот; ниже будет показано, что жирные кислоты тоже служат источником ацетил-CoA. Таким образом, каталитическая активность пируватдегидрогеназного комплекса выключается в тех случаях, когда в клетках имеется достаточно топлива в виде жирных кислот и ацетил-CoA или когда в них повышаются концентрация АТФ и отношение  $NADH/NAD^+$ .

### **Цикл трикарбоновых кислот**

АцетилCoA поступает в цикл трикарбоновых кислот. Впервые предположение о существовании такого цикла для окисления пирувата в животных тканях было высказано в 1937 г. Гансом Кребсом. Эта идея родилась у него, когда он исследовал влияние анионов различных органических кислот на скорость поглощения кислорода суспензиями измельченных грудных мышц голубя, в которых происходило окисление пирувата. Грудные мышцы отличаются чрезвычайно высокой интенсивностью дыхания, что делает их особенно удобным объектом для изучения окислительной активности. Незадолго до описываемых работ Кребса Альберт Сент-Дьёрдьи в Венгрии обнаружил, что некоторые четырехуглеродные дикарбоновые органические кислоты, присутствующие в животных тканях (янтарная, фумаровая, яблочная и

щавелевоуксусная), способны усиливать поглощение кислорода мышечной тканью. Кребс подтвердил это наблюдение и показал, что перечисленные органические кислоты стимулируют также окисление пирувата. Кроме того, он нашел, что окисление пирувата мышечной тканью стимулируется шестиуглеродными трикарбоновыми кислотами - лимонной, цис-аконитовой и изолимонной, а также пятиуглеродной  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой. Испытаны были и некоторые другие встречающиеся в природе органические кислоты, но ни одна из них не обнаружила подобной активности. Обращал на себя внимание сам характер стимулирующего действия активных кислот: даже малого количества любой из них было достаточно для того, чтобы вызвать окисление во много раз большего количества пирувата. Цикл трикарбоновых кислот представляет собою конечный общий путь для окисления топливных молекул. Он служит также источником строительных блоков для процессов биосинтеза. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-СоА. Окислительное декарбоксилирование пирувата, приводящее к образованию ацетил-СоА, является связующим звеном между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот.

Большая часть ферментов располагается в матриксе митохондрии.

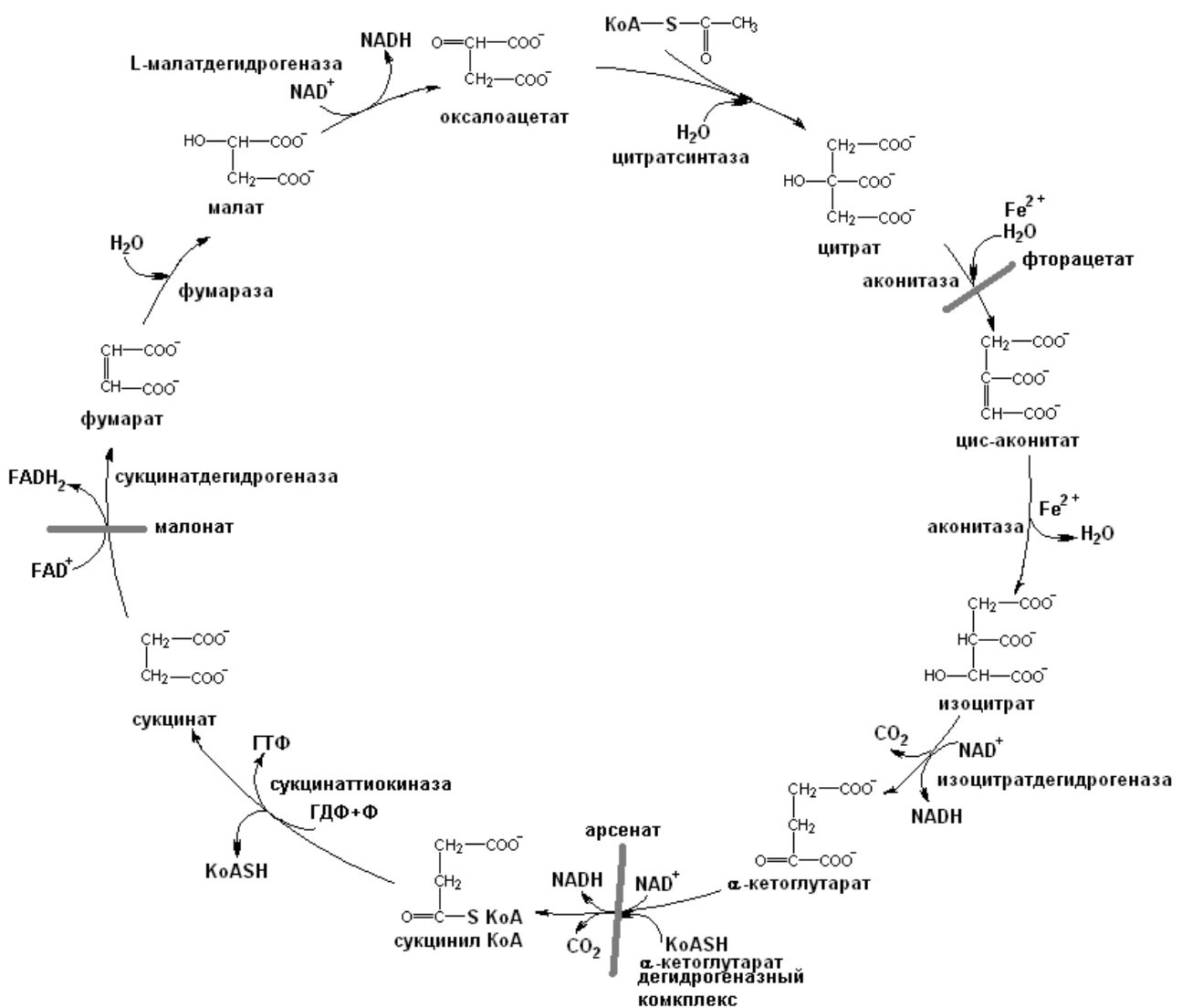
Исключение –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа, располагающиеся в внутренней мембране митохондрии.

Цикл можно подразделить на две части:

Окисление ацетил коА до  $\text{CO}_2$  и регенерация оксалоацетата.

Первая стадия окисления ацетил-СоА начинается с начальной реакции цикла. Начальная реакция — конденсация ацетил-СоА и оксалоацетата, приводящая к образованию цитрата, катализируется конденсирующим ферментом, **цитратсинтазой**, при этом происходит образование связи углерод-углерод между метильным углеродом ацетил-СоА и карбонильным углеродом оксалоацетата. За реакцией конденсации, приводящей к образованию цитрил-СоА, следует гидролиз тиоэфирной связи, сопровождающийся потерей большого количества свободной энергии в форме теплоты; это определяет протекание реакции слева направо до ее завершения. Превращение цитрата в изоцитрат катализируется **аконитазой** (аконитатгидратазой), содержащей ион железа в  $\text{Fe}^{2+}$ -состоянии, этот фермент относится классу лиаз, а не изомераз, как могло бы показаться на первый взгляд. Эта реакция осуществляется в две стадии: сначала происходит дегидратация с образованием цис-аконитата (часть его остается в комплексе с ферментом), а затем — гидратация и образование изоцитрата. Реакция ингибируется **фторацетатом**, который сначала превращается во фторацетил-СоА; последний конденсируется с оксалоацетатом, образуя фторцитрат. Непосредственным ингибитором аконитазы является фторцитрат; при ингибировании накапливается цитрат. Эксперименты с использованием промежуточных соединений, меченных изотопом  $^{14}\text{C}$ , показывают, что аконитаза взаимодействует с цитратом

асимметрично: она всегда действует на ту часть молекулы цитрата, которая образовалась из оксалоацетата. Это сначала было трудно объяснить, так как лимонная кислота является внешне симметричным соединением. Однако положение в пространстве двух групп —  $\text{CH COOH}$  лимонной кислоты относительно групп —  $\text{OH}$  и —  $\text{COOH}$  неидентично. Об асимметричном действии аконитазы свидетельствует «судьбах меченого ацетил- $\text{CoA}$  (т.е. положение атомов  $\text{C}^{14}$ ) в интермедиатах цикла лимонной кислоты. Возможно, что цис-аконитат не является обязательным интермедиатом между цитратом и изоцитратом и образуется на боковой ветви основного пути. Далее **изоцитратдегидрогеназа** катализирует дегидрогенирование с образованием оксалосукцината. Описаны три различных формы изоцитратдегидрогеназы. Одна из них,  **$\text{NAD}^+$ -зависимая**, найдена только в митохондриях. Две другие формы фермента являются  $\text{NADP}^+$ -зависимыми, причем одна из них также находится в митохондриях, а другая в цитозоле. Окисление изоцитрата, связанное с работой дыхательной цепи, осуществляется почти исключительно  $\text{NAD}^+$ -зависимым ферментом. Далее следует декарбоксилирование с образованием  $\alpha$ -кетоглутарата, которое также катализируется изоцитратдегидрогеназой. Это первая молекула  $\text{CO}_2$ , образующаяся при окислении ацети- $\text{CoA}$ . Важным компонентом реакции декарбоксилирования являются ионы  $\text{Mn}^{2+}$  (или  $\text{Mg}^{2+}$ ). Судя по имеющимся данным, оксалосукцинат, образующийся на промежуточной стадии реакции, остается в комплексе с ферментом.  $\alpha$ -Кетоглутарат в свою очередь подвергается **окислительному декарбоксилированию**, сходному с окислительным декарбоксилированием пирувата. По существу окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутарата катализируется ферментным комплексом, сходным по структуре с пируватдегидрогеназным комплексом. В состав  $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназного комплекса входят три вида ферментов:  $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназный ( $\text{A}'$ ), транссукцинилазный ( $\text{B}'$ ) и дигидролипоил-дегидрогеназный ( $\text{C}'$ ) компоненты. Далее,  $\text{A}'$  связывается с  $\text{B}'$ , и  $\text{B}'$  связывается с  $\text{C}'$ , но  $\text{A}'$  с  $\text{C}'$  непосредственно не связывается. Таким образом, ядро комплекса составляет транссукцинилаза (аналогично трансацетилазе).  $\alpha$ -Кетоглутарат — дегидрогеназный компонент



**Рисунок 9: Схема реакций цикла трикарбоновых кислот. Серыми полосами через стрелки обозначены ингибируемые реакции**

(A') и транссукцинилаза (B') отличаются от соответствующих ферментов (A и B) пируват-дегидрогеназного комплекса. В то же время дигидролипоил-дегидрогеназные части (C и C') обоих комплексов идентичны. Опыты с реконструированием этих систем показали, что комплекс, образованный A, B и C', также активен в отношении окислительного декарбоксилирования пирувата, как комплекс из A, B и C. Подобно этому, C и C' взаимозаменяемы при образовании реконструированного комплекса, осуществляющего окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата. Как ранее было отмечено, химотрипсин, трипсин, тромбин и эластаза являются гомологичными ферментами. Здесь видно, что пируват- и α-кетоглутарат-дегидрогеназные комплексы представляют собою гомологичные ассоциации ферментов. Структурные и механистические особенности, обеспечивающие координированный катализ на входе в цикл трикарбоновых кислот, вновь

используются позднее в процессе функционирования этого цикла. Равновесие реакции настолько сильно сдвинуто в сторону образования сукцинил-СоА, что ее можно считать физиологически однонаправленной. Как и при окислении пирувата, реакция ингибируется арсеналом, что приводит к накоплению субстрата ( $\alpha$ -кетоглутарата). Реакция окисления  $\alpha$ -кетоглутарата с образованием сукцинил-СоА является реакцией окислительного декарбоксилирования с образованием параллельно молекул  $\text{CO}_2$  и  $\text{NADH}$ . Это последняя реакция первого этапа цикла. Все последующие реакции относятся ко второму этапу цикла — регенерации оксалоацетата. Продолжением цикла является превращение сукцинил-СоА в сукцинат, катализируемое **сукцинаттиокиназой (сукцинил-СоА-синтетазой)**. Одним из субстратов реакций является ГДФ (или ИДФ), из которого в присутствии неорганического фосфата образуется СТР (ИТР). Это — единственная стадия цикла лимонной кислоты, в ходе которой генерируется высокоэнергетическая фосфатная связь на субстратном уровне; при окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетоглутарата потенциальное количество свободной энергии достаточно для образования  $\text{NADH}$  и высокоэнергетической фосфатной связи. В реакции, катализируемой фосфокиназой, АТФ может образовываться как из ГТФ, так и из ИТФ. Сукцинаттиокиназа — фермент, располагающийся в печени. В альтернативной реакции протекающей во внепеченочных тканях и катализируемой **сукцинилСоА-ацетоацетат-СоА-трансферазой** (тиофоразой), сукцинил-СоА превращается в сукцинат сопряженно с превращением ацетоацетата в ацетоацетил-СоА. В данной реакции нуклеозидтрифосфаты не образуются, но эта реакция используется для активации ацето-ацетата, что важно для обмена липидов, который будет подробно рассмотрен ниже. Далее сукцинат дегидрогенируется с образованием фумарата. Дегидрогенирование катализируется сукцинатдегидрогеназой, связанной с внутренней поверхностью внутренней митохондриальной мембраны. Это единственная дегидрогеназная реакция цикла лимонной кислоты, в ходе которой осуществляется прямой перенос водорода с субстрата на флавопротеин без участия  $\text{NAD}^+$ . Фермент содержит  $\text{FAD}$  и железо-серный ( $\text{Fe:S}$ ) белок. Добавление малоната или оксалоацетата ингибирует сукцинатдегидрогеназу, что приводит к накоплению сукцината. **Фумараза (фумаратгидратаза)** катализирует присоединение воды к фумарату с образованием малата. Фумараза специфична к L-изомеру малата, она катализирует присоединение компонентов молекулы воды по двойной связи фумарата в транс-конфигурации. Малатдегидрогеназа катализирует превращение малата в оксалоацетат, реакция идет с участием  $\text{NAD}^+$ . Хотя равновесие этой реакции сильно сдвинуто в направлении малата, реально она протекает в направлении оксалоацетата, поскольку он вместе с  $\text{NADH}$  постоянно потребляется в других реакциях.

Ферменты цикла лимонной кислоты, за исключением  $\alpha$ -кетоглутарат и сукцинатдегидрогеназы, обнаруживаются и вне митохондрий. Однако некоторые из этих ферментов (например, малатдегидрогеназа) отличаются от

соответствующих митохондриальных ферментов.

Таким образом, два атома углерода поступают в цикл в виде ацетил-СоА и два атома углерода покидают цикл в виде  $\text{CO}_2$  при последовательных реакциях декарбоксилирования.

Суммарная реакция цикла трикарбоновых кислот:



Суммарная реакция полного окисления глюкозы до  $\text{CO}_2$ :



### **Ингибиторы цикла Кребса. Яды: фторацетат и «летальный синтез»**

Среди простых соединений самым «смертельным» ядом является фторацетат натрия.  $\text{LD}_{50}$  (доза, летальная для 50% получивших ее животных) для крыс составляет всего лишь 0,2 мг/кг — почти в 10 раз меньше летальной дозы нервного яда диизопротилфторфосфата. Широко употребляемый (хотя и отзывы о его действии противоречивы) как яд для грызунов «1080», фторацетат был также обнаружен в листьях некоторых ядовитых растений, встречающихся в Африке, Австралии и Южной Америке. Примечательно, что дифторацетат  $\text{HCP}_2\text{—COO}^-$  вообще нетоксичен. Биохимическими исследованиями установлено, что сам фторацетат не оказывает на клетки токсического действия. Токсичность проявляется лишь после метаболического превращения фторацетата в фтороцитрат, являющийся высокоспецифичным ингибитором аконитазы. Этот факт весьма примечателен, поскольку изомерный фторцитрат, образующийся в реакции фтороксалоацетата с ацетил-СоА, оказывает на тот же фермент лишь слабое ингибирующее действие, хотя как раз у этого изомера атом фтора находится на том участке, который атакуется аконитазой. Атом фтора имеет небольшой ван-дер-ваальсов радиус (0,135 нм), сравнимый с ван-дер-ваальсовым радиусом водорода (0,12 нм); на это обстоятельство часто ссылаются, когда говорят о способности фторсодержащих соединений «обманывать» ферменты. Однако более вероятно, что высокая электроотрицательность фтора и его способность к участию в водородных связях делают его в метаболическом отношении более сравнимым с  $\text{—OH}$ -группой. В случае с фторцитратом предполагают, что ингибирующий изомер связывается с аконитазой «неправильным способом», при котором атом фтора оказывается координационно-связанным с атомом железа в активном центре аконитазы.

### **Регуляция скорости цикла трикарбоновых кислот**

Регуляция скорости цикла трикарбоновых кислот осуществляется на уровне регуляции скорости нескольких реакций цикла. В большинстве случаев скорость функционирования метаболических циклов определяется их

начальными этапами. Полагают, что так же обстоит дело и в случае цикла лимонной кислоты. Общая скорость его функционирования во многих тканях определяется первой реакцией: синтез цитрата. Разумеется, скорость цитратсинтазной реакции регулируется концентрацией ее субстратов, в частности концентрацией ацетил-СоА, а она в свою очередь зависит от активности пируватдегидрогеназного комплекса. Регулируется эта реакция также концентрацией второго субстрата – оксалоацетата; возможно даже, что этот фактор играет главную роль, поскольку концентрация оксалоацетата в митохондриях очень низка и зависит от метаболических условий. На активность цитратсинтазы влияет также концентрация сукцинил-СоА, одного из более поздних промежуточных продуктов цикла. Как только концентрация сукцинил-СоА превышает нормальный стационарный уровень, цитратсинтаза сразу же ингибируется, поскольку сукцинил-СоА понижает ее сродство к ацетил-СоА, то есть сукцинил-СоА является отрицательным аллостерическим регулятором (ингибитором) цитрат синтазы, уменьшающим ее активность. Жирные кислоты, служащие предшественниками ацетил-СоА<sub>T</sub> тоже ингибируют цитратсинтазу, являясь отрицательными аллостерическими эффекторами. В некоторых клетках роль аллостерических ингибиторов цитратсинтазы играют цитрат и NADH.

У большей части клеток окисление изоцитрата до  $\alpha$ -кетоглутарата и  $\text{CO}_2$ , которое может происходить под действием двух разных изоцитратдегидрогеназ, регулируется, по-видимому, путем аллостерической стимуляции NAD-зависимого фермента, вызываемой АДФ. В то же время NADH и NADPH действуют как отрицательные аллостерические модуляторы изоцитратдегидрогеназной активности. Ингибитором активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса служит продукт реакции сукцинил-СоА. Таким образом, в цикле лимонной кислоты регулируются, по меньшей мере, три стадии, и только в своих деталях эта регуляция у разных типов клеток несколько различается. Скорость гликолиза в нормальных условиях согласована со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты: в клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколько необходимо для того, чтобы обеспечить цикл лимонной кислоты «топливом», т. е. ацетильными группами ацетил-СоА. Ни пируват, ни лактат, ни ацетил-СоА обычно не накапливаются в аэробных клетках в больших количествах; их концентрации поддерживаются на некоем постоянном уровне, соответствующем динамическому равновесию. Согласованность между скоростью гликолиза и скоростью функционирования цикла лимонной кислоты объясняется не только тем, что первый процесс ингибируется высокими концентрациями АДФ и NADH, т.е. компонентами, общими для гликолитической и дыхательной стадий окисления глюкозы; определенную роль в этой согласованности играет также и концентрация цитрата. Продукт первой стадии цикла лимонной кислоты - цитрат является аллостерическим

ингибитором фосфофруктокиназы, катализирующей в процессе гликолиза реакцию фосфорилирования фруктозо-6-фосфата.

### **Анаплеротические реакции**

Цикл лимонной кислоты — это еще и один из амфиболических путей. Он используется не только для окислительного катаболизма, т. е. для расщепления углеводов, жирных кислот и аминокислот, но может служить также первой стадией многих биосинтетических путей, для которых он является источником предшественников. Под воздействием ряда важных вспомогательных ферментов некоторые промежуточные продукты цикла лимонной кислоты, главным образом  $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат, могут удаляться из цикла и использоваться в качестве предшественников аминокислот. Скорость функционирования цикла лимонной кислоты при этом, казалось бы, должна снижаться, поскольку такой отток промежуточных продуктов из цикла должен понижать их концентрацию в клетке. В действительности же этого не происходит, так как убыль промежуточных продуктов цикла восполняется благодаря действию другого набора ферментов. При нормальных условиях реакции, отвлекающие промежуточные продукты из цикла, и реакции, восполняющие их убыль, находятся в состоянии динамического равновесия, так что концентрация этих продуктов в митохондриях остается более или менее постоянной.

Специальные ферментативные реакции, обеспечивающие пополнение пула промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, носят название **анаплеротических** («пополняющих») реакций. Наиболее важная реакция такого рода в животных тканях это ферментативное карбоксилирование пирувата за счет  $\text{CO}_2$  с образованием оксалоацетата катализирует эту обратимую реакцию фермент **пируваткарбоксилаза**. Если для цикла лимонной кислоты не хватает оксалоацетата или какого-нибудь другого промежуточного продукта цикла, то карбоксилирование пирувата стимулируется и запас оксалоацетата растет. Для ферментативного присоединения карбоксильной группы к молекуле пирувата требуется энергия. Источником ее служит сопряженное с данной реакцией расщепление АТФ до АДФ и фосфата. Поскольку суммарная реакция сопровождается лишь незначительным изменением стандартной свободной энергии, мы можем заключить, что свободная энергия, необходимая для присоединения карбоксильной группы к пирувату, примерно равна свободной энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ. Пируваткарбоксилаза очень сложный фермент. Его молекулярная масса равна приблизительно 650000 Da. Молекула фермента содержит четыре простетические группы. Каждая из них состоит из одной молекулы витамина биотина, ковалентно связанного (пептидной связью) с аминокислотной группой особого остатка лизина, находящегося в активном центре. Свободный  $\text{CO}_2$ , предшественник новой карбоксильной группы оксалоацетата, сначала

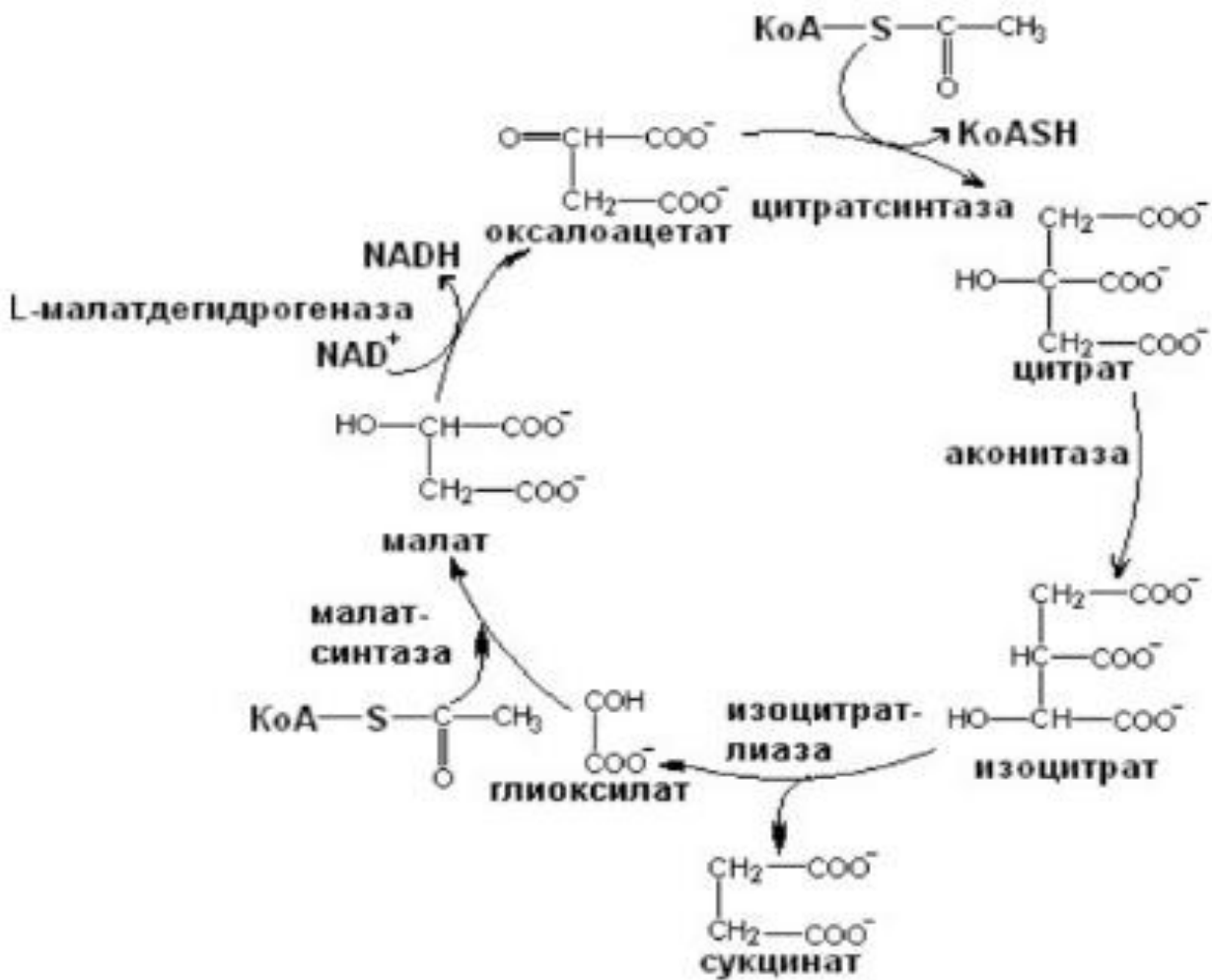


активируется путем присоединения к одному из атомов азота в молекуле биотина. Эта активация, связанная с расходом АТФ, составляет первую стадию реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой. На второй стадии, протекающей также в активном центре фермента, новая карбоксильная группа, ковалентно связанная с протетической группой фермента, переносится на пируват с образованием оксалоацетата. Пируваткарбоксилаза принадлежит к регуляторным ферментам. В отсутствие ацетил-СоА, который служит для нее положительным модулятором, скорость катализируемой ею прямой реакции, приводящей к образованию оксалоацетата, очень невелика. Избыток же ацетил-СоА, поставляющего «топливо» для цикла лимонной кислоты, стимулирует пируваткарбоксилазную реакцию; в результате этого образуется больше оксалоацетата и цикл использует больше ацетил-СоА в цитратсинтазной реакции. Пируваткарбоксилазная реакция — главная анаплеротическая реакция в печени и почках. В миокарде и в мышцах протекают другие анаплеротические реакции. Одна из таких реакций катализируется фосфоенолпируваткарбоксикиназой. В этой реакции происходит расщепление фосфоенолпирувата - сверхвысокоэнергетического фосфорилированного соединения, образующегося в процессе гликолиза. Высвобождаемая энергия используется для карбоксилирования с образованием оксалоацетата, а ее остаток запасается в форме ГТФ.

### **Глиоксилатный цикл одна из модификаций цикла лимонной кислоты**

У растений и некоторых микроорганизмов, например у *E. coli*, ацетильные группы часто служат не только высокоэнергетическим «топливом», но и источником метаболитов, из которых строятся углеродные скелеты углеводов. В таких клетках действуют два варианта цикла лимонной кислоты: 1) обычная последовательность реакций, в ходе которой происходит окисление ацетил-СоА до  $\text{CO}_2$  свойственная большинству тканей, и 2) особая ее модификация, называемая **глиоксилатным циклом**.

В глиоксилатном цикле ацетил-СоА взаимодействует с оксалоацетатом, в результате чего образуется цитрат. Однако расщепление изоцитрата происходит не в обычной изоцитратдегидрогеназной реакции, как в цикле лимонной кислоты, а особым путем под действием фермента **изоцитратлиазы** с образованием сукинната и глиоксилата. Образовавшийся глиоксилат далее конденсируется с другой молекулой ацетил-СоА, что приводит к образованию малата, эта реакция катализируется **малатсинтазой**. Затем малат окисляется до оксалоацетата, который может конденсироваться с новой молекулой ацетил-СоА, начиная тем самым новый оборот цикла. При каждом обороте глиоксилатного цикла в него вступают две молекулы ацетил-СоА и образуется одна молекула сукцинната, которая затем используется в



**Рисунок 10: Схема реакций глиоксилатного цикла**

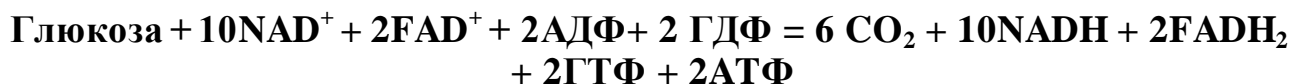
процессах биосинтеза. Сукцинат может превращаться через фумарат и малат в оксалоацетат из которого образуется фосфоенолпируват путем обращения описанной выше фосфоенолпируваткарбоксикиназной реакции. Фосфоенолпируват используется в качестве предшественника при биосинтезе глюкозы. У животных глиоксилатный цикл отсутствует; изоцитратсинтазы и малатлиазы в животных клетках нет. В организме животных существуют другие пути для синтеза углеводов из простых предшественников

. В прорастающих семенах глиоксилатный цикл, напротив, функционирует очень активно: таким путем из ацетильных групп (источником которых служат жирные кислоты, входящие в состав запасных триацилглицеролов) образуется глюкоза. Ферменты изоцитратлиаза и малатсинтаза находятся в растительных клетках в особых цитоплазматических органеллах **глиоксисомах**.

### **Дыхательная цепь и окислительное фосфорелирование**

Как было рассмотрено ранее суммарная реакция окисления глюкозы до CO<sub>2</sub> в

реакциях гликолиза и цикле трикарбоновых кислот выглядит следующим образом:

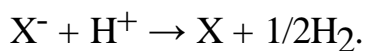


Как видно из суммарной реакции энергетический выход данного процесса окисления не велик 2 АТФ из гликолиза и 2 ГТФ из цикла трикарбоновых кислот если цикл идет в печени, то есть только в печеночной ткани цикл трикарбоновых кислот дает энергетический выход в виде нуклеозидтрифосфатов. При чем основным продуктом окисления являются восстановленные доноры/акцепторы электронов или NADH и FADH<sub>2</sub>, поэтому важным фактором является доказательство возможности использовать данные молекулы в качестве источника энергии. Хотя в составе данных молекул присутствуют фосфоангидридные связи, характерные для нуклеозидтрифосфатов, и, следовательно, данные молекулы могут быть донорами энергии как АТФ, но гидролиз данных молекул не является экономически выгодным, так как затраты на синтез этих молекул слишком велик. Вторая проблема связана с тем, что гидролиз связи может происходить как в окисленной, так и в восстановленной молекуле, следовательно, с такой точки зрения цикл трикарбоновых кислот становится бессмысленным, что для природы не характерно. Из этого можно сделать вывод, что запасание энергии связано с процессом восстановления окислительно-восстановительных эквивалентов NAD<sup>+</sup> и 2FAD<sup>+</sup> и окислительно-восстановительными реакциями. Необходимо это доказать. Основным параметром в окислительно-восстановительных реакциях является их способность отдавать (быть восстановителем) или принимать (быть окислителем) электроны в ходе реакции. Экспериментальной характеристикой этих способностей молекул является окислительно-восстановительный потенциал или red/ox потенциал.

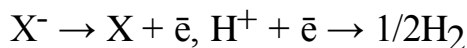
### **Окислительно-восстановительные потенциалы и изменения свободной энергии**

Окислительно-восстановительный потенциал - это электрохимическая категория. Необходимо рассмотреть для примера вещество, которое может существовать в окисленной X и в восстановленной форме X<sup>-</sup>. Такая пара называется окислительно-восстановительной парой. Окислительно-восстановительный потенциал такой пары можно определить, измеряя электродвижущую силу, развиваемую опытной полукамерой по отношению к стандартной контрольной полукамере. Опытная полукамера представляет собою электрод, погруженный в раствор 1 М окислителя (X) и 1 М восстановителя (X<sup>-</sup>). Стандартная контрольная полукамера состоит из электрода, погруженного в 1 М раствор H<sup>+</sup>, находящийся в равновесии с газообразным H<sub>2</sub> при давлении в 1 атм. Электроды присоединяют к вольтметру и агаровым мостиком обеспечивают электропроводность между полукамерами.

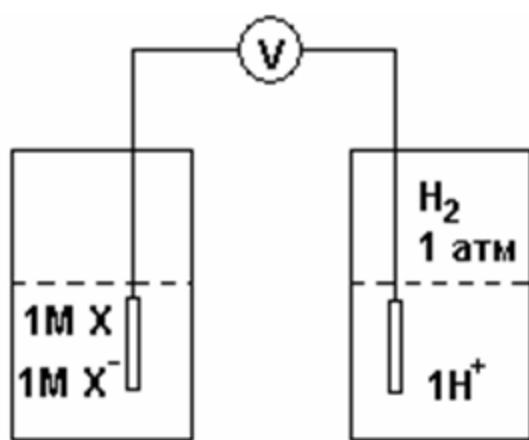
Происходит поток электронов от одной полужамеры к другой. Если реакция идет в направлении



то в полу камерах будут происходить следующие реакции:



Таким образом, электроны движутся от опытной полужамеры к контрольной и, следовательно, электрод в опытной полужамере заряжен отрицательно по отношению к электроду стандартной полужамеры. Окислительно-



восстановительный потенциал пары  $X:X^-$  соответствует напряжению в начале эксперимента (когда концентрации  $X$ ,  $X^-$  и  $H^+$  равны 1 М). Окислительно-восстановительный потенциал пары  $H^+:H_2$  определен равным 0 В (вольт). Значение окислительно-восстановительного потенциала теперь очевидно. Отрицательный окислительно-восстановительный потенциал говорит о том, что данное вещество имеет меньшее сродство к электронам, чем  $H_2$  (как в вышеприведенном примере), то есть молекула является донором электронов, то есть восстановителем. Положительный

**Рисунок 11: Структура эксперимента метода полужамер для определения окислительно-восстановительного потенциала**

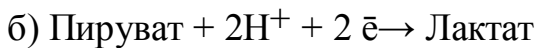
окислительно-восстановительный потенциал свидетельствует о более высоком, чем у  $H_2$ , сродстве данного вещества к электронам, то есть является окислителем или молекулой, с большей легкостью присоединяющей электроны. Эти соотношения относятся к стандартным условиям, когда концентрации окислителя, восстановителя и  $H^+$  равны 1 М и давление  $H_2$  составляет 1 атм. Таким образом, сильный восстановитель (например,  $NADH$ ) обладает отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, тогда как сильный окислитель ( $O_2$ ) имеет положительный окислительно-восстановительный потенциал. Окислительно-восстановительные потенциалы многих биологически важных окислительно-восстановительных пар известны. Изменение свободной энергии окислительно-восстановительной реакции можно легко вычислить из разности окислительно-восстановительных потенциалов реагирующих соединений. Рассмотрим, например, восстановление пирувата за счет  $NADH$ :



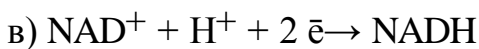
Окислительно-восстановительный потенциал для пары  $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$  равен — - 0,32 В, для пары пируват : лактат — - 0,19 В. Необходимо определиться, что окислительно-восстановительные потенциалы, относящиеся к частичным реакциям, записывать следующим образом:

**Окислитель +  $\bar{e}$  → Восстановитель.**

Тогда:



$$E_0 = - 0,19 \text{ В,}$$



$$E_0 = - 0,32 \text{ В.}$$

Вычитая реакцию в) из реакции б), получаем желаемую реакцию а) и  $\Delta E'_0 = + 0,13 \text{ В}$ . Теперь можем рассчитать  $\Delta G^0$  для восстановления пирувата за счет NADH. Изменение стандартной свободной энергии  $\Delta G^0$  связано с изменением окислительно-восстановительного потенциала  $\Delta E'_0$  уравнением

$$\Delta G^0 = -nF \Delta E'_0$$

где n- число переносимых электронов, F-число Фарадея ( $23,062 \text{ ккал} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ ),  $\Delta E'_0$  выражается в вольтах,  $\Delta G^0$  в килокалориях на моль. Для восстановления пирувата  $n = 2$ , и тогда

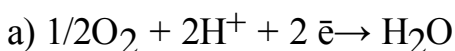
$$\Delta G^0 = - 2 * 23,062 * 0,13 = - 6 \text{ ккал/моль.}$$

Заметим, что положительное значение  $\Delta E'_0$  указывает на экзергонический характер реакции, протекающей в стандартных условиях.

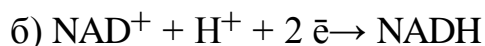
Величина окислительно-восстановительного потенциала дыхательной цепи составляет 1,14 В, что соответствует 53 ккал

Изменение окислительно-восстановительного потенциала при переходе от системы  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  к системе  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  составляет 1,1 В.

Движущая сила окислительного фосфорелирования - это потенциал переноса электронов, присущий NADH или  $\text{FADH}_2$ . Расчеты  $\Delta E'_0$  и  $\Delta G^0$  связанные с окислением NADH под действием  $\text{O}_2$ . Промежуточные частичные реакции следующие:

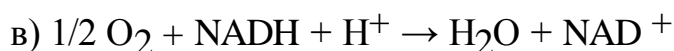


$$E'_0 = + 0,82 \text{ В,}$$



$$E'_0 = - 0,32 \text{ В.}$$

Вычитая реакцию б) из реакции а), получаем



$$\Delta E'_0 = + 1,14 \text{ В.}$$

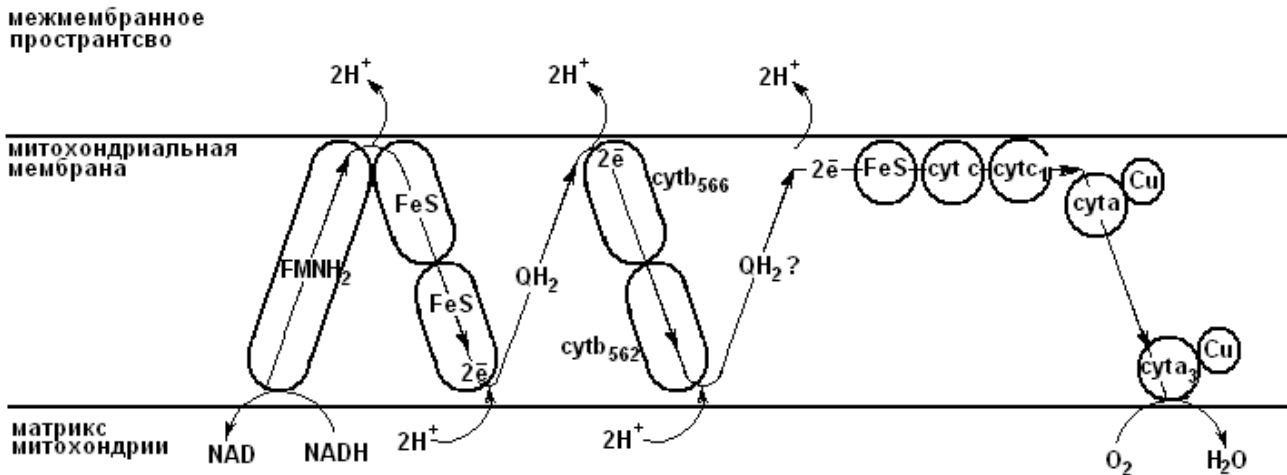
Свободная энергия окисления для этой реакции составляет

$$\Delta G^0 = -23,062 \cdot 1,14 = - 26,3 \text{ ккал/моль.}$$

Таким образом доказано, что молекула NADH является источником энергии, и как показывают расчеты при окислении этой молекулы с участием кислорода выделяется такое количество энергии, которое достаточно для синтеза 7 молекул АТФ. Но реакция происходит взрывообразно, и это не позволяет перевести энергию в более адекватную форму. Чтобы обеспечить перевод энергии окисления в энергию АТФ необходима система окисления, это обеспечивает дыхательная цепь, состоящая из 4-х белковых комплексов, содержащих коферменты, участвовавшие в окислительно-восстановительных реакциях. В результате мы имеем с одной стороны материальную группу молекул, передающих электроны друг от друга, то есть образуется система передачи электронов от NADH к O<sub>2</sub> по которому идут электроны, как электрическая цепь в сети, с другой стороны это последовательность окислительно-восстановительных реакций, которые происходят в составе электронтранспортной цепи, молекулы коферментов являются окислителями (акцепторами электронов) при взаимодействии с предшествующими молекулами, и являются восстановителями (донорами электронов) при взаимодействии со следующей молекулой цепи. Из этого заключить, что каждый следующий кофермент является большим окислителем, чем предыдущий, то есть этот кофермент «отбирает» электроны у предыдущего кофермента, а у него электроны «отбирает» следующий кофермент в электронтранспортной цепи. В данном случае наблюдается увеличение окислительно-восстановительного потенциала, следовательно, каждый следующий кофермент в электронтранспортной цепи является большим окислителем, и как следствие электронтранспортная цепь не только физическая часть для потока электронов, но последовательность окислительно-восстановительных реакций.

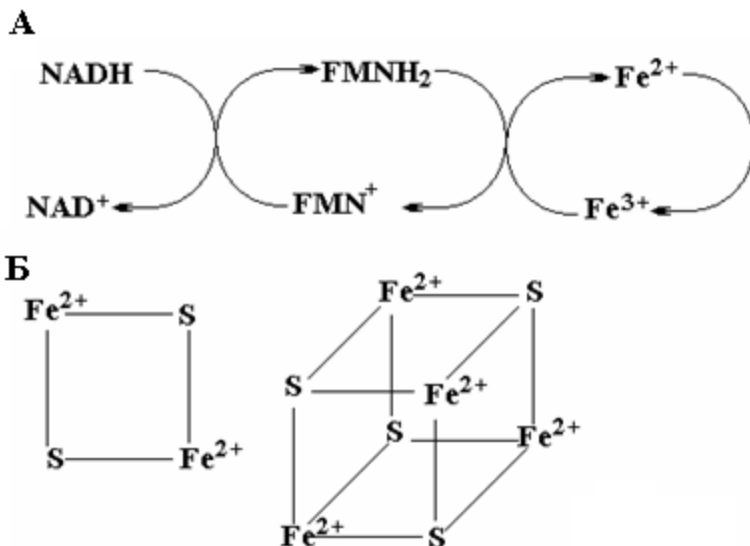
**Организация и механизм функционирования электронтранспортной цепи**

Электронтранспортная цепь организована во внутренней мембране митохондрий и представляет собой четыре белковых комплекса, содержащих коферменты. Первый комплекс или NADH-дегидрогеназа взаимодействует с



**Рисунок 12:** Схема общей организации дыхательной цепи

молекулой NADH в результате электроны переносятся на флавиномононуклеотид (FMN), в результате FMN принимает с NADH два электрона и два протона от среды, и образуется NAD<sup>+</sup> и FMNH<sub>2</sub>, затем электроны переносятся на Fe-S белки. Известны три вида Fe-S-центров. В простейшем случае единственный атом железа тетраэдрически координирован с



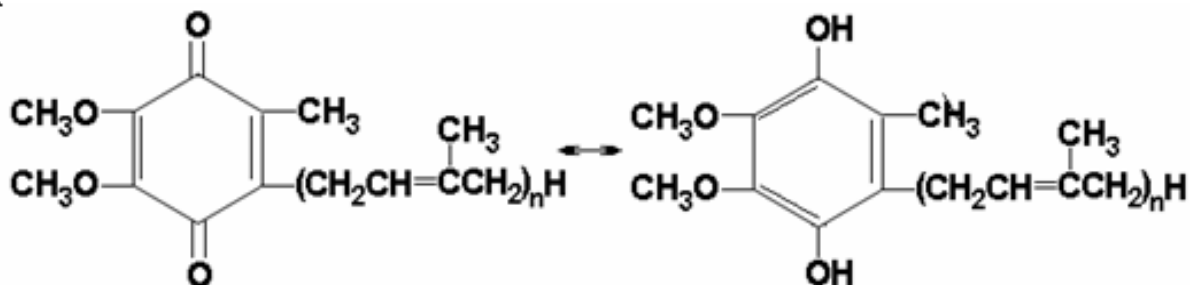
**Рисунок 13:** А - схема окислительно-восстановительных реакций в комплексе I; Б - структура FeS коферментов

восстановленном (Fe<sup>2+</sup>) или окисленном (Fe<sup>3+</sup>) состоянии. NADH-Q - редуктаза содержит второй (Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>) и третий (Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>) типы комплексов. В данном случае FeS белок является более сильным окислителем, чем FMN,

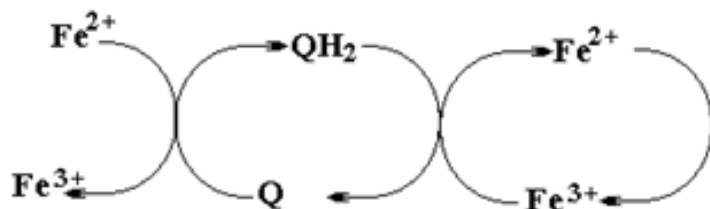
с сульфгидрильными группами четырех цистеиновых остатков белка. Второй вид комплексов (обозначен как Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>) содержит 2 атома железа и два неорганических дисульфида, присоединенных к четырем цистеиновым остаткам. В комплексах третьего вида (Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>) содержится четыре атома железа, четыре неорганических сульфида и четыре остатка цистеина. Атом железа в этих комплексах может присутствовать в

следовательно электроны переносятся с FMNH<sub>2</sub> на ион Fe<sup>3+</sup> в результате происходит окисление FMNH<sub>2</sub> и в результате образуется FMN<sup>+</sup> и происходит восстановление FeS белка до Fe<sup>2+</sup>, который переносит только электроны и

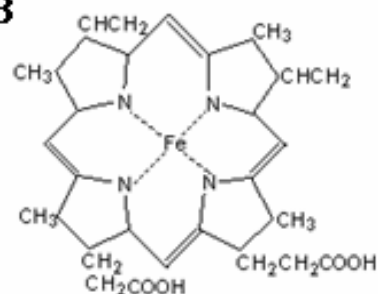
**А**



**Б**



**В**



**Рисунок 14: А - схема окислительно-восстановительной реакции с убихином; Б - схема окислительно-восстановительных реакций между FeS белком и убихином, между убихином и гемом в цитохромах**

образуется восстановленная форма Fe<sup>2+</sup>, Затем электроны передаются на второй FeS белок, соответственно Fe<sup>2+</sup> состояние предшественника переходит в Fe<sup>3+</sup>, у второго белка наоборот происходит восстановление Fe<sup>3+</sup> в Fe<sup>2+</sup>. Но на этом активность NADH-дегидрогеназы, крупного белкового комплекса, где содержится более 38 полипептидных цепей, можно сказать заканчивается. Окисляет последний FeS-белок убихинон. От железо-серных центров NADH-Q-редуктазы электроны переносятся далее на кофермент Q. Кофермент Q-хиноновое производное с длинным изопреноидным хвостом. Его называют также убихином из-за его повсеместного распространения в биологических системах. Число изопреновых единиц в кофермент Q зависит от вида живых организмов, у млекопитающих его наиболее распространенная форма содержит десять изопреновых единиц и обозначается как Q<sub>10</sub>. Изопреноидный хвост обуславливает высокую неполярность Q, которая способствует его быстрой диффузии в углеводородной фазе внутренней митохондриальной мембраны. Этот переносчик, названный **убихином** или **коферментом Q**, в аэробных условиях находится в митохондриях в форме окисленного хинона, а в



анаэробных условиях — в восстановленной хинольной форме. Кофермент Q является компонентом митохондриальных липидов; среди других липидов преобладают фосфолипиды, являющиеся частью митохондриальной мембраны. Структура кофермента Q сходна со структурой витаминов K и E. Близкую структуру имеет и пластохинон, находящийся в хлоропластах. Все эти вещества имеют в своей структуре полиизопреноидную боковую цепь. Содержание кофермента Q значительно превосходит содержание других компонентов дыхательной цепи (по параметру стехиометрии); это позволяет предположить, что кофермент Q является подвижным компонентом дыхательной цепи, который получает восстановительные эквиваленты от фиксированных флавопротеиновых комплексов и передает их на цитохромы. Кофермент Q — единственный переносчик электронов в дыхательной цепи, который не связан прочно с белком и не присоединен к нему ковалентно. Кофермент Q действительно служит высокоподвижным переносчиком электронов между флавопротеинами и цитохромами цепи переноса электронов. Убихинон при восстановлении принимает не только электроны, но и протоны, также он является большим окислителем, чем FeS белок в NADH-дегидрогеназе соответственно, происходит окисление иона железа в FeS белке, и убихинон принимает с него электроны и протоны из окружающей среды. В результате образуется восстановленная форма убихинона QH<sub>2</sub>, которая диффундирует к комплексу III электронтранспортной цепи (нумерация комплексов проводилась по хронологии их открытия и характеристики, а не расположения в цепи). Комплекс III содержит два гема, которые относятся к цитохромам. Центральную роль цитохромов в дыхании открыл в 1925 г. Дэвид Кейлин (David Keilin). Цитохром — это переносящий электроны белок, молекула которого содержит в качестве простетической группы гем. В ходе переноса электронов атом железа находится то в восстановленной ферроформе (+2), то в окисленной ферриформе (+3). Группа гема, подобно Fe-S-центру, переносит только один электрон. Гемы в цитохромах представляют собой тетрапирольные кольца, координированные с ионами металлов. В зависимости от иона и радикалов, модифицирующих кольцо, выделяют несколько классов цитохромов. В состав комплекса III входят две молекулы цитохрома: цитохром b<sub>566</sub> и цитохром b<sub>562</sub> (цифры обозначают длину волны, которому соответствует максимум поглощения в спектре). В обеих молекулах присутствует ион железа, который и является акцептором электронов. QH<sub>2</sub> взаимодействует с молекулой цитохрома b<sub>566</sub>, которая является большим окислителем, в результате QH<sub>2</sub> окисляется до Q, Fe<sup>3+</sup> в цитохроме восстанавливается до Fe<sup>2+</sup>, за тем более сильный окислитель цитохром b<sub>562</sub> окисляет восстановленную форму цитохрома b<sub>566</sub>, а сам восстанавливается, и уже его ион железа переходит из состояния 3+ в 2+. На комплекс III через электронпереносящий белок электроны поступают с сукцинат-дегидрогеназы (фермента цикла трикарбоновых кислот), то есть с FADH<sub>2</sub>. Комплекс III контактирует с комплексом II, некоторые предполагают наличие связывающей

убихиноновой молекулы, но она не обнаружена, следовательно, комплексы III и II контактируют напрямую. Восстановленная форма цитохрома b 562, окисляется FeS белком в комплексе II, так как это FeS белок, то здесь также переход  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$  для восстановителя, и наоборот для окислителя. Восстановленную форму FeS белка окисляет цитохром c, также содержащий ион железа, следовательно переходы окисленных и восстановленных форм аналогичны предшествующей реакции. Цитохром c окисляется цитохромом c1, подвижным периферическим гемсодержащим белком, в гем которого входит ион железа. Цитохром c1 мигрирует с последнему комплексу IV, содержащему два гема цитохромов a. Ион железа в цитохроме c1 взаимодействует с ионом меди в результате в цитохроме c1 происходит переход  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$ , а в цитохроме a  $Cu^{2+}$  в  $Cu^+$ , то есть цитохром a восстанавливается. Восстановленная форма цитохрома a, окисляется цитохромом a3, в цитохроме a происходит переход  $Cu^+$  в  $Cu^{2+}$ , а цитохром a3 восстанавливается, в результате происходит переход  $Cu^{2+}$  в  $Cu^+$ . Восстановленная форма цитохрома a3 окисляется кислородом и образуется вода. Таким образом происходит перенос электронов от NADH к кислороду, то есть поток электронов или идет цепь последовательных окислительно-восстановительных реакций, где почти каждая молекула является акцептором электронов в предшествующей реакции и донором в последующей. Как было рассмотрено выше в ходе окислительно-восстановительных реакций также выделяется и поглощается энергия, в начальных этапах исследований считалось, что выделившаяся энергия затрачивается на синтез некоего макроэргического соединения, которое гидролизуясь дает энергию для фосфорилирования АДФ и образования АТФ. Но дальнейшие исследования показали, что на самом деле никакого соединения нет. А все экспериментальные исследования подтвердили гипотезу, а затем теорию предложенную в 1961 году Питером Митчеллом.

### **Хемиосмотическая гипотеза Митчелла**

Он предположил, что сопряжение переноса электронов и синтеза АТФ обеспечивается протонным градиентом, а не высокоэнергетическим ковалентным промежуточным продуктом или активированным белком. Согласно этой модели, перенос электронов по дыхательной цепи приводит к выбросу протонов из матрикса на цитоплазматическую сторону внутренней митохондриальной мембраны, где, таким образом, возрастает концентрация ионов  $H^+$ . В результате происходит генерирование мембранного потенциала с положительным зарядом на цитоплазматической стороне мембраны.

Гипотеза Митчелла о сопряжении окисления и фосфорелирования протонным градиентом получила к настоящему времени множество подтверждений.

1. Согласно Митчеллу, первичным событием в окислительном

фосфорелировании является транслокация протонов ( $H^+$ ) на наружную сторону сопрягающей мембраны (внутренней митохондриальной мембраны), осуществляемая за счет процесса окисления в дыхательной цепи. При этом предполагается, что мембрана непроницаема для ионов вообще, особенно для протонов, которые накапливаются на наружной стороне мембраны, создавая **по обе стороны мембраны разность электрохимических потенциалов**

( $\Delta\mu$ ). Она складывается из химического потенциала (разность рН) и электрического потенциала. Разность электрохимических потенциалов обеспечивает действие **локализованной в мембране АТФ-синтазы** (или обращение процесса, катализируемого локализованной в мембране АТФ-гидролазой), которая в присутствии  $\Phi_H \rightarrow$  АДФ синтезирует АТФ. Таким образом, нет необходимости в высокоэнергетическом промежуточном соединении, общем для процессов окисления и фосфорелирования, как это постулирует химическая гипотеза.

Протонный градиент через внутреннюю митохондриальную мембрану создается во время переноса электронов. рН с наружной стороны на 1,4 единицы ниже, чем с внутренней, и мембранный потенциал составляет 0,14 В, причем наружная сторона несет положительный заряд. Общий электрохимический потенциал  $\Delta p$  (в вольтах) складывается из мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) и градиента концентрации ионов  $H^+$  ( $\Delta pH$ ). В приведенном ниже уравнении  $R$ -газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура,  $F$ - число Фарадея.

$$\Delta p = \Delta\psi - RT/F * \Delta pH$$

как видно из уравнения в него входят два компонента электрический ( $\Delta\psi$ ) и химический ( $RT/F * \Delta pH$ ). Электрический компонент связан с запасанием энергии, в данном случае наблюдается следующая картина, за счет переноса протонов, водный раствор межмембранного пространства заряжен положительно, а водная часть матрикса митохондрии наоборот отрицательно, а мембрана за счет гидрофобного билипидного слоя как слой диэлектрика (это похоже на две заряженные пластины, разделенные слоем диэлектрика, а это уже конденсатор). В случае разницы в концентрациях протонов между двумя указанными выше компартментами — это тоже форма запасания энергии. Известно, что на создание градиентов затрачивается энергия АТФ, на пример работа  $K/Na$ -АТФ-азы. При подстановке результатов, полученных при измерении, в уравнение можно получить результаты приведенные ниже.

$$\Delta p = \Delta\psi - RT/F * \Delta pH = \Delta\psi - 0,06\Delta pH = 0,14 - 0,06 (- 1,4) = 0,224 \text{ В.}$$

Эта общая протондвижущая сила в 0,224 В соответствует свободной энергии 5,2 ккал в расчете на 1 моль протонов. Следовательно для синтеза одного моля АТФ необходим перенос 2 моль протонов.

2. При создании градиента рН в митохондриях или хлоропластах в них

происходит синтез АТР в отсутствие переноса электронов.

3. Белок пурпурных мембран галобактерий при освещении перекачивает протоны. Синтетические пузырьки, содержащие этот бактериальный белок и очищенную АТР-азу из митохондрий сердца крупного рогатого скота, синтезируют АТФ при освещении. В этом опыте белок пурпурных мембран заменяет дыхательную цепь; следовательно, дыхательная цепь и АТФ-аза - биохимически отдельные системы, связываемые только протонным градиентом.

4. И дыхательная цепь, и АТФ-аза имеют векторную организацию во внутренней митохондриальной мембране.

5. Для окислительного фосфорелирования существенное значение имеет замкнутость компартментов. В растворимых препаратах или в мембранных фрагментах, лишенных хорошо отграниченных внутренних и внешних компартментов, не происходит синтеза АТФ, сопряженного с переносом электронов.

6. Вещества, переносящие протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану, разрушают протонный градиент и таким образом вызывают разобщение окисления и фосфорелирования.

7. Компоненты дыхательной цепи уложены в мембране упорядоченно, «бок о бок», поперек мембраны, как предусматривается хемиосмотической теорией.

8. Коэффициент  $P:H^+$  для АТФ-синтазы равен 1:2, а коэффициент  $H^+ : O$  для окисления сукцината и 3-гидроксибутирата 4 и 6 соответственно; это примерно согласуется с ожидаемыми соотношениями. Эти данные коррелируют с наличием трех о/в петель дыхательной цепи.

Второй важный факт это точки переноса протонов, или точки генерации протонного градиента, так как естественно, что в каждой реакции генерация не происходит. Следовательно важным моментом является определение количества и положения точек генерации протонного градиента.

### **Протонный градиент генерируется в трех точках**

Выброс протонов происходит в трех пунктах потока электронов по дыхательной цепи от NADH к  $O_2$ :

- 1-й пункт - это NADH-Q - редуктазный комплекс;
- 2-й пункт -  $QH_2$ -цитохром-с - редуктазный комплекс;
- 3-й пункт-цитохром-с-оксидазный комплекс.

Протонный градиент, генерируемый в каждом из пунктов при переносе пары электронов от NADH, используется для синтеза одной молекулы АТР. Для идентификации этих пунктов применялись различные экспериментальные

подходы.

Существуют следующие доказательства количества и положения точек генерации протонного градиента.

**1. Сравнение выхода АТФ при окислении нескольких субстратов.** Окисление NADH дает три АТФ, тогда как окисление сукцината дает два АТФ. Электроны от FADH<sub>2</sub> поступают в цепь переноса электронов на уровне кофермента Q, который находится на более низком энергетическом уровне, чем 1-й пункт фосфорелирования. При окислении нефизиологического субстрата аскорбата образуется только одна молекула АТФ, потому что электроны аскорбата поступают на цитохром с, находящийся на более низком энергетическом уровне, чем 2-й пункт фосфорелирования. Окислительное фосфорелирование часто характеризуют отношением P:O-число молей неорганического фосфата, включающегося в органическую форму, в расчете на один атом потребляемого кислорода. Отношения P :O для окисления NADH, сукцината и аскорбата составляют соответственно 3, 2 и 1.

**2. Термодинамические измерения.** Значение  $\Delta G^{0'}$  для переноса электронов от NADH на находящийся на более низком энергетическом уровне Fe-S-центр в NADH-Q-редуктазе составляет - 12 ккал/моль; для переноса электронов от цитохрома *b* к *c*<sub>1</sub> в QH<sub>2</sub>-цитохром-с-редуктазе - 10 ккал/моль и от цитохрома *a* к O<sub>2</sub> в цитохром-оксидазе - 24 ккал/моль. Эти окислительно-восстановительные реакции являются в достаточной степени экзергоническими для запуска синтеза АТФ при стандартных условиях ( $\Delta G^{0'} = - 7,3$  ккал/моль). Значения  $\Delta G^{0'}$  для других реакций переноса электронов, опосредуемых коферментом Q и цитохромом с, слишком малы для поддержания синтеза АТФ.

**3. Специфическое ингибирование тока электронов.** Ротенон и амитал специфически ингибируют перенос электронов в NADH-Q-редуктазном комплексе и таким образом предотвращают генерирование протонного градиента в 1-м пункте. В то же время указанные ингибиторы не нарушают окисления сукцината, поскольку электроны этого субстрата поступают в цепь переноса электронов после блока кофермента Q. Антимидин А тормозит ток электронов между цитохромами *b* и *c*<sub>1</sub>, предотвращая синтез АТФ, сопряженный с генерированием протонного градиента во 2-м пункте. Этот блок можно обойти добавлением аскорбата, который непосредственно восстанавливает цитохром с. Электроны затем пойдут от цитохрома с к O<sub>2</sub> с одновременным синтезом АТФ, сопряженным с протонным градиентом в 3-м пункте. Наконец, ток электронов может быть блокирован между цитохромоксидазным комплексом и O<sub>2</sub> под действием CNS, H<sub>2</sub>S и CO. Цианид и азид реагируют с ферриформой этого переносчика, тогда как оксид углерода ингибирует ферроформу. В присутствии этих ингибиторов из-за блокирования

тока электронов не происходит фосфорелирования, сопряженного с генерированием протонного градиента в 3-м пункте.

Места действия этих ингибиторов были установлены с использованием метода перекреста. Бриттон Чане предложил изящный спектроскопический метод для определения соотношения окисленной и восстановленной форм каждого переносчика. В основе метода лежит тот факт, что окисленная и восстановленная формы каждого переносчика имеют свои характерные спектры поглощения. Добавление ингибитора переноса электронов изменяет соотношение этих форм. Например, добавление антимицина А вызывает переход переносчиков, локализованных в электронтранспортной цепи между NADH и цитохромом b, в более восстановленное состояние, а переносчиков между цитохромом c и O<sub>2</sub> в более окисленное состояние. Отсюда можно заключить, что антимицин А подавляет превращение цитохрома b в цитохром c<sub>i</sub>, потому что этот этап является пунктом перекреста.

**4. Синтез системы пузырьков, содержащих лишь один пункт выброса протонов.** Каждый из трех участков выброса протонов был воспроизведен в синтетических фосфолипидных пузырьках, содержащих АТФ-азу. Добавление к таким пузырькам окисляемого субстрата приводит к генерированию протондвижущей силы, достаточной для синтеза одной молекулы АТФ на пару электронов.

Таким образом при окислении молекулы NADH образуется 3 молекулы АТФ (так как протонный градиент образуется в трех точках, в каждой из которых переносится 2 протона), а при окислении FADH<sub>2</sub> образуется 2 молекулы АТФ.

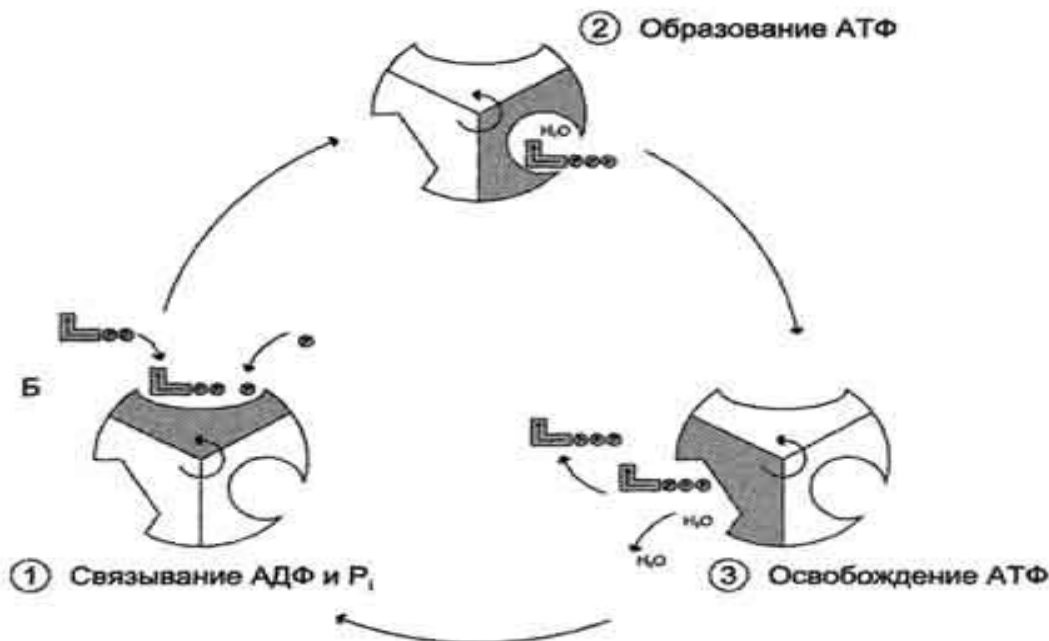
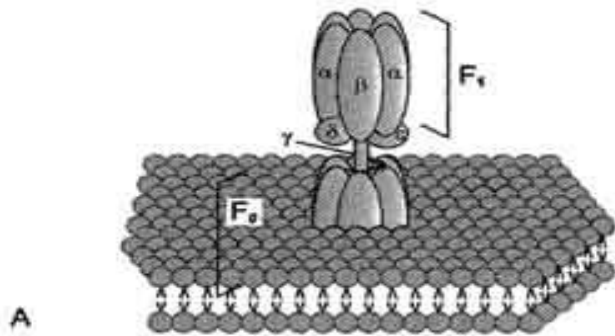
При исследованиях предполагалось, что перенос происходит с участием коферментов, переносящих протоны и электроны. Но таких коферментов всего два FMN и убихинон, но точки генерации протонного градиента совпадают только в случае FMN, во всех остальных точках генерации участвуют коферменты, переносящие только электроны. Это несоответствие было разрешено, когда появилось предположение, что перенос протонов осуществляет белковая часть электронтранспортной цепи. То есть белки электронтранспортной цепи в точках генерации протонного градиента работают как активные транспортеры протонов, но донором энергии является не реакция гидролиза АТФ, а энергия окислительно-восстановительной реакции.

Образовавшийся протонный градиент является источником энергии, но этот источник не очень удобен и стабилен во-первых потому что он привязан к мембране и не может использоваться в растворе и с растворенными ферментами, во-вторых он действительно сильно не стабилен, так как любое даже незначительное повреждение мембраны приводит к исчезновению градиента и, следовательно, источника энергии. Более удобной формой запасания энергии является АТФ. Энергия протонного градиента затрачивается на синтез АТФ, а

осуществляет его АТФ-синтетаза.

### Структура АТФ-синтетазы и механизм синтеза АТФ

Фермент, катализирующий этот процесс, выявляется на электронных микрофотографиях субмитохондриальных частиц в виде сферических выступов



**Рисунок 15: Структура и механизм действия АТФ-синтазы. А - F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> - комплексы АТФ-синтазы; Каталитический цикл синтеза АТФ включает 3 фазы, каждая из которых проходит поочерёдно в 3 активных центрах: 1 - связывание АДФ и НЗРО<sub>4</sub>; 2 - образование фосфоангидридной связи АТФ; 3 - освобождение конечного продукта. При каждом переносе протонов через канал F<sub>0</sub> в матрикс все 3 активных центра катализируют очередную фазу цикла.**

на  
поверхност  
и. В  
интактных  
митохондр  
иях такие  
выступы  
находятся  
на той  
стороне  
внутренней  
митохондр  
иальной  
мембраны,  
которая  
обращена к  
матриксу.  
В 1960 г,  
Эфраим  
Рэкер  
обнаружил,  
что эти  
округлые  
выступы  
(диаметром  
85 А)

можно  
удалить  
механическ  
им  
встряхиван  
ием.  
«Ободранн  
ые»  
субмитохон

дриальные частицы сохраняют способность к переносу электронов по своей цепи переноса электронов, но синтеза АТФ при этом более не происходит. Отделившиеся же выступы диаметром 85 А катализируют гидролиз АТФ. Но

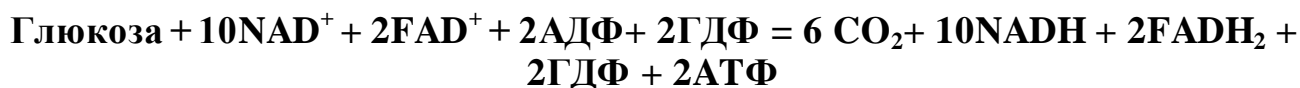
самым интересным в наблюдениях Рэкера оказался следующий факт: добавление таких АТФ-азных выступов к «ободанным» субмитохондриальным частицам восстанавливало их способность синтезировать АТФ. Эти выступления называют сопрягающим фактором 1, или  $F_1$ . Физиологическая роль  $F_1$  состоит в том, чтобы катализировать синтез АТФ. АТФ-азная активность, проявляемая солюбилированным  $F_1$  (в отсутствие протонного градиента), результат обращения присущей ему физиологической реакции.

$F_1$  -компонент, масса которого составляет 360 кДа и который содержит пять видов полипептидных цепей, представляет собою только часть АТФ-синтезирующего механизма митохондрий. Другой важный компонент этого комплекса -  $F_0$ , гидрофобный сегмент из четырех полипептидных цепей, «заякоренный» на внутренней митохондриальной мембране.  $F_0$  - это протонный канал комплекса. «Стебелек» между  $F_0$  и  $F_1$  включает некоторые другие белки. Один из них сообщает комплексу чувствительность к олигомицину, антибиотику, блокирующему синтез АТФ путем нарушения использования протонного градиента.

Ток протонов через канал  $F_0$  от цитоплазматической стороны мембраны к матриксу приводит к синтезу АТФ, осуществляемому  $F_1$ . Каким образом ток протонов оказывается сопряженным с синтезом АТФ? Как и в случае перекачки протонов, здесь возможны прямой и непрямой механизмы. Существует предположение, что ток протонов непосредственно действует на реакцию синтеза АТФ. Согласно этой схеме, фосфат активируется и одновременно взаимодействует с АДФ, образуя АТФ. Существует и другое предположение, а именно что сопряжение тока протонов с синтезом АТФ осуществляется путем конформационных изменений, передаваемых через ферментный комплекс. Субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  вместе образуют один каталитический центр, следовательно, в  $F_1$  субчастице образуется три каталитических центра, эта структура вращается, то есть к свободному каталитическому центру присоединяются АДФ и фосфат, затем происходит поворот и каталитический центр со связанными субстратами оказывается напротив потока протонов через канал, и происходит реакция фосфорилирования, за тем снова поворот и на положение напротив канала устанавливается следующий центр с связанными субстратами. То есть постоянно напротив канала находится каталитический центр со связанными субстратами, то есть процесс фосфорилирования идет постоянно и не задержек на связывание субстратов и высвобождение продуктов.

Таким образом, полное аэробное окисление глюкозы до углекислого газа выглядит следующим образом:





ГТФ образуется в печени.

Окисление одной молекулы NADH – 3 АТФ

Окисление одной молекулы FADH<sub>2</sub>– 2 АТФ

Перемножив и сложив полученные результаты получаем

**36 молекул АТФ, или 38 АТФ если реакция происходила в печени**

### **Механизмы использования протонного градиента**

В митохондриях эукариот основная часть энергии в виде протонного градиента переходит в энергию АТФ. Кроме того часть энергии протонного градиента используется для транспорта различных молекул в митохондрии и из них, с помощью симпортов и антипортов.

У аэробных бактерий также присутствуют аналогичные электронтранспортные цепи. Эти цепи располагаются в цитоплазматической мембране прокариотической клетки. Сгенерированный протонный градиент также в основном затрачивается на синтез АТФ, но кроме этого на поступление некоторых аминокислот и сахаров и других веществ в клетки, вращение бактериальных жгутиков и перенос электронов от NADH к NADPH.

### **Ингибиторы дыхательной цепи и окислительного фосфорелирования**

Значительная информация о дыхательной цепи была получена при использовании различных ингибиторов. Ингибиторы можно разделить на 3 группы: ингибиторы собственно дыхательной цепи, ингибиторы окислительного фосфорилирования и разобщители окислительного фосфорилирования.

Ингибиторы, блокирующие дыхательную цепь, по-видимому, действуют в трех местах. Одно из них ингибируется **барбитуратами** (например, амобарбиталом), а также антибиотиком **пиерицидином А** и **ротеноном**. Эти ингибиторы препятствуют окислению субстратов, которые поставляют восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь при участии NAD-зависимых дегидрогеназ,— примером таких субстратов является гидроксibuтират.

**Димеркапрол** и **антимидин А** ингибируют дыхательную цепь на участке между цитохромом *b* и цитохромом *c*. Классические яды — **H<sub>2</sub>S**, **окись углерода** и **цианид** — ингибируют цитохромоксидазу. **Карбоксин** и **ТТФА** (теноилтрифторацетон) специфически ингибируют переход восстановительных эквивалентов от сукцинатдегидрогеназы на кофермент Q, а малонат является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы.

Антибиотик **олигомицин** полностью блокирует окисление и фосфорилирование в интактных митохондриях. Однако если вместе с олигомицином добавить к системе разобщитель **динитрофенол**, то окисление

протекает, но без фосфорилирования. Это означает, что олигомицин не действует непосредственно на дыхательную цепь, а подавляет стадию фосфорилирования.

**Атрактилозид** ингибирует окислительное фосфорилирование, блокируя транспорт адениновых нуклеотидов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Он ингибирует транспорт АДФ в митохондрии и выход АТФ из митохондрий.

**Разобшители** нарушают систему сопряжения процессов окисления в дыхательной цепи и фосфорилирования. В этих условиях процесс дыхания происходит неконтролируемым образом, поскольку концентрации ADP или P, не являются лимитирующими. Чаще всего в качестве разобшителя используют 2,4-динитрофенол; аналогичное действие оказывает ряд других соединений: динитрокрезол, пентахлорфенол, СССР (карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон). Последний по эффективности в 100 раз превосходит динитрофенол. Разобшители либо нарушают целостность мембраны митохондрии, либо являются переносчиками протонов. Таким образом, протоны перемещаются не по каналу АТФ-синтазы, мимо него, соответственно энергия теряется в пустую, что-то типа «пробоя» конденсатора. Но существуют и физиологические разобшители, которые пропускают протоны в обход АТФ-синтазы, и переводят энергию протонного градиента в энергию тепла. Одним из ярких примеров является бурая жировая ткань. Бурая жировая ткань — это разновидность жировой ткани, в которой капля жира в клетках (адипоцитах) мало, но много митохондрий, что из-за большого количества цитохромов, придает им и всей ткани окраску. Бурая жировая ткань встречается у новорожденных в первые дни жизни вдоль позвоночника и на лопатках. У новорожденных практически отсутствует температурный баланс. Поэтому в первые дни жизни идет активное окисление жиров в бурой жировой ткани, процесс идет аэробно и запасается большое количество энергии в виде протонного градиента, которая за счет природных разобшителей в мембране переводится в тепло. Это позволяет выживать новорожденным в первые часы после рождения даже при очень низких температурах. Если не уверенности можно вспомнить о множестве подкидышей.

### Действие ионофоров

Соединения, о которых идет речь, получили свое название вследствие их способности специфически связывать определенные катионы и облегчать их транспорт через биологические мембраны. Эти свойства ионофоров обусловлены их липофильным характером, благодаря чему они проникают через липидные мембраны, в частности через митохондриальную мембрану.

Примером служит антибиотик **валиномицин**, который переносит  $K^+$  через митохондриальную мембрану и тем самым снижает мембранный потенциал между внутренней и наружной сторонами. **Нигерицин** также действует как

ионофор для ионов  $K^+$ , но в обмен на  $H^+$ ; в этом случае снижается градиент рН между сторонами мембраны. При одновременном присутствии валиномицина и нигерицина утрачиваются и мембранный потенциал, и градиент рН, что приводит к полному ингибированию фосфорилирования. Классические разобщители, такие, как динитрофенол, по сути дела являются протонными ионофорами.

Митохондрия — это уникальная органелла, одной из уникальных ее особенностей является структура внутренней мембраны митохондрии и систем транспорта через нее.

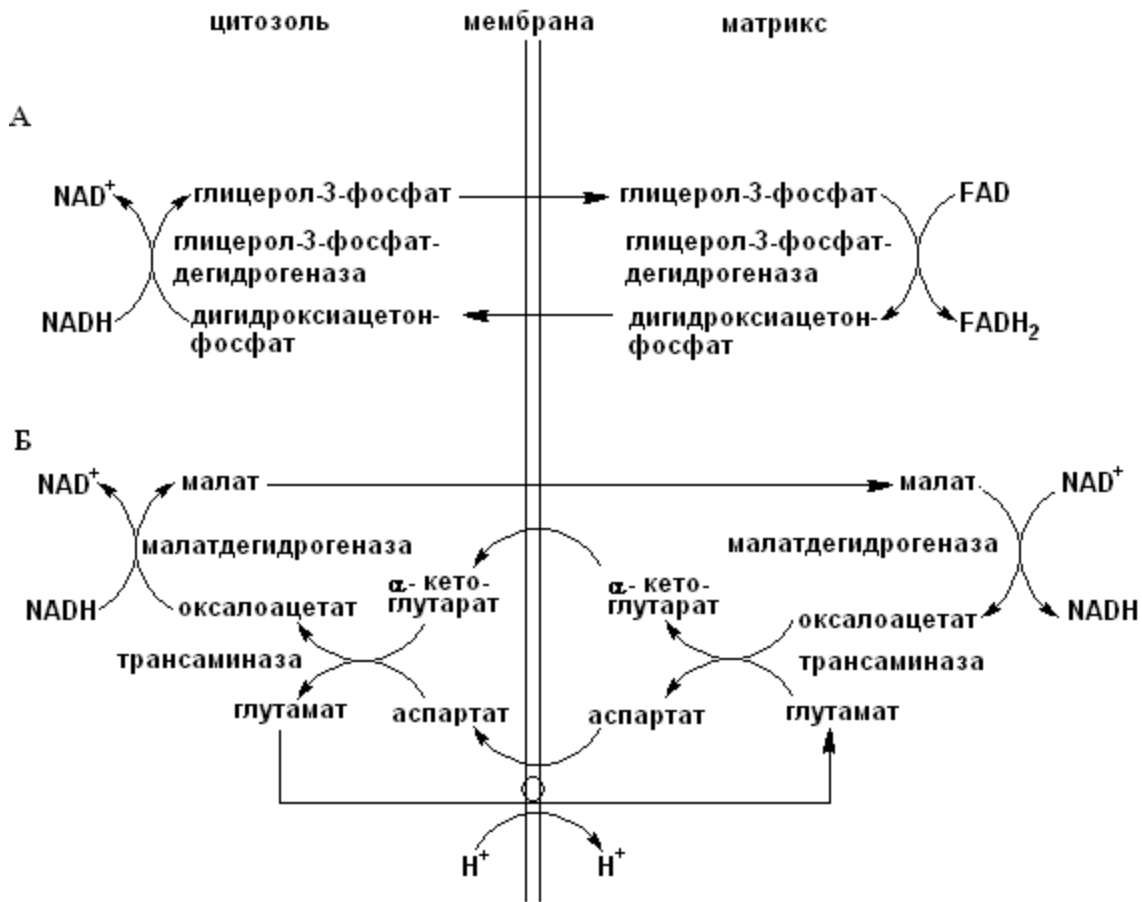
### **Митохондриальные транспортные системы**

Митохондрии имеют наружную мембрану, проницаемую для большинства метаболитов, и избирательно проницаемую внутреннюю мембрану со множеством складок (кrist), выступающих в сторону матрикса (внутреннего пространства митохондрии). Наружная мембрана может быть удалена путем обработки дигитонином; она характеризуется наличием моноаминоксидазы и некоторых других ферментов (например, ацил-СоА-синтетазы, глицерофосфатацилтрансферазы, моноацилглицерофосфатацилтрансферазы, фосфолипазы  $A_2$ ). В межмембранном пространстве находятся аденилаткиназа и креатинкиназа. Во внутренней мембране митохондрии не пор и канальных белков, кроме  $F_0$  субчастицы АТФ-синтазы, поэтому можно считать внутреннюю мембрану полностью непроницаемой, так как протоны самые маленькие ионы и их каналы самые узкие. Второй важной особенностью внутренней мембраны митохондрии — это наличие челночных механизмов.

### **Окисление немитохондриального NADH при участии субстратных челночных механизмов**

Челночные механизмы необходимы для разделения пулов равной степени необходимых молекул. Например NAD нужен и в окислительно-восстановительных реакциях, как в цитозоле, так и в матриксе митохондрии, соответственно, необходимо разделять эти пулы.

NADH не может проникать через митохондриальную мембрану; он непрерывно



**Рисунок 16: Схема реакций челночных механизмов. А - глицерол-3-фосфатный; Б - малатный**

образуется в цитозоле глицеральдегидфосфатдегидрогеназой, одним из ферментов гликолиза. Вместе с тем при аэробных условиях внемитохондриальный NADH не накапливается; он окисляется в дыхательной цепи митохондрий. Для объяснения этой ситуации предложено несколько механизмов. Они предполагают перенос восстановительных эквивалентов через митохондриальную мембрану при участии пар субстратов, связанных соответствующими дегидрогеназами. Существует два механизма переноса глицеролтрифосфатный и малатный. Первый — глицеролтрифосфатный: механизм следующий диоксиацетонфосфат восстанавливается до глицерол-3-фосфата с помощью глицерол-3-фосфат дегидрогеназы, точнее ее цитозольной изоформы, параллельно NADH окисляется до NAD<sup>+</sup>. Образовавшийся глицерол-3-фосфат транспортируется в матрикс митохондрии, где окисляется до дигироксиацетонфосфата под действием митохондриальной изоформы глицерол-3-фосфат дегидрогеназы, но при этом происходит восстановление не NAD<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup> до FADH<sub>2</sub>. То есть происходит потеря одной молекулы АТФ при переносе. Поэтому данный механизм, хотя и прост, но имеет существенный недостаток такой как потеря молекул АТФ. Существует второй или малатный

механизм. В этом случае происходит восстановление оксалоацетата до малата под действием малат дегидрогеназы, ее цитозольной изоформы, параллельно происходит окисления NADH до NAD<sup>+</sup>. Малат перемещается в матрикс митохондрии, где под действием митохондриальной малат дегидрогеназы (одного из ферментов в цикле трикарбоновых кислот) окисляется до оксалоацетата, параллельно восстанавливается NAD<sup>+</sup> до NADH. То есть потеря энергии не происходит. Но оксалоацетат один из важнейших промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, который пополняется с помощью анаплеротических реакций. Поэтому необходима надстройка. Оксалоацетат поступает в реакцию переаминирования с глутаматом под действием глутаминовой трансминазы, в результате образуются аспартат и  $\alpha$ -кетоглутарат. Аспартат при участии протонзависимого антипорта выходит в цитозоль где происходит обратное трансаминирование, и образуются оксалоацетат и глутамат. Малатный механизм несмотря на большую сложность позволяет сохранить энергию при переносе из цитозоля в матрикс митохондрии. Третий челночный механизм связан с транспортом активных ацильных групп и связан с разделением пулом коэнзимов А. Это обеспечивается карнитиновым механизмом, который будет рассмотрен позже.

### **Другие транспортные системы митохондрий**

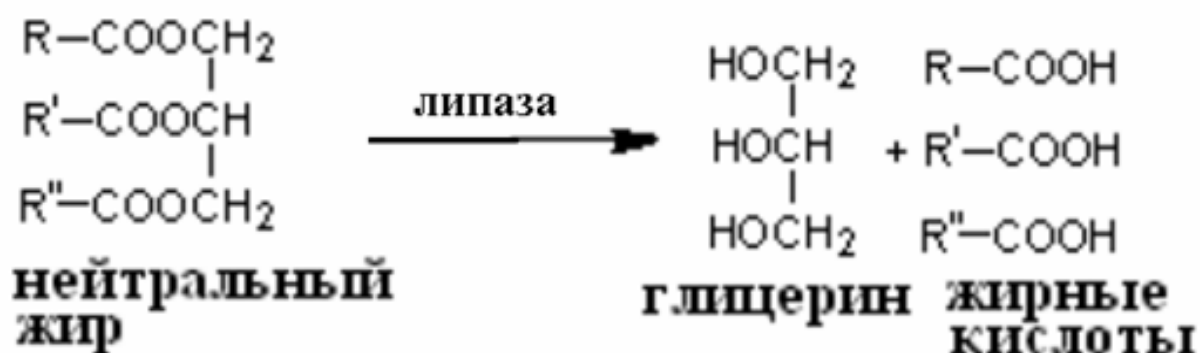
Внутренняя бислойная митохондриальная мембрана свободно проницаема для незаряженных небольших молекул, таких, как кислород, вода, CO<sub>2</sub> и NH<sub>3</sub>, а также для монокарбоновых кислот, таких, как 3-гидроксимасляная, ацетоуксусная и уксусная. Длинноцепочечные жирные кислоты транспортируются в митохондрии с помощью карнитиновой системы; имеется также специальный переносчик пирувата, функционирующий по принципу симпорта, использующего градиент протонов с наружной на внутреннюю поверхность митохондриальной мембраны. Транспорт дикарбоксилатных и трикарбоксилатных анионов, а также аминокислот осуществляется с помощью специальных систем переноса, облегчающих их прохождение через мембрану. Монокарбоновые кислоты легче проникают через мембрану вследствие меньшей степени их диссоциации; недиссоциированная форма кислоты имеет большую растворимость в липидах, и, как полагают, именно в этой форме монокарбоновые кислоты проходят через липидную мембрану.

Транспорт ди- и трикарбоксилатных анионов тесно связан с транспортом неорганического фосфата, который легко проникает через мембрану в форме ионов H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> в обмен на OH<sup>-</sup>. Малат переносится системой транспорта дикарбоксилатов в обмен на перенос неорганического фосфата в обратном направлении. Перенос цитрата, изоцитрата и цис-аконитата системой транспорта трикарбоновых кислот происходит в обмен на перенос малата в обратном направлении.  $\alpha$ -Кетоглутарат также поступает в обмен на малат. Таким образом, в результате работы обменных механизмов поддерживается

осмотическое равновесие. Следует отметить, что перенос цитрата через митохондриальную мембрану зависит не только от транспорта малата, но также и от транспорта неорганического фосфата. Переносчик адениновых нуклеотидов обменивает АТФ на АДФ, но не на АМФ. Жизненно важной задачей является обеспечение выхода АТР из митохондрий для последующего использования вне митохондрий и одновременного притока АДФ для образования АТФ внутри митохондрий. Ионы  $\text{Na}^+$  могут обмениваться на ионы  $\text{H}^+$  за счет градиента протонов. Полагают, что при активном транспорте ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь митохондрий происходит перенос единичного положительного заряда на каждый ион, что, возможно, связано с обменом  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Выход кальция из митохондрии облегчается при обмене его на  $\text{Na}^+$ .

### Окисление липидов

Липиды являются основным источником энергии у животных, основными энергетическими молекулами из липидов являются триацилглицериды.



**Рисунок 17:** Схема реакции гидролиза триацилглицеридов с участием липазы

Триацилглицериды накапливаются в виде капель в цитозоле. Процесс окисления начинается с гидролиза триацилглицеридов под действием ферментов липаз, в результате образуются глицерол и три молекулы жирных кислот. Скорость реакции регулируется за счет изменения активности фермента, за счет посттрансляционной модификации. Липаза фосфорилируется ферментом киназой, в результате липаза, модифицированная фосфатной группой, или фосфолипаза становится активной, и скорость гидролиза увеличивается. При отщеплении фосфатной группы происходит образование неактивной дефосфорилированной формы липазы.

Образовавшиеся при гидролизе глицерол и жирные кислоты слишком разные по структуре молекулы, следовательно, окисление этих молекул будет вестись по разным путям. Так как глицерол проще устроенная молекула, поэтому ее окисление идет по другому пути, другой путь окисления обеспечивает

окисление жирных кислот.

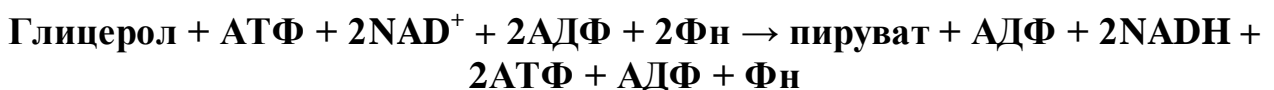
### Окисление глицерола

Глицерол активируется с помощью глицерол-киназы, которая обеспечивает перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на глицерол, в результате



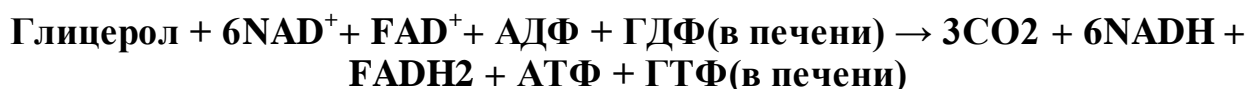
#### Рисунок 18: Схема реакций окисления глицерола

образуется глицерол-3-фосфат. Донором энергии также является молекула АТФ, за счет энергии гидролиза молекулы АТФ. Эта реакция обеспечивает однонаправленность процесса и приводит к образованию активной формы глицерола (глицерол-3-фосфат). Образовавшийся глицерол-3-фосфат окисляется под действием глицеролфосфатдегидрогеназы в результате образуется дигидроксиацетонфосфатата, параллельно происходит восстановление  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ . Образовавшийся дигидроацетонфосфат переходит в глицероальдегид-3-фосфат под действием триозофосфат-изомеразы, и образовавшийся глицероальдегид-3-фосфат поступает в оставшиеся реакции гликолиза и окисляется до пирувата. Если рассматривать реакции гликолиза с этапа глицероальдегид-3-фосфата до пирувата то дополнительными продуктами являются молекула  $\text{NADH}$  и 2 молекулы АТФ. Если учесть все параметры, то суммарная реакция окисления глицерола в анаэробных условиях будет выглядеть следующим образом:



Таким образом при анаэробном окислении глицерола образуется одна молекула АТФ.

Если учитывать аэробное окисление с учетом цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, то можно получить следующие результаты (для проверки можно использовать описанные ранее разделы):



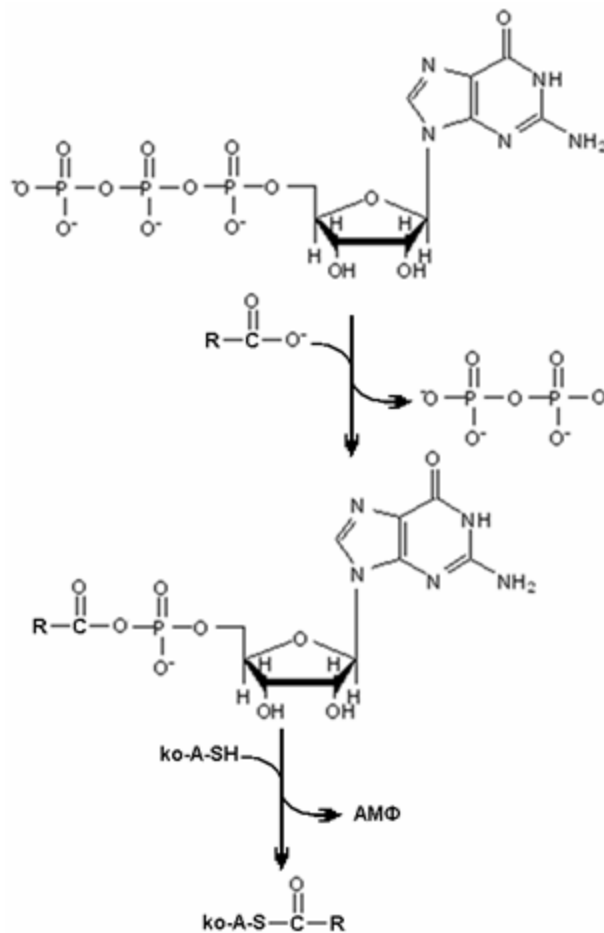
В результате окисления этих продуктов в дыхательной цепи получаем 21 АТФ и ГТФ в печени.

Жирные кислоты окисляются по другому пути.

## Окисление жирных кислот

В животных тканях имеют четное число атомов углерода, уже давно предполагалось, что в клетке жирные кислоты синтезируются и разрушаются путем присоединения или отщепления двухуглеродных фрагментов. Классические эксперименты Франца Кноопа, проведенные им в Германии в начале нашего века, подтвердили это предположение и позволили Кноопу заключить, что окисление жирных кислот происходит путем последовательного отщепления двухуглеродных фрагментов по  $\beta$ -схеме, т.е. каждый раз окисляется  $\beta$ -углеродный атом, в результате чего образуется  $\beta$ -кетокислота, которая затем подвергается расщеплению с образованием двухуглеродного фрагмента (по-видимому, уксусной кислоты) и жирной кислоты, содержащей на два атома углерода меньше, чем исходная кислота.

Однако в течение нескольких десятилетий попытки продемонстрировать окисление жирных кислот в бесклеточных экстрактах или в гомогенатах животных тканей оставались безрезультатными. Важный шаг в этой области был сделан, когда Альберт Ленинджер в США обнаружил, что добавление АТФ к гомогенатам печени восстанавливает их способность к окислению жирных кислот. Ленинджер предположил, что АТФ требуется для активации карбоксильной группы жирной кислоты в какой-то ферментативной реакции. Он также установил, что окисление жирных кислот в гомогенатах печени приводит к образованию активных двухуглеродных фрагментов, способных включаться в цикл лимонной кислоты. Позже Ленинджер показал, что окисление жирных кислот



**Рисунок 19: Схема реакций активации жирных кислот**

протекает в митохондриях клеток печени. Следующим важным шагом, способствовавшим быстрому выяснению отдельных ферментативных этапов процесса окисления жирных кислот, явились исследования Феодора Линена и



его сотрудников в Мюнхене.

Жирные кислоты активируются под действием ацил-СоА-синтаз, в результате образуется ацил-СоА или активная форма переноса ацильных групп. В ходе реакции ацильная группа атаковала молекулу АТФ, в результате образовывался промежуточный продукт с фосфоэфирной связью энергия которой достаточна для синтеза тиоэфирной связи. Промежуточным продуктом является ациладенилат, параллельно образуется пирофосфат (АТФ гидролизуется до АМФ и пирофосфата). Образовавшийся пирофосфат гидролизуется пирофосфатазой, что обеспечивает сдвиг реакции в сторону образования продукта или ацил-СоА. Образовавшийся ациладенилат является активной формой, что позволяет перенести ацильную группу на коэнзим А с образованием тиоэфирной связи, дополнительным донором энергии становится реакция гидролиза пирофосфата. Суммарную реакцию можно рассмотреть следующим образом:



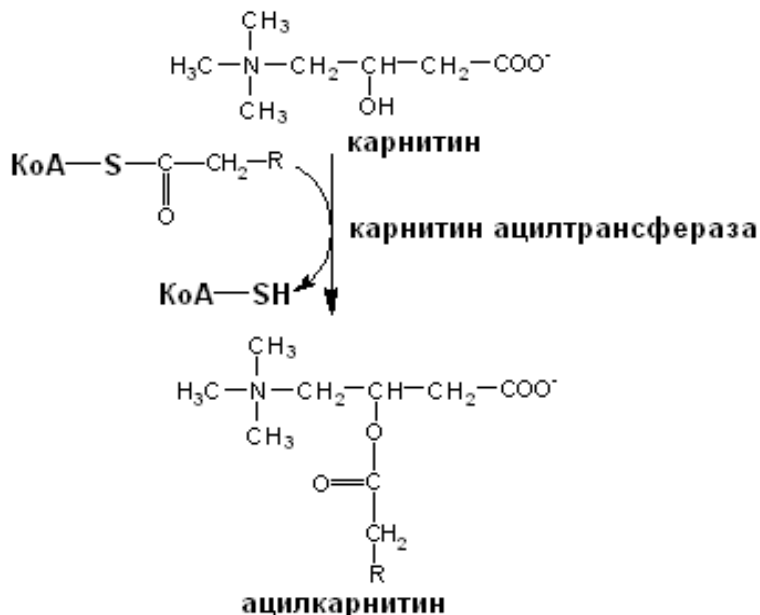
$$\Delta G_0' = -6,9 \text{ ккал/моль}$$

Суммарная реакция активации жирных кислот:



$$\Delta G_0' = -7,1 \text{ ккал/моль.}$$

В результате образуется активная форма жирной кислоты — ацил-СоА. Эта

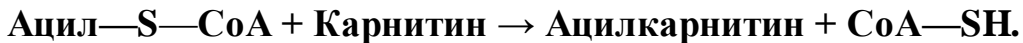


**Рисунок 20: Схема реакций карнитинового челночного механизма**

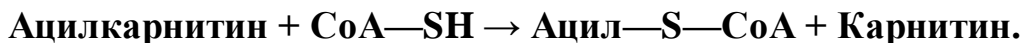
молекула образуется в цитозоле, но окисление жирных кислот происходит в матриксе митохондрий, куда данную активную форму нужно транспортировать. Но необходимо разделять пулы коэнзима А (в митохондриях он необходим для окисления жирных кислот и цикла трикарбоновых кислот, в цитозоле - для синтеза жирных кислот, триацилглицеридов, фосфолипидов и др.). Для этого используется карнитиновый челночный механизм (он упоминался

выше, но подробно рассматривается только сейчас [но это все равно челночный механизм]). На наружной поверхности этой внутренней мембраны имеется особый фермент — **карнитин-ацилтрансфераза I**, который катализирует реакцию, представляющую собой второй этап процесса переноса жирных

кислот в митохондрии:



Сложные эфиры карнитина и жирных кислот способны проходить через внутреннюю мембрану митохондрий и проникать в митохондриальный матрикс. Карнитин обнаружен почти во всех животных и растительных тканях. Известно, что некоторые низшие организмы, например «мучной червь» (*Tenebrio molitor*), не обладают способностью синтезировать карнитин и потому должны получать его с пищей. В организме человека и у других позвоночных карнитин образуется из лизина. В ходе взаимодействия ацильной группы ацил-СоА с карнитином образуется сложноэфирная связь в ацилкарнитине, энергия для образования этой связи поступает из гидролиза тиоэфирной связи в ацил-СоА. На последнем этапе процесса поступления жирных кислот в митохондрию остаток жирной кислоты (ацильная группа) переносится от карнитина на внутримитохондриальный СоА при участии фермента, носящего название **карнитин-ацилтрансферазы II**. Эта форма фермента локализуется на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны; здесь происходит регенерация СоА-производных жирных кислот, и отсюда они поступают в матрикс митохондрии:



В результате происходит перенос активной ацильной группы из цитозоля в матрикс митохондрии с разделением пулов коэнзима А. И как следствие в матриксе митохондрии оказывается остаток жирной кислоты, готовый к окислению.

### **β- окисление жирных кислот**

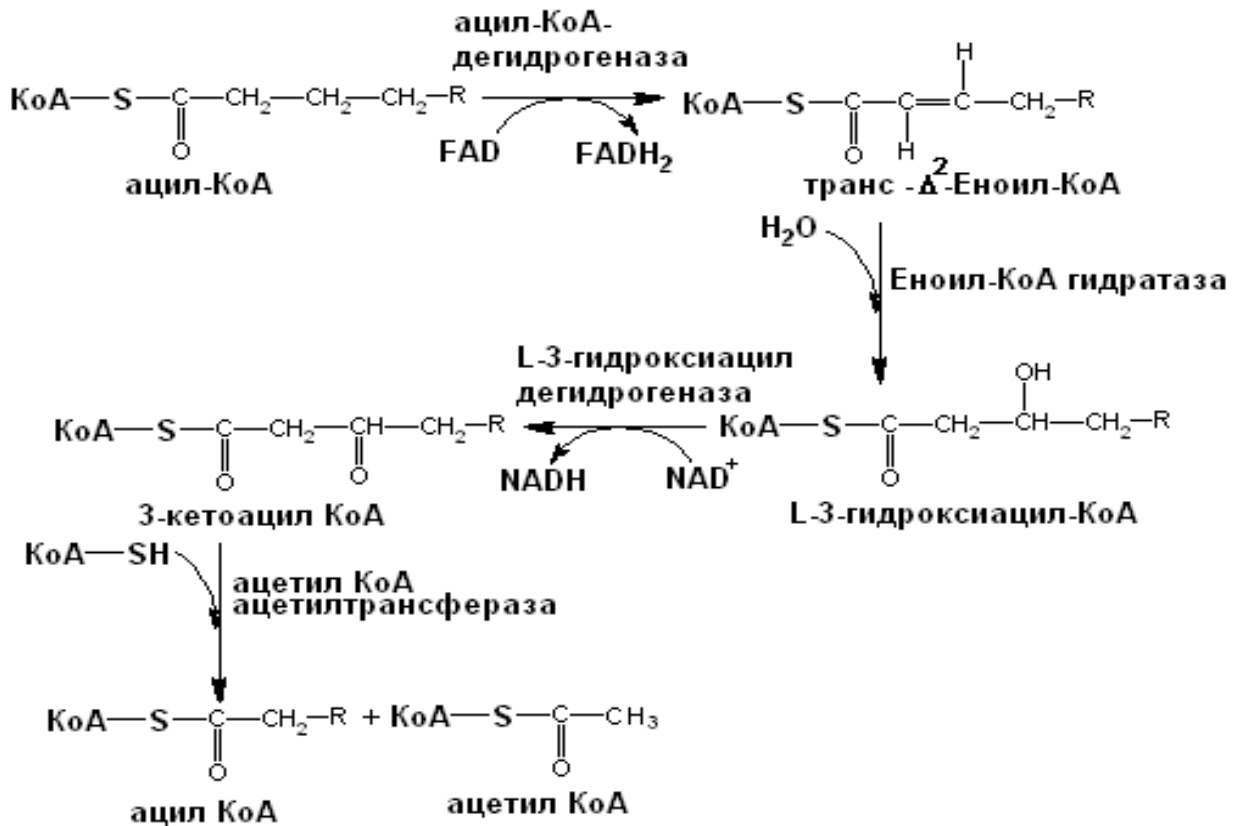
Процесс β-окисления жирных кислот происходит в матриксе митохондрии, и этот процесс циклический, как описано выше в каждом цикле происходило окисление по третьему или β атому, и отщеплялось двухуглеродное соединение в виде ацетил-СоА. Окисление насыщенной жирной кислоты является базовым циклом окисления жирных кислот. Данный цикл состоит из четырех реакций.

#### **а. Первая реакция дегидрирования**

Поступившие в митохондрии СоА-эфиры насыщенных жирных кислот подвергаются ферментативному дегидрированию по α- и β-атомам углерода (т. е. по атомам углерода в положениях 2 и 3), в результате чего в углеродной цепи образуется двойная связь. Продуктом этой реакции, катализируемой **ацил-СоА-дегидрогеназой** (обозначенной в приведенном ниже уравнении буквой E), является транс-Δ<sup>2</sup>-еноил-СоА. Простетической группой фермента служит FAD:



Символом  $\Delta^2$  условно обозначают положение двойной связи. Важно отметить,



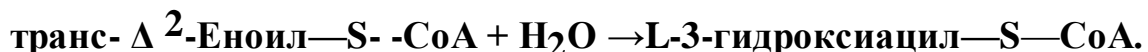
**Рисунок 21: Схема реакций цикла окисления насыщенной жирной кислоты**

что ненасыщенное соединение, образующееся в такой реакции, представляет собой транс-изомер; напомним в связи с этим, что двойные связи ненасыщенных жирных кислот, содержащихся в природных соединениях, имеют (реконфигурацию). Позже можно вернуться к обсуждению этого кажущегося противоречия. Атомы водорода, отщепляемые от CoA-эфиров жирных кислот, переносятся на FAD, т. е. на прочно связанную простетическую группу ацил-CoA-дегидрогеназы. Восстановленная форма ацил-CoA-дегидрогеназы передает затем пару электронов специфическому переносчику электронов, называемому электронпереносящим флавопротеином (ЭПФ), который в свою очередь передает ее убихинону, являющемуся составной частью митохондриальной дыхательной цепи. В результате последующего переноса этой пары электронов по дыхательной цепи к кислороду образуются две молекулы АТФ путем окислительного фосфорилирования АДФ.

### б. Реакция гидратации

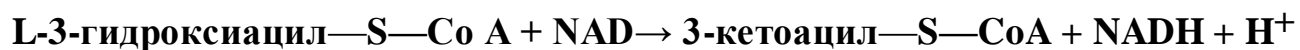
На втором этапе цикла окисления жирных кислот происходит гидратация двойной связи транс-  $\Delta^2$ -еноил-CoA, в результате чего образуется L-

стереоизомер  $\beta$ -гидрокси(или 3-гидрокси)ацил-СoА. Эта реакция катализируется  $\epsilon$ -ноил-СoА-гидратазой (которая была получена в кристаллической форме) за счет того присоединение происходило к транс-изомеру образовался L-стереоизомер, а это важно для последующих реакций, еще важным параметром является тот факт, что транс-изомер не соответствует природному цис-изомеру, все природные жирные кислоты являются цис-изомерами, это позволяет разделить жирные кислоты, входящие в состав липидов и жирные кислоты, направленные на окисление:



#### в. Вторая реакция дегидрирования

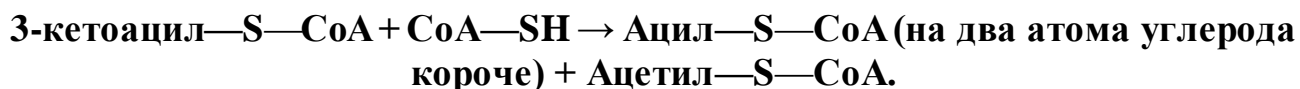
На третьем этапе цикла окисления жирных кислот L-3-гидроксиацил-СoА дегидрируется с образованием 3-кетоацил-СoА. Катализирует эту реакцию 5-гидроксиацил-СoА-дегидрогеназа; специфическим акцептором электронов служит  $\text{NAD}^+$ :



3-гидроксиацил-СoА-дегидрогеназа обладает абсолютной специфичностью в отношении L-стереоизомеров. Образовавшийся в этой реакции  $\text{NADH}$  передает затем восстановительные эквиваленты  $\text{NADH}$ -дегидрогеназе дыхательной цепи. На каждую пару электронов, переходящих по цепи переноса электронов от  $\text{NADH}$  к кислороду, образуются три молекулы АТФ, как это характерно вообще для всех  $\text{NAD}$ -зависимых реакций дегидрирования субстрата, протекающих в митохондриях.

#### г. Реакция тиолитического расщепления

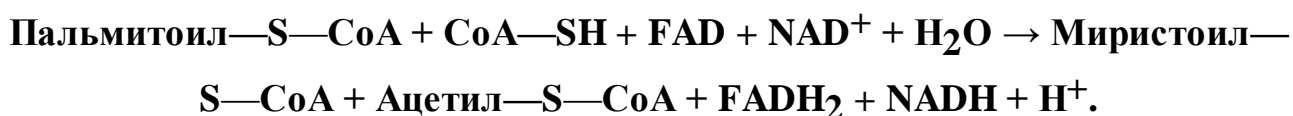
Последняя (четвертая) реакция цикла окисления жирных кислот катализируется **ацетил-СoА-ацетилтрансферазой** (более известной под названием **тиолаза**). На этом этапе 3-кетоацил-СoА взаимодействует со свободным  $\text{CoA-SH}$  и расщепляется с образованием, во-первых, двухуглеродного фрагмента, содержащего два концевых углеродных атома исходной жирной кислоты в виде ацетил-СoА, и, во-вторых, СoА-эфира жирной кислоты, укороченной теперь на два атома углерода:



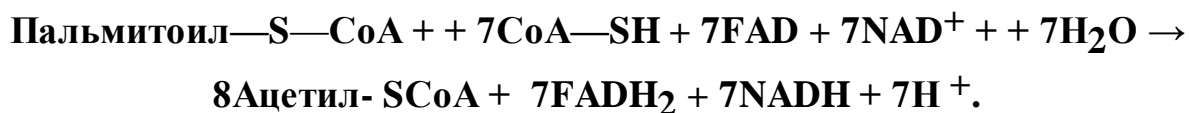
По аналогии с гидролизом эту реакцию называют тиолизом, потому что (3-кетоацил-СoА) расщепляется в результате его взаимодействия с тиоловой группой СoА.

Итак, закончено рассмотрение одного оборота цикла окисления жирных кислот. Вступивший в этот цикл СoА-эфир жирной кислоты с длинной цепью теряет одну молекулу ацетил-СoА и две пары атомов водорода; по завершении одного

оборота цикла цепь жирной кислоты становится на два атома углерода короче. Для CoA-эфира пальмитиновой кислоты (16 атомов углерода) суммарное уравнение одного оборота цикла окисления имеет следующий вид:



В результате отщепления одной молекулы ацетил-CoA от пальмитоил-CoA образуется CoA-эфир миристиновой кислоты, в молекуле которой содержится уже только 14 атомов углерода. Этот миристоил-CoA вступает в новый цикл окисления, состоящий из тех же четырех реакций; в этом цикле образуется еще одна молекула ацетил-CoA и CoA-эфир гомологичной 12-углеродной лауриновой кислоты - лауроил-CoA. Для окисления одной молекулы пальмитоил-CoA с образованием восьми молекул ацетил-CoA требуется семь таких циклов:



Каждая молекула NADH при окислении в электронтранспортной цепи дает 3 АТФ, FADH<sub>2</sub> - 2 АТФ.

Ацетил-коА поступает в ЦТК в результате образуется 3 NADH и FADH<sub>2</sub>, при окислении ацетил коА образуется 11АТФ и ГТФ (если окисление идет в печени).

**При окислении пальмитоила:**

8Ацетил-коА → 88 АТФ (плюс 8 GTP если процесс идет в печени);

7FADH<sub>2</sub> → 14 АТФ.

7NADH → 21 АТФ.

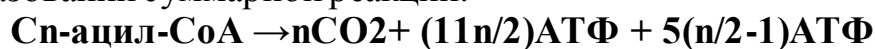
Можно просуммировать результаты и получить, что при окислении пальмитиновой кислоты получается 123 АТФ, минус 2 АТФ на активацию, соответственно выход — 121 молекула АТФ.

Если рассматривать каждую насыщенную жирную кислоту можно рассмотреть суммарную реакцию:



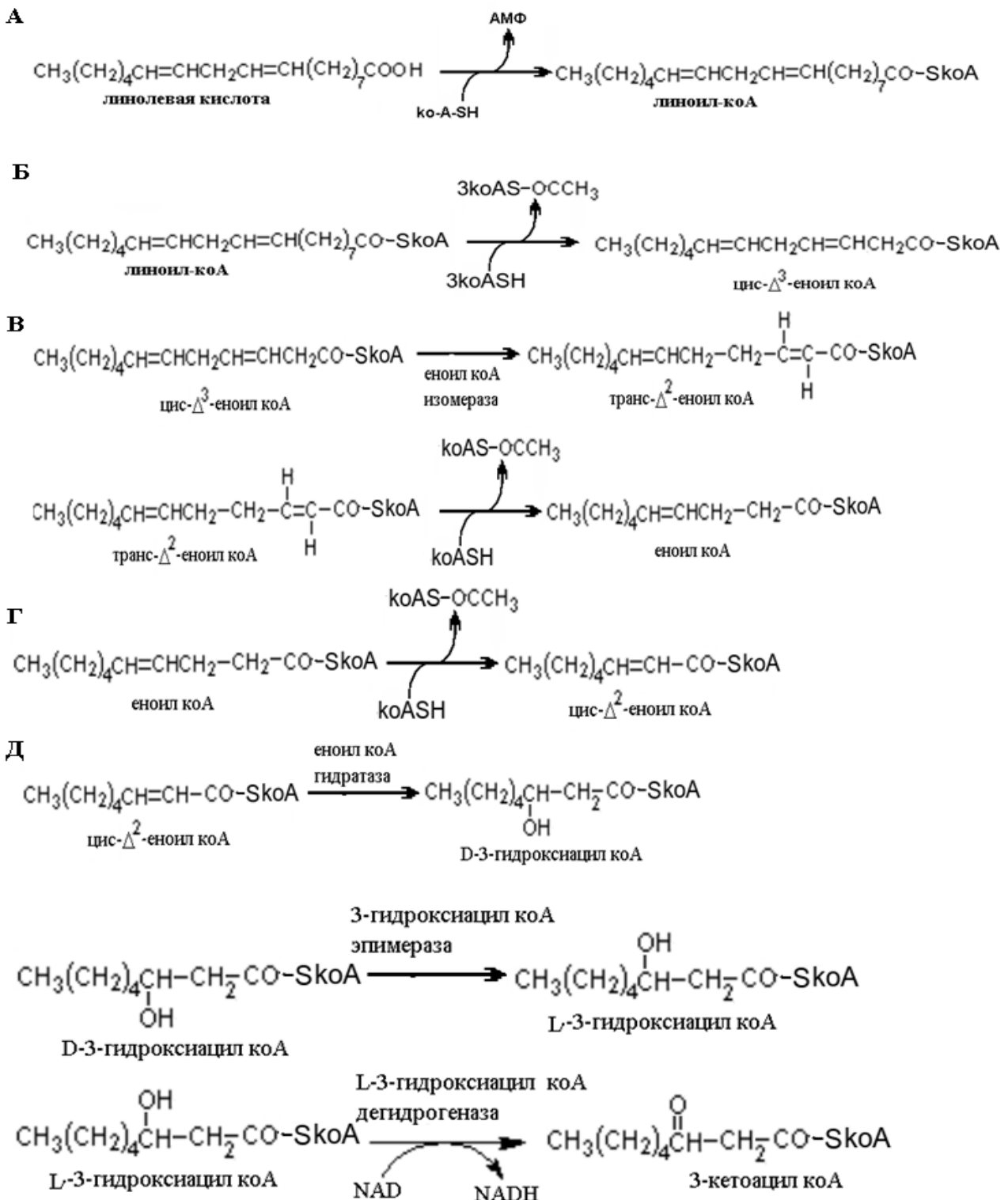
Ацетил-коА поступает в ЦТК в результате образуется 3 NADH и FADH<sub>2</sub>, при окислении ацетил коА образуется 11АТФ и ГТФ (если окисление идет в печени).

При преобразовании суммарной реакции:



Необходимо учитывать тот факт, что при активации жирной кислоты затрачивается две макроэргические связи, которые необходимо вычитать при подсчете общего энергетического выхода.

## Окисление ненасыщенных жирных кислот



**Рисунок 22:** Схема реакций окисления линоленовой кислоты. А - активация жирной кислоты, Б - окисление насыщенной части, В - окисление по первой двойной связи, Г - окисление насыщенной части, Д - окисление по второй двойной связи

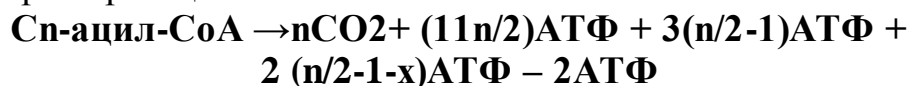
Но большинство жирных кислот является ненасыщенными или

полиненасыщенными жирными кислотами. В данном случае окисление имеет две особенности: во-первых, так как двойная связь уже присутствует в составе углеводородного скелета, и первая реакция окисления с параллельным восстановлением  $FAD^+$  до  $FADH_2$  отсутствует, поэтому в цикле при окислении по двойной связи отсутствует один из продуктов, а точнее  $FADH_2$ ; во-вторых, при окислении ненасыщенных жирных кислот необходимы еще два дополнительных фермента — изомеразы и эпимеразы. Лучше всего рассмотреть окисление ненасыщенных жирных кислот на примере линолевой кислоты это  $C_{18}:\Delta^{9;12}$ , то есть ненасыщенная жирная кислота, содержащая 18 атомов углерода и две двойные связи между 9 и 10, 12 и 13 атомами углерода. Формула представлена на рисунке. Активация линоленовой кислоты происходит также как и других жирных кислот и образуется линолил-СoА в цитоплазме, затем под действием карнитинового механизма происходит транспорт линолила в матрикс митохондрии, где происходит окисление. Насыщенная часть окисляется по описанному выше механизму и так проходит 3 цикла окисления образуется по три молекулы ацетил-СoА,  $NADH$  и  $FADH_2$ . В результате образуется 12-ти углеродная цис- $\Delta^3$ -еноильное производное, которое не может поступать в следующий цикл. Так как двойная связь уже присутствует, но не в том положении, поэтому ацил-СoА дегидрогеназа первый фермент цикла не работает. Данное соединение (цис- $\Delta^3$ -еноил-СoА) взаимодействует с первым дополнительным ферментом еноил-СoА изомеразой, в результате цис- $\Delta^3$ -ацил-СoА трансформируется в транс- $\Delta^2$ -еноил-СoА, а это уже продукт первой реакции цикла, который затем поступает в остальные реакции цикла. В результате данного видоизмененного цикла образуются ацетил-СoА,  $NADH$  и ацил-СoА, ставший еще на атома углерода короче. Образовавшийся ацил-СoА поступает в стандартный цикл окисления насыщенной жирной кислоты, в результате образуется ацетил-СoА,  $NADH$ ,  $FADH_2$  и цис- $\Delta^2$ -еноил-СoА. Необходимо поступление в следующий цикл, двойная связь уже есть, следовательно окисления с образованием  $FADH_2$  не нужно, кроме того связь находится между 2-м и 3-м атомами углерода, что соответствует правильному положению в случае первого промежуточного продукта цикла, но связь не транс-, а цис-положении. Второй фермент еноил-СoА гидратаза, не имеет полной специфичности, поэтому присоединение воды происходит как по цис, так и по транс-связи. Но если присоединение происходит по транс-изоформе, то образуется L-3-гидроксиацил-СoА (что соответствует нормальному циклу). Но в случае образовавшегося цис- $\Delta^2$ -еноил-СoА гидротация происходит по цис связи, и под действием еноил-СoА гидратазы образуется D-3-гидроксиацил-СoА. А вот L-3-гидроксиацил коА дегидрогеназа обладает высокой стереоспецифичностью и не распознает D форму, и D-3-гидроксиацил-СoА не может с ней прореагировать. Поэтому появляется второй дополнительный фермент 3-гидроксиацил-СoА эпимераза, превращающая D-3-гидроксиацил-СoА в L-3-гидроксиацил-СoА, который под действием L-3-гидроксиацил-СoА дегидрогеназы окисляется до 3-кетоацил-СoА. Дальше

происходит нормальное завершение цикла. Оставшаяся насыщенная часть окисляется теми же циклами что и при окислении насыщенной жирной кислоты.

Не зря говорят, что ненасыщенные жирные кислоты менее калорийны. В реальности это связано с тем, что при окислении жирной кислоты не образуется молекула  $FADH_2$  на каждую двойную связь, а, следовательно на 2 АТФ меньше.

Тогда суммарная реакция:



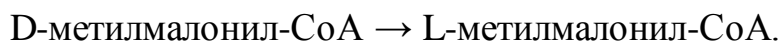
Где X – количество двойных связей.

### Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода

Хотя большая часть природных липидов содержит жирные кислоты с четным числом атомов углерода, в липидах многих растений и некоторых морских организмов в заметных количествах присутствуют жирные кислоты, молекула которых содержит нечетное число атомов углерода. Кроме того, у крупного рогатого скота и у других жвачных животных при переваривании углеводов в рубце образуются большие количества 3-углеродной пропионовой кислоты. Этот пропионат всасывается в кровь и окисляется в печени и других тканях. Жирные кислоты с длинной цепью, содержащей нечетное число атомов углерода, окисляются в той же последовательности реакций, что и кислоты с четным числом атомов, путем отщепления двухуглеродных фрагментов с карбоксильного конца. Однако в последнем цикле окисления субстратом служит ацил-CoA с пятью атомами углерода в ацильной группе. Его окисление и конечное расщепление дает **ацетил-CoA** и **пропионил-CoA**. Ацетил-CoA окисляется, конечно, через цикл лимонной кислоты. Что же касается пропионил-CoA, то он так же, как и пропионил-CoA из других источников, подвергается не совсем обычным ферментативным превращениям. Сначала пропионил-CoA карбоксилируется с образованием D-стереоизомера метилмалонил-CoA под действием биотинсодержащего фермента, называемого **пропионил-CoA—карбоксилазой**. В этой реакции роль предшественника новой карбоксильной группы играет бикарбонат, а источником энергии для образования новой ковалентной связи служит пирофосфатное расщепление АТФ до АМФ и пирофосфата:



Для реакции требуются также ионы  $Mg^{2+}$ . Продукт реакции D-метилмалонил-CoA изомеризуется под действием **метилмалонилэпимеразы** с образованием соответствующего L-стереоизомера:

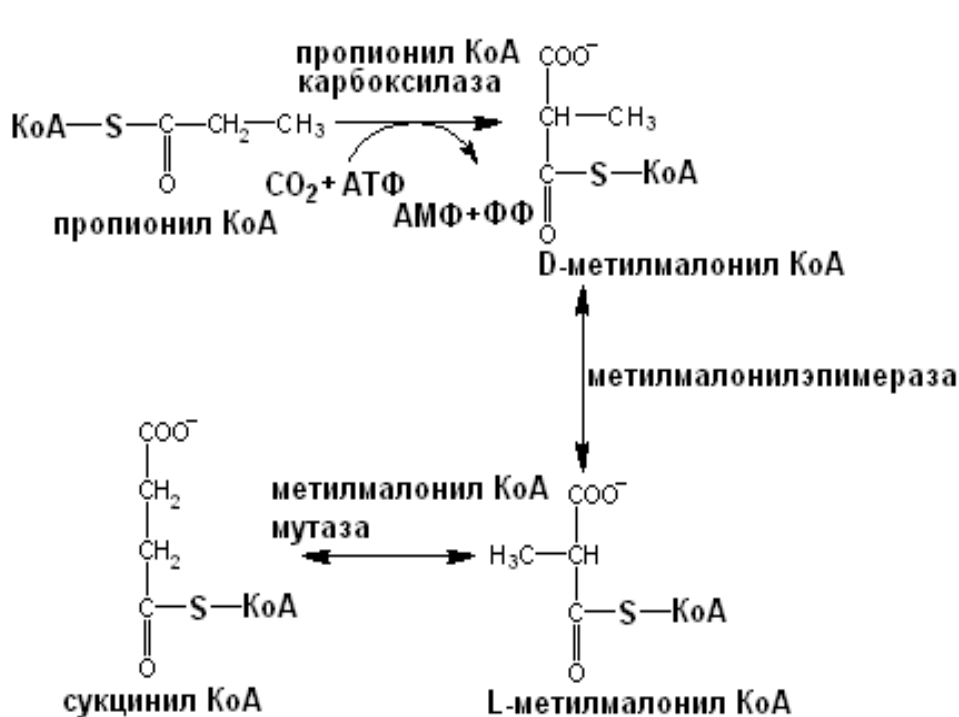




L-метилмалонил-CoA в результате совершенно необычной внутримолекулярной перестройки превращается затем в сукцинил-CoA эта внутримолекулярная перестройка катализируется метилмалонил-CoA — мутазой, которой в качестве кофермента требуется дезоксиаденозилкобаламин коферментная форма витамина B<sub>12</sub>, или кобаламина:

**L-метилмалонил-CoA → Сукцинил-CoA.**

Сукцинил-CoA через цикл лимонной кислоты в конечном счете превращается в оксалоацетат. Может показаться, что эта последовательность метаболических реакций, в ходе которых из пропионил-CoA образуется сукцинил-CoA,



слишком трудный путь для такого превращения. Вполне можно было бы ожидать образования сукцинил-CoA в результате одного единственного этапа присоединения CO<sub>2</sub> к 3-му углеродному атому

**Рисунок 23:** Схема реакций окисления пропионил-CoA пропионильной группы

пропионил-CoA. Клетки избрали другой путь. Сначала CO<sub>2</sub> присоединяется ко 2-му углеродному атому, да еще и с «неправильной» стороны. После того как эписимераза переместит CO<sub>2</sub> на «правильную» сторону 2-го углеродного атома с образованием L-метилмалонил-CoA, естественным представлялся бы перенос карбоксильной группы от 2-го углеродного атома пропионильной группы к 3-му. Вместо этого перемещается такая объемистая группа, как —CO—S—CoA, с участием сложного кофермента - дезоксиаденозилкобаламина. По-видимому, и здесь сложность объясняется тем, что для решения трудной химической задачи клетки избрали обходный путь. Весьма интересна реакция, катализируемая метилмалонил-CoA—мутазой. Она заключается в обмене группы —CO—S—Co A, присоединенной в исходной пропионильной группе метилмалонил-CoA ко 2-му углеродному атому, на атом водорода, связанный с 3-м атомом углерода. Это одна из тех сравнительно редких ферментативных реакций, в

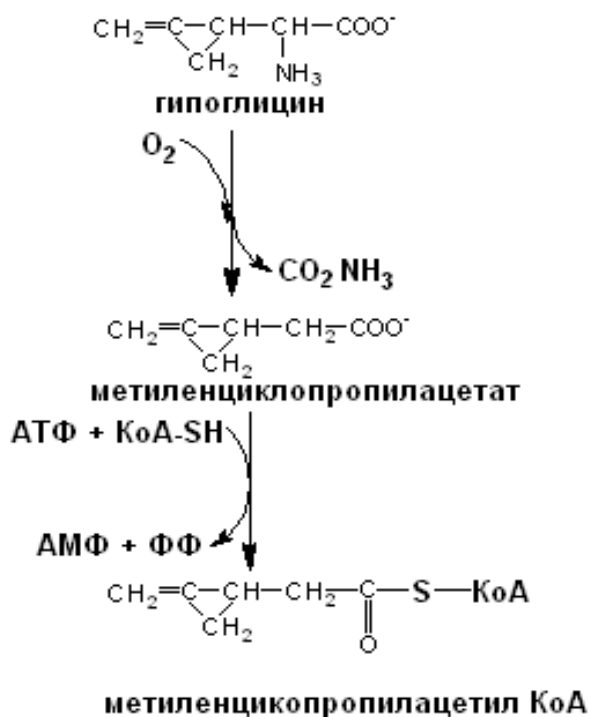
которых алкильная группа (свободная или замещенная) обменивается на атом водорода при соседнем атоме углерода. Все ферменты, катализирующие необычные реакции такого типа, содержат 5'-дезоксиаденозилкобаламин. Напомним в связи с этим, что при нарушении всасывания витамина В<sub>12</sub> в кишечнике развивается злокачественная анемия. Метилмалонил-СоА является промежуточным продуктом не только в процессе окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, но также и в процессе окислительного расщепления трех аминокислот - метионина, валина и изолейцина.

У человека известен ряд врожденных нарушений обмена метилмалонил-СоА, проявляющихся обычно в раннем детстве. Встречается, например, такой генетический дефект, как понижение или отсутствие активности метилмалонил-СоА—мутазы, при котором метилмалонил-СоА не может превращаться в сукцинил-СоА. Вследствие этого невозможны и все дальнейшие метаболические превращения метилмалоновой кислоты, так что она в больших количествах появляется в крови и в моче, что приводит к понижению рН крови. Это состояние носит название **метилмалонатной ацидемии**. У некоторых больных удается добиться улучшения, вводя им большие количества витамина В<sub>12</sub>. Это оказывается возможным в тех случаях, когда генетический дефект проявляется в снижении скорости ферментативной реакции, посредством которой витамин В<sub>12</sub> превращается в свою активную коферментную форму. Встречаются, однако, и такие больные с метилмалонатной эпидемией, у которых генетический дефект затрагивает белковую часть молекулы метилмалонил-СоА—мутазы. Таким больным введение витамина В<sub>12</sub> не приносит облегчения; болезнь в этих случаях может привести к смерти.

### **Регуляция и ингибирование окисления жирных кислот**

На Ямайке среди бедного населения встречается эндемическое заболевание, которое, как уже давно замечено, связано с употреблением в пищу незрелых плодов *Blighia sapida*. Это заболевание характеризуется гипогликемией (пониженным содержанием сахара в крови) и нарушением обмена жирных кислот. Токсическое действие плодов *Blighia sapida* обуславливается содержащимся в них гипоглицином, представляющим собой производное пропионовой кислоты. В процессе метаболизма гипоглицин превращается в вещество, которое в форме соответствующего СоА-эфира является мощным и специфическим ингибитором окисления СоА-эфиров жирных кислот с короткой цепью, главным образом бутироил-СоА. В присутствии этого вещества бутироил-СоА гидролизуеться с образованием свободного бутирата, который в избытке накапливается в крови и косвенным путем вызывает гипогликемию.

В печени дальнейшие превращения CoA-эфиров жирных кислот,



**Рисунок 24:** Схема реакций с гипоглицином

образовавшихся в цитозоле, могут пойти по одному из двух главных путей. Один из них представляет собой окисление этих эфиров в митохондриях, а другой превращение их в триацилглицеролы и фосфолипиды под действием ферментов цитозоля. Какой будет фактическая судьба CoA-эфиров длинноцепочечных жирных кислот, зависит от скорости их поступления в митохондрии. Трехэтапный транспортный процесс, посредством которого отщепившиеся от цитозольных CoA-эфиров жирных кислот ацильные группы проникают через мембрану в митохондриальный матрикс (после присоединения к карнитину), регулирует скорость всего процесса окисления жирных кислот. Если ацильные группы проникли в митохондрии, то они обязательно будут здесь окислены и, в конечном счете, полностью превратятся в ацетил-CoA.

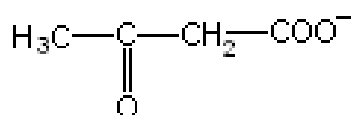
Карнитин-ацилтрансфераза I, катализирующая перенос ацильных групп от CoA-эфиров жирных кислот на карнитин на наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны, представляет собой аллостерический фермент. Этот фермент специфически ингибируется своим модулятором малонил-CoA метаболитом, о котором мы ранее не упоминали. Малонил-CoA является первым промежуточным продуктом протекающего в цитозоле процесса биосинтеза, в ходе которого из ацетил-CoA образуются жирные кислоты с длинной цепью. Концентрация малонил-CoA повышается, когда животное получает много углеводов, потому что избыток глюкозы, который не может быть окислен или отложен в запас в виде гликогена, превращается в цитозоле в триацилглицеролы и в этой форме сохраняется в организме. Таким образом, окисление жирных кислот «выключается» всякий раз, когда в печени имеется достаточно глюкозы, используемой в качестве топлива, и когда в ней за счет избытка глюкозы активно синтезируются триацилглицеролы. «Выключение» обеспечивается аллостерическим ингибированием процесса поступления ацильных групп в митохондрии.

Судьба ацетил-CoA, который образуется в митохондриях печени в результате окисления жирных кислот, может быть двойной: он может быть окислен до CO<sub>2</sub> через цикл лимонной кислоты или превращен в кетоновые тела и в этом случае направлен к периферическим тканям. Путь, по которому пойдет его

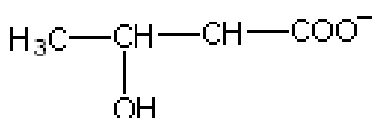
превращение, определяется главным образом наличием достаточного количества оксалоацетата, необходимого для того, чтобы ацетил-СоА мог вступить в цикл лимонной кислоты. При очень низкой концентрации оксалоацетата в цикл лимонной кислоты включается мало ацетил-СоА; такая ситуация благоприятствует образованию кетоновых тел. Обычно концентрация оксалоацетата в организме животного бывает низкой при голодании или при пониженном содержании углеводов в пище. В этом случае скорость окисления жирных кислот возрастает, и значительная часть образовавшегося ацетил-СоА превращается через гидроксиметилглутарил-СоА в свободный ацетоацетат и D-β-гидроксибутират, которые направляются к периферическим тканям. Здесь кетоновые тела служат главным клеточным топливом и окисляются через цикл лимонной кислоты до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

### Кетоновые тела

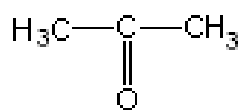
В клинике один из самых старых видов анализа — анализ крови, состав крови



**ацетоацетат**



**D-β-гидроксибутират**



**ацетон**

**Рисунок 25: Структурные формулы кетоновых тел**

исследуется давно и с появлением все более новых и точных методов, производился анализ крови, в результате выявляются новые составляющие. Так при новых анализах были выявлены три новых типа молекул: ацетоацетат, D-β-гидроксибутират, ацетон. Все три молекулы были в составе крови в следовых концентрациях, при чем всем известно, что ацетон — токсичное соединение. Вдыхание паров ацетона вызывает разрушение гемато-энцефалитического барьера и массовую гибель нервных клеток. Этим пользуются токсикоманы, так как массовая гибель клеток вызывает галлюцинации, но последовательное разрушение мозга закончится достаточно быстро. Концентрация данных молекул была настолько низкой и ацетон не относится к физиологическим

соединениям, и это позволило предположить, что данные соединения являются так сказать «ошибкой» метаболизма, то есть организм их производит случайным образом. Дополнительным доказательством для некоторых оказался тот факт, что у больных сахарным диабетом концентрация этих молекул в крови повышается до достаточно больших значений, при чем настолько, что запах ацетона ощущается окружающими.

Дальнейшие исследования показали, что кетоновые тела являются

нормальными составляющими плазмы крови. Это связано с типами метаболизма в разных органах и тканях. Как рассматривалось выше основными энергетическими молекулами являются или моносахариды (прежде всего глюкоза), или триацилглицериды. Глюкоза является главным топливом для мозга у лиц, получающих обильную сбалансированную пищу. То же самое касается и мышечных тканей. Так как мышечные ткани составляют около 50% массы тела плюс достаточно крупный и требующий большого количества энергии мозг. Поэтому концентрация глюкозы в крови достаточно велика. С другой стороны триацилглицериды окисляются в печени этот процесс называется липолизом. Но многие органы в частности сердечная мышца и надпочечники в норме, и головной мозг при голодании используют продукты окисления липидов. Основным продуктом окисления липидов является АТФ, но эта молекула не очень годится на роль транспортной молекулы из-за недостаточной стабильности и высокой метаболитической активности, тоже самое касается и промежуточных продуктов NADH и FADH<sub>2</sub>, пулы которых разделяются даже внутри клетки (с особенностями разделения пулов этих молекул описан на примере челночных механизмов выше), тоже самое касается ацетил-СоА, тоже промежуточного продукта липолиза, прежде всего из-за коэнзима А. При расщеплении ацетил-СоА образуются ацетат и коэнзим А. Ацетат может служить транспортной формой, но она может сильно влиять на свойства не только плазмы, но тканевой жидкости. Поэтому нужна менее активная кислота, которой является ацетоацетат, более слабая кислота, меньше влияющая на свойства растворов. Ацетоацетат — это транспортная форма продуктов липолиза, используемая организмом. Но кето группа в ацетоацетате влияет на состояние карбоксильной группы, в результате легко происходит декарбоксилирование, и образуется токсичный ацетон. Чтобы полезный продукт не превращался в токсичный, в клетках печени происходит восстановление ацетоацетата до D-β-гидроксибутирата с помощью D-β-гидроксибутират-дегидрогеназы, донором протонов и электронов является NADH. В данном случае достигается две вещи: первое — образование более стабильного и неактивного соединения, второе — идет дополнительный транспорт активных восстановительных эквивалентов (с NADH). В клетках происходит обратный процесс образуются NADH и ацетоацетат с помощью D-β-гидроксибутират-дегидрогеназы. Затем происходит активация ацетоацетата и образуется ацетоацетил-СоА под действием **сукцинилСоА-ацетоацетат-СоА-трансферазы** (тиофотрансферазы), фермента цикла трикарбоновых кислот, о котором говорилось выше, именно поэтому этот фермент присутствует во всех остальных тканях кроме печеночной, где необходимо переключение на транспортные формы продуктов липолиза, а печени процесс происходит полностью. Таким образом, так называемые «случайные» или «мусорные» молекулы оказываются важными для обмена веществ в организме. Осталось выяснить связь между повышением концентрации этих молекул и сахарным диабетом. Исследования показали, что связь достаточно проста. Дело в том, что

при сахарном диабете либо из-за уменьшения концентрации инсулина, либо из-за нарушения структуры рецепторов инсулина и как следствие нарушения связывания, инсулин перестает действовать на клетки, и поглощение глюкозы клетками нарушается. В результате глюкозы в крови много, а клетки при этом голодают, в результате происходит переход в глюкозы на триацилглицериды. В печени идет активный липолиз, и выработка транспортных форм. Из-за высоких потребностей, которые не удовлетворяются скоростями выработки D-β-гидроксибутирата, в кровь активно поступает ацетоацетат, который легко декарбоксилируется с образованием ацетона. Выработка ацетона и приводит к появлению характерного запаха изо рта больных.

### Окисление белков (аминокислот)

Белки составляют основную массу органического вещества в большинстве организмов. Как рассматривалось ранее белки — это основные соединения организма, обеспечивающие большинство функций организма. Настолько функционально значимый класс соединений не может использоваться как обычный источник энергии. Кроме того мономеры белков это аминокислоты, они слишком сложно синтезируются, и это требует больших затрат энергии, кроме того часть аминокислот не синтезируется организмом (являются незаменимыми), то есть за такими аминокислотами еще приходится побегать. Поэтому белки и аминокислоты не используются как источник энергии. Но нельзя сказать что в клетке белки стабильны и существуют все срок жизни. Но жизнь требует обновления, белки функционируют (все от работы или времени разрушается), поэтому необходимо постоянное обновление белков. У здорового взрослого человека обновление белков в норме составляет 1—2% от общего количества белков тела за сутки и связано преимущественно с деградацией мышечных белков до аминокислот. При этом примерно 75—80% высвободившихся аминокислот снова используется в синтезе белков, так как аминокислоты слишком ценный ресурс по причинам указанным выше. Оставшаяся часть метаболизируется до конечных продуктов азотистого обмена, удаляемых из организма, а также превращается в глюкозу, кетоны и (или) углекислый газ. Суточная деградация белков составляет 30—40 г. Поскольку примерно 16% массы белка приходится на азот, суточные потери азота составляют 5—7 г. Для поддержания нормального стационарного состояния взрослый организм нуждается в потреблении в среднем 30—60 г белка или эквивалентного количества аминокислот; при этом важное значение имеет качество белка. В данном случае речь идет о соответствии содержания незаменимых аминокислот в пищевом белке содержанию их в синтезируемых белках. Независимо от источника аминокислот все те аминокислоты, которые сразу же не входят в состав нового белка, быстро распадаются, т. е. **избыток аминокислот не запасается**. Следовательно, излишнее потребление аминокислот бесполезно: хотя избыточные аминокислоты подвергаются катаболизму с выделением энергии, эту функцию более эффективно выполняют

углеводы и липиды. Именно поэтому потребление избыточного количества белка не приводит к увеличению биомассы, а наоборот возможно нарушение обмена веществ и увеличение нагрузки на органы выделения, при чем выход энергии будет соответствовать затратам.

Для описания метаболизма азота в диетологии и медицине широко используется ряд терминов. **Азотистый баланс** означает разность между общим количеством азота, поступившим в организм человека (или другой организм), и общим количеством экскретируемого азота. Если азота поступает больше, чем экскретируется, говорят, что данный индивидуум имеет **положительный азотистый баланс**. Важные примеры: период роста и беременности; азотистый баланс положителен как у здорового растущего ребенка, так и у здоровой беременной женщины. Взрослый человек в норме находится в состоянии **азотистого равновесия**: потребление азота уравнивается его выделением в составе фекалий и мочи. В состоянии **отрицательного азотистого баланса** количество выделяемого азота превышает количество азота, потребляемого организмом. Важным примером служат больные, потребляющие недостаточное количество азота с пищей (например, при квашиор-коре); такое же состояние наблюдается при прогрессирующих формах рака и в ряде случаев в послеоперационном периоде.

Окисление аминокислот можно разделить на два основных направления окисление аминогруппы (это отдельный процесс, связанный с тем, что окисление азотсодержащих групп не связано со стандартными процессами окисления только углеродсодержащих соединений) и окисление углеродного скелета аминокислот (в данном случае все соответствует стандартным этапам аэробного окисления: первый этап — окисление до ацетил-СоА или промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, второй этап — окончательное окисление до углекислого газа в цикле трикарбоновых кислот, третий этап — окислительное фосфорелирование).

Так как окисление аминогруппы это можно сказать новый этап в изучении биохимии поэтому необходимо рассмотреть в первую очередь.

### Окисление аминогруппы

Окисление аминогруппы состоит из нескольких этапов, при чем в зависимости от организма последовательность и полнота всех этапов может сильно варьировать, но в общем окисление можно разделить на четыре этапа:

1. Переаминирование .
2. Окислительное дезаминирование.
3. Транспорт аммиака .
4. Утилизация аммиака.

Переаминирование и окислительное дезаминирование характерны для всех живых организмов. Одноклеточные прокариоты и эукариоты имеют только эти два этапа. Они выделяют аммиак в среду.

Третий этап (или транспорт аммиака) характерен для всех многоклеточных организмов, у которых жидкости транспортируют аммиак к органам выделения.

По типу утилизации аммиака выделяют три группы организмов.

Аммонийтеллические — выделяют аммиак в виде солей аммония, то есть детоксикация аммиака для этих организмов не характерна. К ним относятся растения, водные животные, в том числе костистые рыбы и амфибии.

Урикотеллические — в виде мочевой кислоты. Аммиак переводится в нетоксичное малорастворимое соединение. К этим организмам относят птиц, рептилий, насекомых и паукообразных.

Уреотеллические — в виде мочевины. К ним относят млекопитающих и хрящевых рыб.

Теперь необходимо рассмотреть каждый этап более подробно.

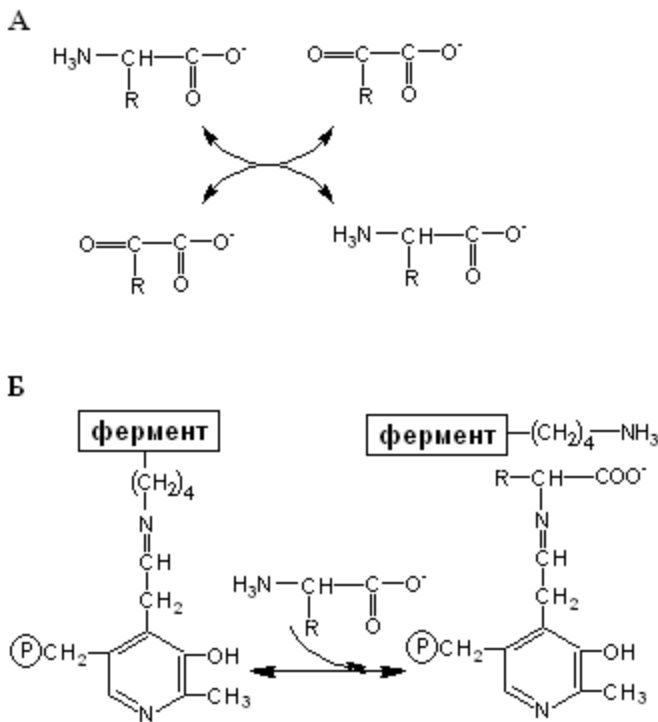
### **Переаминирование**

Переаминирование, катализируемое ферментами **трансаминазами (аминотрансферазами)**, представляет собой взаимопревращение пары аминокислот и пары кетокислот. Обычно это  $\alpha$ -аминокислоты и  $\alpha$ -кетокислоты.

Пиридоксальфосфат является обязательным компонентом активного центра трансаминаз и многих других ферментов, для которых субстратами служат аминокислоты. Во всех пиридоксальфосфатзависимых реакциях аминокислот начальной стадией является образование связанного с ферментом интермедиата — шиффова основания. Интермедиат стабилизируется путем взаимодействия с катионной областью активного центра; далее он перестраивается с освобождением кетокислоты и образованием связанного с ферментом пиридоксаминфосфата. Связанная аминокислота кофермента может затем взаимодействовать с кетокислотой, образуя аналогичное шиффово основание. Соответственно процесс происходит в обратном порядке. С пиридоксаминфосфатом взаимодействует кетокислота, и образовавшееся шиффово основание стабилизируется можно сказать в обратном порядке, в результате гидролиза аминокислота высвобождается, а пиридоксальфосфат восстанавливается для дальнейших реакций. Таким образом, в процессе переаминирования кофермент выполняет функцию переносчика аминокислотной группы. Поскольку константа равновесия для большинства реакций переаминирования близка к единице, переаминирование является легко обратимым процессом. Это позволяет трансаминазам функционировать и в процессах катаболизма, и в процессах биосинтеза аминокислот. Простетической группой всех аминотрансфераз служит пиридоксальфосфат (ПЛФ), являющийся производным пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>). В процессе трансаминарования происходит временное превращение пиридоксальфосфата в пиридоксаминфосфат (ПМФ).



ПЛФ-ферменты образуют с субстратами в качестве промежуточных продуктов



**Рисунок 26: А-схема реакции переаминирования; Б - схема реакции с пиридоксальфосфатом**

нековалентными связями. Это шиффово основание и шиффово основание между пиридоксальфосфатом и лизином активного центра представляют собой альдимины. В ходе катализа изменяется положение двойной связи в шиффовом основании между аминокислотой и пиридоксальфосфатом и образуется кетимин, который далее гидролизуется на пиридоксаминфосфат и  $\alpha$ -оксокислоту. Механизм реакции, предложен Эсмондом Снеллом и Александром Браунштейном. Лизин активного центра или другая основная группа, занимающая соответствующее положение, вероятно, облегчает превращение альдимина в кетимин, выполняя функцию улавливателя электронов. Вторая половина суммарной реакции состоит в обращении вышеуказанного пути. Вторая  $\alpha$ -оксокислота реагирует с комплексом фермент - пиридоксаминфосфат (Е-ПМФ), что приводит к образованию второй аминокислоты и регенерированию комплекса фермент - пиридоксальфосфат (Е-ПЛФ). Каталитическое многообразие ферментов, содержащих в качестве простетической группы пиридоксальфосфат, замечательно. Трансаминирование - как раз одно из многих превращений аминокислот, катализируемых этими ферментами. Другие реакции с участием  $\alpha$ -углеродного атома аминокислот представлены процессами декарбоксилирования, дезаминирования, рацемизации и альдольного расщепления. Все эти реакции имеют следующие общие черты. Во-первых, происходит образование шиффова основания между аминокислотным субстратом (аминный компонент) и пиридоксальфосфатом

шиффовы основания. В отсутствие субстрата альдегидная группа пиридоксальфосфата связана в шиффовом основании с  $\epsilon$ -аминогруппой специфического остатка лизина в активном центре. При добавлении аминокислотного субстрата образуется новое шиффово основание,  $\alpha$ -Аминогруппа аминокислотного субстрата замещает в активном центре  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группу лизина. Образующееся шиффово основание между аминокислотой и пиридоксальфосфатом остается прочно связанным с ферментом

(карбонильный компонент). Во-вторых, **ПЛФ** действует как улавливатель электронов, стабилизируя отрицательно заряженные промежуточные продукты каталитического процесса. Азот в кольце **ПЛФ** «притягивает» электроны из аминокислотного субстрата. Иными словами, **ПЛФ** представляет собою электрофильный катализатор. В-третьих, образовавшееся шиффово основание далее подвергается гидролизу.

В большинстве тканей млекопитающих имеются две трансаминазы: аланин-пируват—трансаминаза (**аланиновая трансаминаза**) и глутамат- $\alpha$ -кетоглутарат—трансаминаза (**глутамат-трансаминаза**). Они катализируют перенос аминогрупп от большинства аминокислот с образованием аланина (из пирувата) или глутамата (из  $\alpha$ -кетоглутарата). Две названные аминотрансферазы играют роль своего рода «воронок», направляющих аминогруппы от различных аминокислот в глутамат для последующего превращения в  $\text{NH}_4$ .

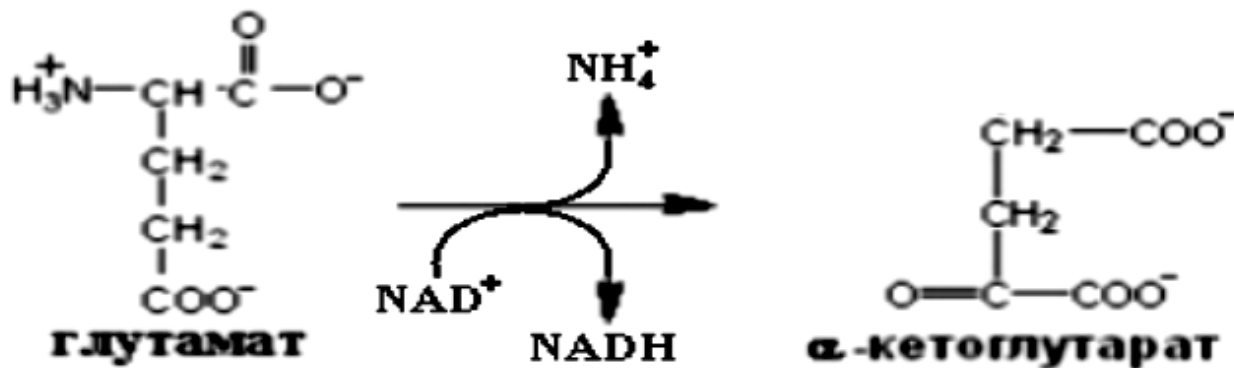
Каждая трансаминаза специфична к определенным парам амина- и кетокислот. Поскольку аланин может служить также субстратом глутаматтрансаминазы, аминный азот всех аминокислот, участвующих в переаминировании, может переходить в состав глутамата. Это очень важно, так как **L-глутамат является единственной аминокислотой в тканях млекопитающих, которая может с существенной скоростью подвергаться окислительному дезаминированию**. Таким образом, при образовании свободного аммиака из  $\alpha$ -аминогрупп аминокислот он переходит главным образом в состав  $\alpha$ -аминогруппы L-глутамата.

Большинство аминокислот (но не все) являются субстратами трансаминаз. Исключение составляют лизин, треонин и циклические иминокислоты пролин и гидроксипролин. Переаминирование не ограничено только  $\alpha$ -аминогруппами. Легко вступает в реакцию также  $\delta$ -аминогруппа орнитина (но не  $\varepsilon$ -аминогруппа лизина), при этом образуется глутамат - $\gamma$ -полуальдегид.

Этап переаминирования направлен на перенос аминогрупп со всех аминокислот (а точнее 20 белковых и множества небелковых), на пируват с образованием аланина и в конечном счете на  $\alpha$ -кетоглутарат с образованием глутамата. Таким образом все аминогруппы перемещаются на одну кетокислоту, и образуется только одна аминокислота (и это глутамат), которая затем и будет подвергаться следующему этапу или окислительному дезаминированию. То есть в место множества ферментов окислительного дезаминирования используется только один, что более выгодно, именно в этом переносе на один субстрат и заключается основной принцип и основная суть этапа переаминирования.

### **Окислительное дезаминирование**

Аминогруппы большинства аминокислот в конечном итоге путем переаминирования переносятся на  $\alpha$ -кетоглутарат с образованием глутамата. Освобождение азота аминогруппы глутамата в виде аммиака катализируется **L-глутаматдегидрогеназой** — ферментом с высокой активностью, широко



**Рисунок 27: Схема реакции окислительного дезаминирования** распространенным в тканях млекопитающих. Фермент позвоночных состоит из шести идентичных субъединиц, способных к дальнейшей полимеризации. Основная активность этого фермента наблюдается в печени, а точнее внутренняя митохондриальная мембрана митохондрий клеток печени. Этот фермент окисляет молекулу глутамата, в результате образуется молекула  $\alpha$ -кетоглутарата и ион аммония, параллельно происходит восстановление  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ . У животных данный фермент работает в направлении окисления и  $\text{NAD}$  является коферментом. У растений L-глутамат-дегидрогеназа может действовать в обоих направлениях. В случае окисления процесс сходен с таковым у животных. При восстановительном направлении ион аммония вводится в молекулу  $\alpha$ -кетоглутарата, в результате образуется глутамат, в качестве донора электронов используется  $\text{NADPH}$ , который окисляется до  $\text{NADP}^+$ . Более подробно данная проблема будет рассмотрена ниже в разделе «Анаболизм».

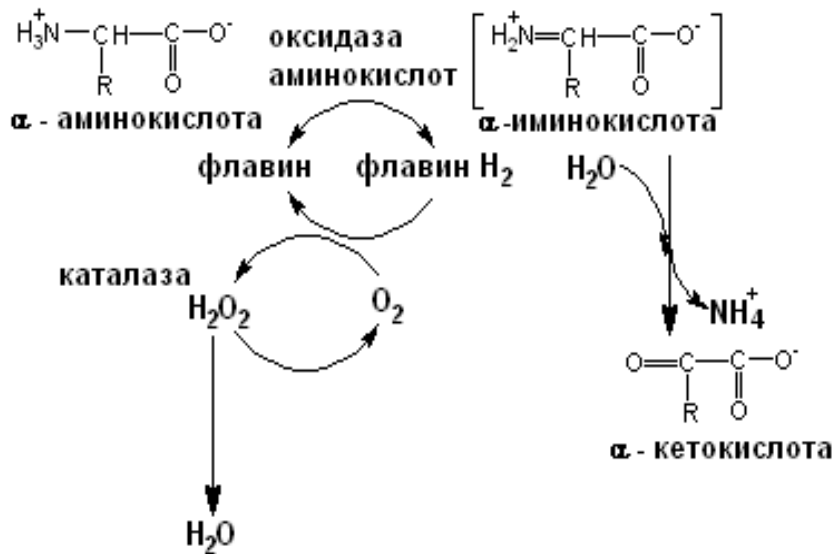
Глутаматдегидрогеназа печени является регуляторным ферментом; ее активность ингибируется аллостерическими эффектами, такими, как АТФ, ГТФ и  $\text{NADH}$ , и стимулируется АДФ и ГДФ. На активность глутаматдегидрогеназы влияют некоторые гормоны.

Помимо основного процесса окислительного дезаминирования с помощью L-глутамат-дегидрогеназы есть еще дополнительные процессы дезаминирования — это активность деаминаз и прямое дезаминирование серина и треонина.

#### **Активно сть оксидаз аминокислот**

В печени и почках млекопитающих имеются оксидазы L- и -аминокислот; эти оксидазы имеются и у многих других животных и микроорганизмов. Однако не вполне ясно, какую физиологическую функцию выполняют оксидазы L- и D-аминокислот в тканях млекопитающих.

Оксидазы аминокислот являются **автоокисляемыми флавопротеинами**, т.е. восстановленные FMN или FAD окисляются непосредственно молекулярным кислородом (без участия цитохромов и других переносчиков электронов) с образованием перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Токсичный продукт  $H_2O_2$  далее расщепляется на  $O_2$  и  $H_2O$  каталазой,



**Рисунок 28:** Схема реакций с участием оксидаз аминокислот

широко распространенной в тканях (особенно много ее в печени).

В отсутствие каталазы образующаяся α-кетокислота может декарбоксилироваться неферментативным путем перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) с образованием карбоновой кислоты, имеющей на один атом углерода меньше. Впрочем, представляется маловероятным, чтобы такое декарбоксилирование играло какую-то роль в интактных тканях человека.

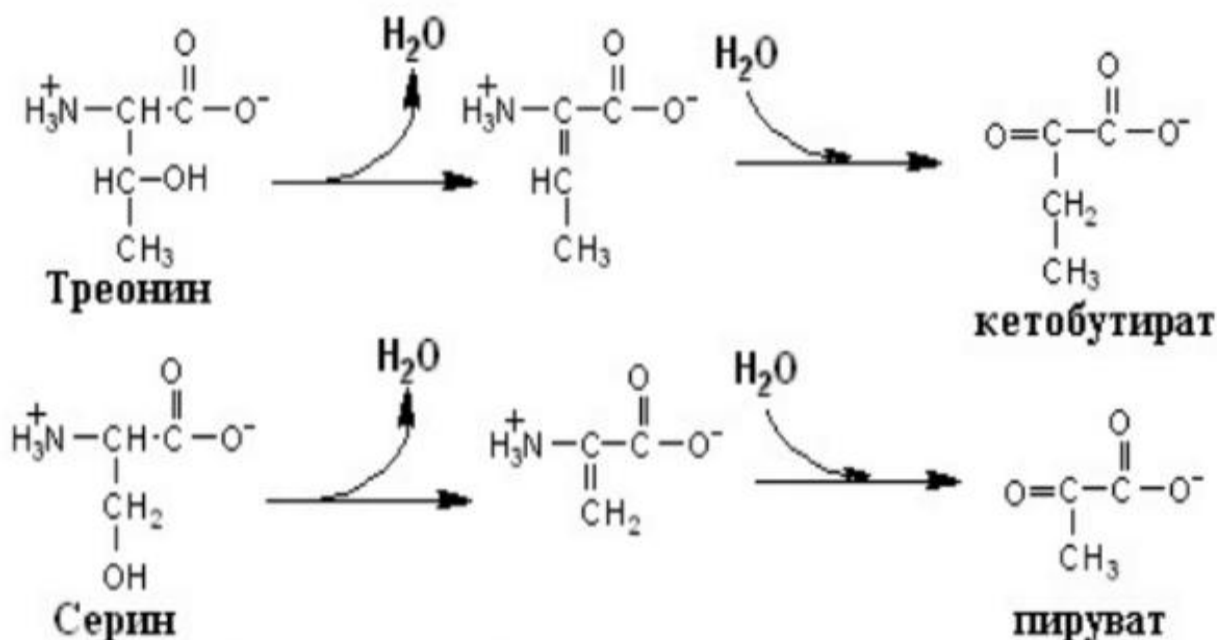
В реакциях, катализируемых оксидазами аминокислот, сначала происходит дегидрогенирование при участии флавопротеиновой оксидазы, приводящее к образованию α-иминокислоты. Последняя неферментативно присоединяет молекулу воды и превращается в соответствующую α-кетокислоту с потерей α-аминного азота в виде иона аммония.

Оксидаза L-аминокислот, являющаяся FMN-содержащим флавопротеином, у большинства млекопитающих находится только в почках и печени. Ее активность весьма низка, а на глицин, L-изомеры дикарбоновых аминокислот и β-гидрокси-α-аминокислот она вообще не действует. Едва ли этот фермент играет существенную роль в катаболизме аминокислот у млекопитающих.

Оксидаза D-аминокислот у млекопитающих представляет собой FAD-содержащий флавопротеин, обладающий широкой субстратной специфичностью, фермент обнаружен в печени и почках большинства млекопитающих. D-аспарагин и D-глутамин не окисляются этим ферментом, а глицин и D-изомеры кислых и основных аминокислот являются плохими субстратами. Физиологическое значение этого фермента у млекопитающих неизвестно.

## Прямое дезаминирование серина и треонина

$\alpha$ -Аминогруппы серина и треонина могут непосредственно превращаться в



**Рисунок 29:** Схема реакций прямого дезаминирования серина и треонина

$\text{NH}_4^+$ , потому что в боковой цепи каждой из этих аминокислот имеется гидроксильная группа. Эти реакции прямого дезаминирования катализируются **серин-дегидратазой** и **треонин-дегидратазой**, простетической группой которых служит перидоксальфосфат. Указанные ферменты названы дегидратазами, они относятся к классу лиаз, поскольку в катализируемых ими реакциях дезаминированию предшествует дегидратация. Серин теряет атом водорода при  $\alpha$ -углероде и гидроксильную группу при  $\beta$ -углероде с образованием аминокрлата. Это нестойкое соединение реагирует с  $\text{H}_2\text{O}$ , давая пируват и  $\text{NH}_4^+$ .

## Транспорт аммиака

Аммиак является токсичным соединением. Механизм токсического действия не совсем ясен.

Симптомами **аммиачного отравления** являются своеобразный тремор, нечленораздельная речь, затуманивание зрения и, в тяжелых случаях, коматозное состояние и летальный исход. Наиболее опасен аммиак для организмов в развитой центральной нервной системой. Это связано с воздействием аммиака на нервную систему, кстати на это указывают симптомы. Поэтому транспортная форма аммиака является очень важной. В случае аммонийтеллических организмов влияние аммония не очень велика или из-за

отсутствия нервной системы как у растений, или из-за быстрого удаления аммиака в водную среду как у рыб и амфибий, или из-за слабого развития нервной системы и быстрого удаления аммиака, как у высших водных беспозвоночных вроде моллюсков и ракообразных. Из всего этого можно заключить, что аммонийтеллические организмы не имеют специфической транспортной формы аммиака, транспорт идет в виде ионов аммония. У урикотеллических и уреотеллических организмов должна быть безопасная транспортная форма аммиака. У млекопитающих проще всего осуществлять транспорт в виде глутамата. Глутамат — это безопасная аминокислота, которая образуется в результате переаминирования, затем транспортируется в клетки печени, и уже там происходит окислительное дезаминирование, и затем дезактивация аммиака. Но активность оксидаз-аминокислот, дегидратаз, непосредственно дезаминирующих серин и треонин, а также активность микрофлоры кишечника приводят к поступлению аммиака в кровеносное русло. Для предотвращения поступления свободного аммония в тканевые жидкости и кровь необходима еще одна транспортная форма. Второй транспортной формой является глутамин. Образование глутамина катализируется **глутаминсинтетазой** — митохондриальным ферментом, присутствующим в больших количествах в ткани почек. Синтез амидной связи глутамина осуществляется за счет гидролиза одного эквивалента АТФ с образованием АДФ и Фн. Равновесие этой реакции смещено в направлении синтеза глутамина. Глутамин как транспортная форма удобен с двух сторон. Во-первых транспорт двух молекул вместо одной, при чем вторая аминогруппа поступает не из аминокислоты при переаминировании, а из свободного иона аммония, что важно для удаления свободного аммиака. Во-вторых при расщеплении в печени образовывался глутамат, легко подвергающийся окислительному дезаминированию. Освобождение амидного азота глутамина в виде аммиака происходит путем гидролитического отщепления аммиака, катализируемого **глутаминазой**. Глутаминазная реакция в отличие от реакции, катализируемой глутаминсинтетазой, протекает без участия адениновых нуклеотидов и сильно сдвинута в сторону образования глутамата; в направлении синтеза глутамина она не осуществляется. Третья транспортная форма аммиака — аспартат. С одной стороны это не совсем логично, так как аспартат является банальным субстратом переаминирования и не может быть субстратом для окислительного дезаминирования. С другой стороны аспартат является субстратом в цикле мочевины, то есть в процессе утилизации аммиака, соответственно аммиак может поступать и в этой форме. Наконец последняя транспортная форма аммиака — аспарагин. Образование аспарагина осуществляется аспарагин синтаза, амидной связи аспарагина осуществляется за счет гидролиза одного эквивалента АТФ с образованием АДФ и Фн. Аспарагин с одной стороны переносит аминогруппу используемую в цикле мочевины из аспартата, с другой происходит присоединение иона аммония как в случае синтеза глутамина. Расщепление аспарагина происходит под действием аспарагиназы.

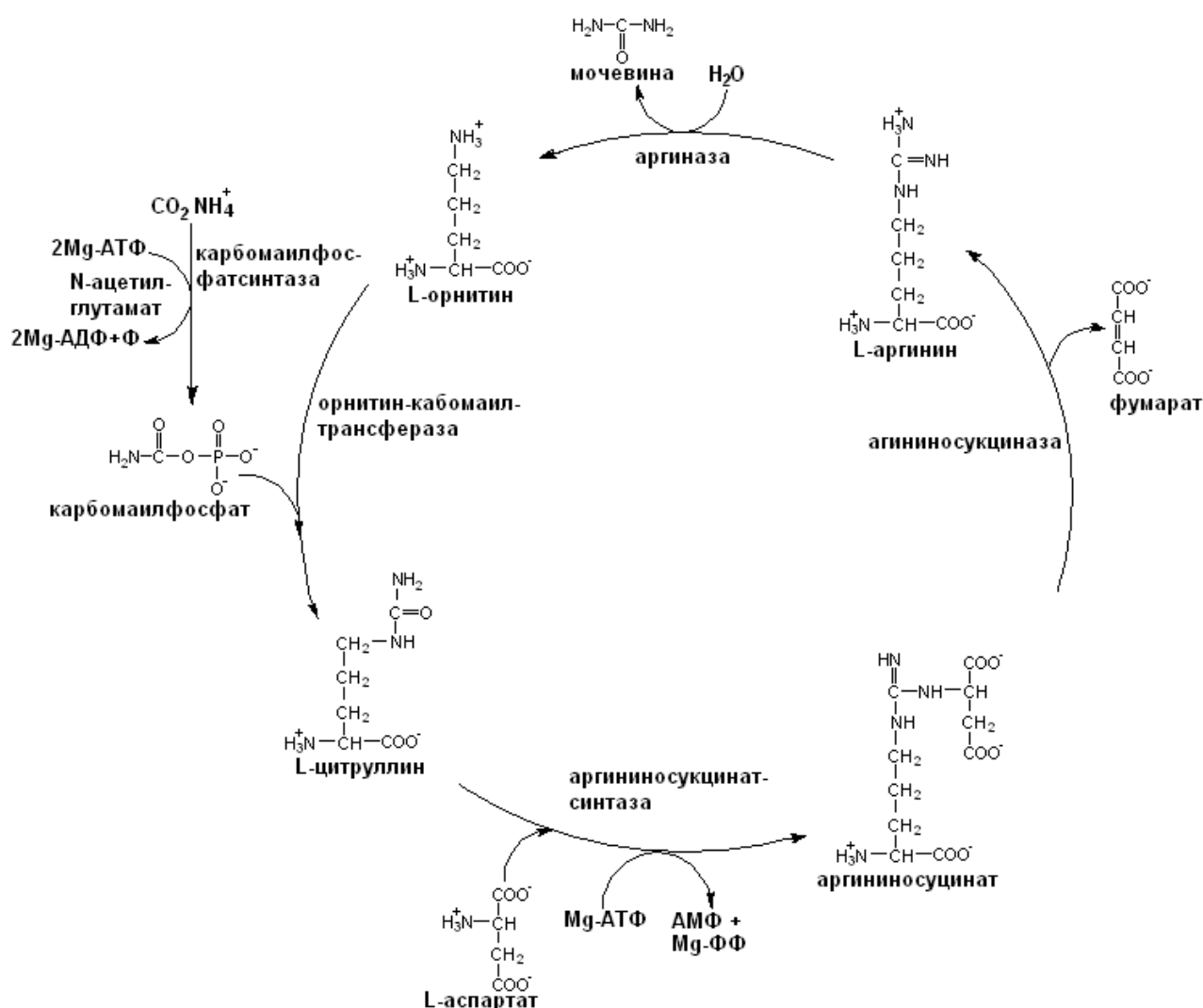
Реакция, аналогичная той, которая катализируется глутаминазой, происходит при участии **L-аспарагиназы**, присутствующей в тканях животных, растениях и микроорганизмах. Исследовалась возможность применения аспарагиназы и глутаминазы в качестве противоопухолевых агентов, поскольку некоторые опухоли проявляют аномально высокую потребность в глутамине и аспарагине.

### Биосинтез мочевины

У млекопитающих мочевины синтезируется в цикле мочевины. Эту последовательность реакций постулировали Ганс Кребс и Курт Гензеляйт в 1932 г. за пять лет до открытия цикла трикарбоновых кислот. Цикл мочевины, в сущности, первый обнаруженный циклический метаболический путь. Один из атомов азота мочевины, синтезируемой в этом цикле, происходит из аммиака, другой из аспартата. Углеродный атом мочевины происходит из  $\text{CO}_2$ . Переносчиком этих атомов углерода и азота в цикле мочевины служит орнитин. Реакции биосинтеза мочевины и соответствующие интермедиаты представлены на рисунке. В образовании 1 моля мочевины участвуют 1 моль ионов аммония, 1 моль двуокиси углерода (активируемой  $\text{Mg}^{2+}$  и АТФ) и 1 моль  $\alpha$ -аминного азота аспартата. В ходе синтеза потребляются 3 моля АТФ (2 из них превращаются в АДФ и Фн а третий в АМФ и ФФ), в нем последовательно участвуют пять ферментов, катализирующих реакции 1—5. Из 6 аминокислот, вовлекаемых в синтез мочевины, одна (N-ацетилглутамат) служит активатором одного из ферментов и в химических превращениях не участвует. Остальные пять — аспартат, аргинин, орнитин, цитруллин и аргининосукцинат служат переносчиками атомов, которые в итоге образуют молекулу мочевины. Первые две из этих аминокислот входят в состав белков, тогда как три другие (орнитин, цитруллин и аргининосукцинат) в состав белков не входят. Главной метаболической ролью этих трех последних аминокислот у млекопитающих является участие в синтезе мочевины. Обратите внимание, что образование мочевины является частично **циклическим процессом**. Орнитин, участвующий в реакции 2, регенерируется в ходе реакции 5. Таким образом, ни потеря, ни накопления орнитина, цитруллина, аргининосукцината и аргинина в ходе синтеза мочевины не происходит; потребляются только ион аммония,  $\text{CO}_2$ , АТФ и аспартат.

**Реакция 1: синтез карбамоилфосфата.** Конденсация иона аммония, двуокиси углерода и фосфата (поступающего от АТФ), которая приводит к образованию карбамоилфосфата, катализируется **карбамоилфосфатсинтазой** — ферментом, находящимся в митохондриях печени всех уреотелических организмов, включая человека. Осуществляемый в ходе этой реакции гидролиз двух молекул АТФ обеспечивает энергией образование двух ковалентных связей: амидной связи и ангидридной связи при образовании карбамоилфосфата из карбоновой и фосфорной кислот. Для данной реакции требуются ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , а также дикарбоновая кислота, предпочтительно N-ацетилглутамат. В

присутствии этих соединений происходят значительные конформационные изменения структуры карбоамилфосфатсинтазы, в результате которых одни сульфгидрильные группы экспонируются, другие экранируются, и увеличивается сродство фермента к АТФ.



**Рисунок 30: Схема реакций цикла мочевины**

**Реакция 2: синтез цитруллина.** Перенос карбоамильной группы с карбоамилфосфата на орнитин с образованием цитруллина и  $\text{P}$  катализируется L-орнитин-карбоамилтрансферазой митохондрий печени. Реакция высокоспецифична к орнитину, равновесие ее сильно сдвинуто в направлении синтеза цитруллина.

**Реакция 3: синтез аргининосукцината.** В реакции, катализируемой аргининосукцинатсинтазой, к цитруллину присоединяется аминогруппа аспартата. Для реакции требуется АТФ, равновесие сильно сдвинуто в направлении синтеза аргининосукцината.

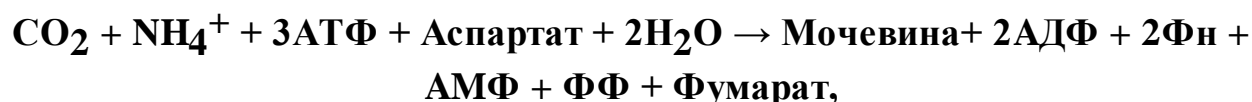
**Реакция 4: расщепление аргининосукцината на аргинин и фумарат.** Обратимое расщепление аргининосукцината на аргинин и фумарат



катализируется аргининосукциназой—ферментом, находящимся в печени и почках млекопитающих. Реакция протекает по механизму транс-элиминирования. Образовавшийся фумарат может превратиться в оксалоацетат в ходе реакций, катализируемых фумаразой и малатдегидрогеназой; оксалоацетат при переаминировании превращается в аспарат.

**Реакция 5: расщепление аргинина на орнитин и мочевины.** Эта реакция завершает цикл мочевины и регенерирует орнитин, субстрат реакции 2. Гидролитическое отщепление гуанидиновой группы аргинина катализируется **аргиназой**, присутствующей в печени всех уреотелических организмов. В небольших количествах аргиназа обнаружена также в почках, мозгу, молочных железах, семенниках и в коже. Аргиназа из печени млекопитающих активируется ионами  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ . Сильными ингибиторами фермента являются орнитин и лизин, конкурирующие с аргинином.

Суммарная реакция синтеза мочевины следующая:



Пирофосфат быстро гидролизуется, и, таким образом, для синтеза одной молекулы мочевины обеспечивая необратимость реакции. Фумарат в свою очередь окисляется в оксалоацетат. Для этого промежуточного продукта, имеющего ключевое значение, существует несколько возможных путей превращения: 1) он может подвергаться трансаминированию в аспарат; 2) он может превращаться в глюкозу по пути глюконеогенеза; 3) он может конденсироваться с ацетил-СоА, образуя цитрат.

Примечательна также компартментация цикла мочевины и связанных с ним реакций. Образование  $\text{NH}_4^+$  под действием глутаматдегидрогеназы, его включение в карбамоилфосфат и последующий синтез цитруллина происходят в митохондриальном матриксе. В отличие от них следующие три реакции цикла мочевины, приводящие к образованию мочевины, протекают в цитозоле.

### **Регуляция биосинтеза мочевины**

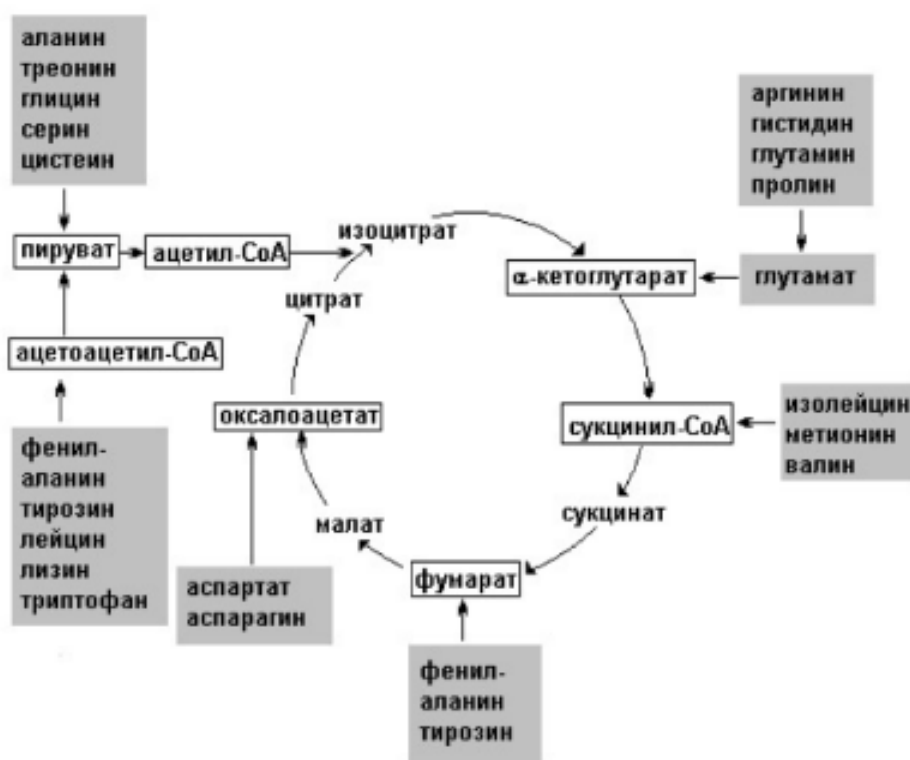
Карбамоилфосфатсинтаза вместе с митохондриальной глутаматдегидрогеназой направляет азот глутамата (и, следовательно, вообще всех аминокислот) в карбамоилфосфат и далее в мочевины. Хотя константа равновесия реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой, благоприятствует образованию глутамата, а не аммиака, удаление аммиака карбамоилфосфатсинтазой и окисление  $\alpha$ -кетоглутарата в цикле лимонной кислоты способствуют катаболизму глутамата. Таким образом, в данном случае скорость цикла мочевины определяется скоростью карбамоилфосфатсинтазной реакции, а активность карбамоилфосфатсинтаза находится в состоянии наибольшей активности, и скорость реакции определяется концентрацией субстрата -  $\text{NH}_4^+$ ,

то есть все направлено на максимально быструю утилизацию аммиака. А концентрация аммиака зависит от скорости L-глутамат-дегидрогеназной реакции, а фермент L-глутамат-дегидрогеназа регулируется аллостерически, что было рассмотрено выше.

Второе направление процесса окисления аминокислот — это окисление углеродных скелетов, которые образуются в виде кетокислот в результате процесса переаминирования.

### Расщепление углеродных скелетов аминокислот

Стратегия разрушения аминокислот состоит в образовании главных промежуточных продуктов обмена веществ, которые могут превращаться в глюкозу или окисляться в цикле трикарбоновых кислот. В самом деле,



**Рисунок 31: Общая схема окисления углеродных скелетов аминокислот**

углеродные скелеты разнообразного набора из двадцати аминокислот направлены превращаются всего в семь молекул: пируват, ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, α-оксоглутарат, сукцинил-СоА, фумарат и оксалоацетат. Мы сталкиваемся здесь еще с одним примером замечательной экономичности

метаболических превращений.

Аминокислоты, распадающиеся с образованием ацетил-СоА или ацетоацетил-СоА, называются **кетогенными**, поскольку в результате их распада повышается содержание кетоновых тел. Аминокислоты же, распад которых приводит к образованию пирувата, α-оксоглутарата, сукцинил-СоА, фумарата или оксалоацетата, названы **глюкогенными**. Возможность синтеза глюкозы из этих аминокислот обеспечивается тем обстоятельством, что указанные

компоненты цикла трикарбоновых кислот и пируват могут превращаться в фосфоенолпируват и затем в глюкозу. Напомним, что у млекопитающих отсутствует путь, обеспечивающий непосредственный синтез глюкозы из ацетил-СоА или ацетоацетил-СоА.

Из основного набора, включающего двадцать аминокислот, только лейцин является исключительно кетогенным. Изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан и тирозин относятся одновременно и к кетогенным, и к глюкогенным аминокислотам. Некоторые из их углеродных атомов появляются в ацетил-СоА или ацето-ацетил-СоА, тогда как другие обнаруживаются в потенциальных предшественниках глюкозы. Остальные четырнадцать аминокислот являются чисто глюкогенными.

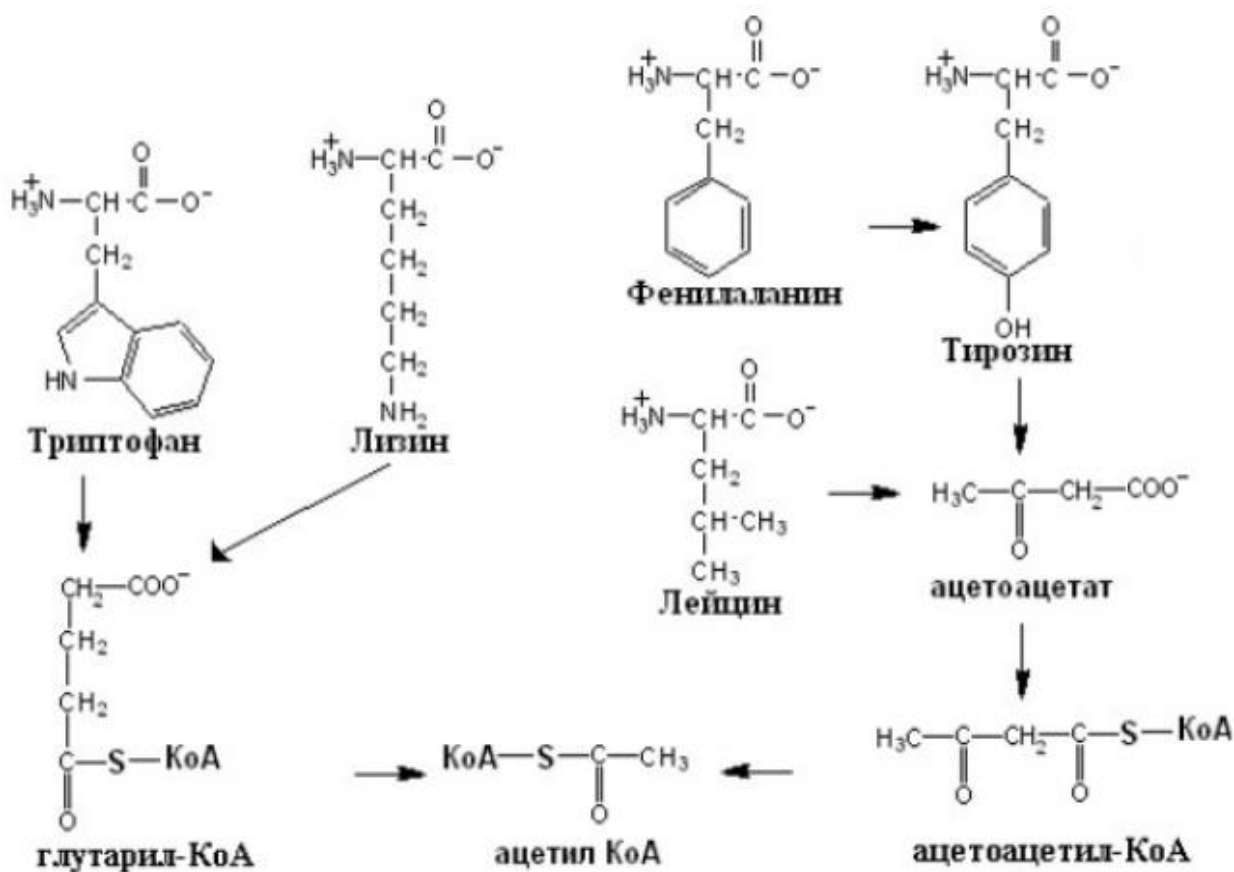


**Рисунок 32:** Схема реакций окисления аминокислот до пирувата и ацетил-СоА

При расщеплении аланина, серина, цистеина, глицина и треонина образуется пируват. Аланин превращается в пируват непосредственно в реакции трансаминирования с  $\alpha$ -кетоглутаратом. Четырехуглеродная аминокислота треонин расщепляется с образованием двухуглеродной аминокислоты глицина, который может подвергаться дальнейшим превращениям по двум путям. На одном из них глицин сначала превращается в серин (трехуглеродную аминокислоту) в результате ферментативного присоединения гидроксиметильной группы, переносчиком которой служит кофермент тетрагидрофолат. Тетрагидрофолат выступает в роли переносчика одноуглеродных групп, таких, как метальная, формильная, гидроксиметильная и формиминогруппа. Однако главный путь катаболизма глицина ведет через другую реакцию, также требующую присутствия тетрагидрофолата. В этой реакции происходит окислительное расщепление глицина до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4$  и метиленовой группы ( $-\text{CH}_2-$ ), которая присоединяется к тетрагидрофолату. Реакция легко обратима; катализируется она глицинсинтазой. *Цистеин* может

превращаться в пируват различными путями с появлением атома серы в  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  или  $\text{SCN}^-$ .

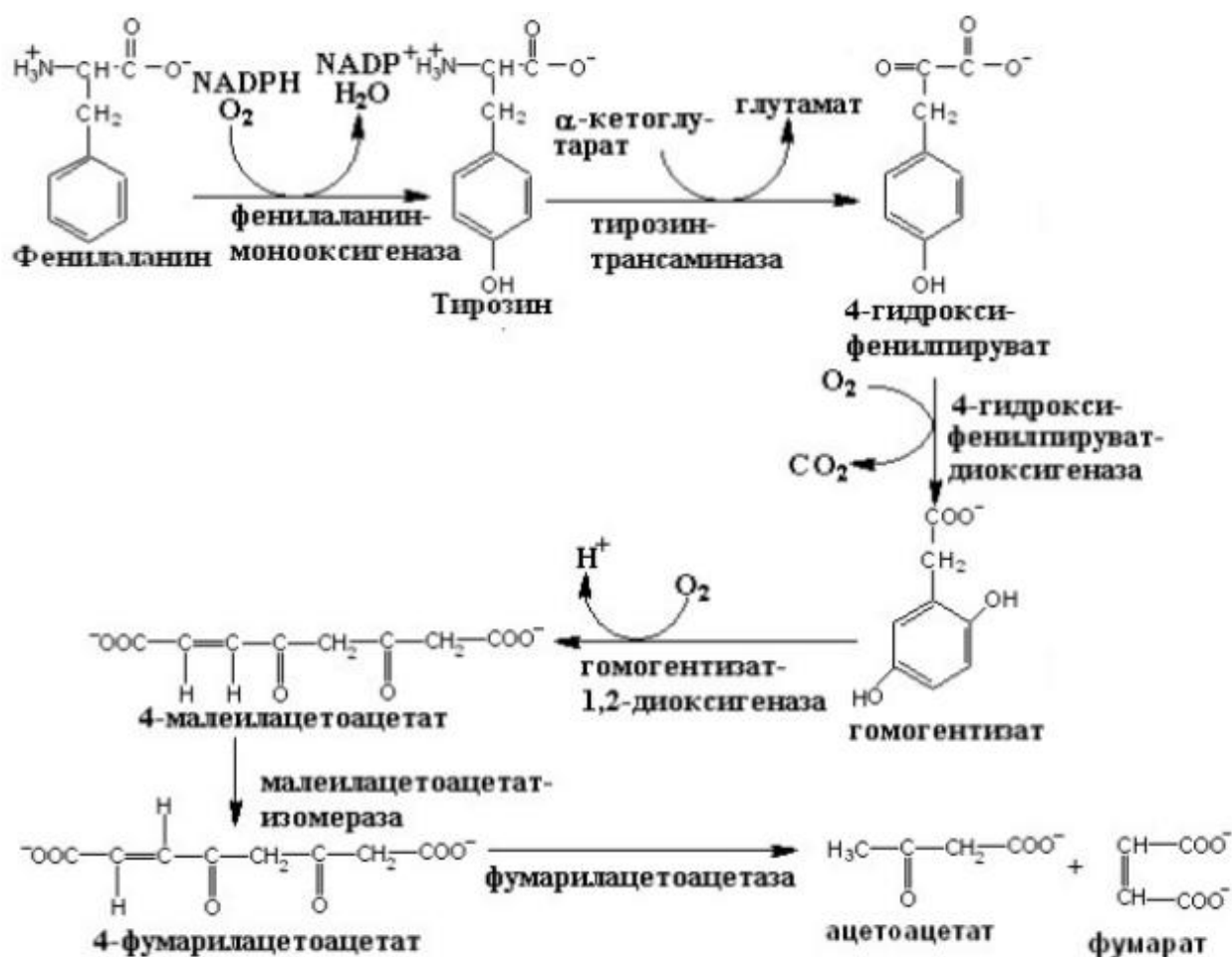
Фрагменты углеродного скелета фенилаланина, тирозина, лизина, триптофана и лейцина превращаются в ацетоацетил-СоА, из которого затем образуется ацетил-СоА.



**Рисунок 33: Схема окисления кетогенных и смешанных аминокислот**

Особого внимания заслуживают в этой группе два катаболических пути. Путь, ведущий от триптофана к ацетил-СоА, самый сложный в аминокислотном катаболизме животных тканей: он включает 13 этапов. Некоторые промежуточные продукты катаболизма триптофана служат предшественниками в биосинтезе других важных биомолекул, например нейрого르몬а серотонина или такого витамина, как никотиновая кислота. Таким образом, путь, по которому идет катаболизм триптофана, имеет несколько ответвлений, что создает возможность для образования ряда других продуктов из единственного предшественника – триптофана.

Второй интересный путь-это путь, идущий от фенилаланина. Путь начинается



**Рисунок 34:** Схема окисления ароматических аминокислот

с реакции окисления фенилаланина под действием фенилаланинмонооксигеназы, в результате происходит окисление кислородом, донором протонов является NADPH. В ходе реакции один атом кислорода вводится в углеродный скелет молекулы, второй соединяется с протонами, и образуется молекула воды. Именно поэтому фенилаланинмонооксигеназу относят в оксигеназам смешанной функции. Затем тирозин подвергается переаминированию, и образуется 4-гидроксифенилпируват. 4-гидроксифенилпируват окисляется 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназой также с участием кислорода, в результате оба атома кислорода из его молекулы вводятся в углеродный скелет, и происходит декарббокислирование, а результате образуется гомогентизат. Гомогентизат-1,2-диоксигеназа окисляет гомогентизат молекулой кислорода, оба атома из которой вводятся в углеродный скелет, в результате происходит разщепление цикла и образуется 4-малеилацетоацетат, который изомеризуется до 4-формилацетоацетата. Фумарилацетоацетаза расщепляет 4-формилацетоацетат на формиат (промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот) и ацетоацетат (кетонное тело). Именно поэтому тирозин и фенилаланин относятся к смешанным аминокислотам.

## Наследственные нарушения катаболизма фенилаланина

У человека известно много различных наследственных нарушений аминокислотного обмена. В основе всех этих нарушений (большинство из них встречается редко) лежит мутация какого-нибудь гена, кодирующего определенный фермент, участвующий в превращениях данной аминокислоты. Под контролем мутантного гена синтезируется дефектный фермент, у которого в том или ином ключевом участке полипептидной цепи может стоять «неправильная» аминокислота; кроме того, какой-нибудь аминокислотный остаток может быть утрачен или, наоборот, включен в полипептидную цепь. В одних случаях такой наследственно измененный фермент неактивен вообще, а в других проявляет лишь часть присущей ему активности, поскольку характерное для него значение  $K_M$  (или  $V_{max}$ ) не соответствует норме. Большинство врожденных нарушений аминокислотного обмена у человека сопряжено с накоплением тех или иных промежуточных продуктов этого обмена. При некоторых наследственных заболеваниях такого рода нарушается нормальное развитие нервной ткани, что приводит к умственной отсталости.

Фенилаланин-тирозиновый путь заслуживает в этом смысле специального упоминания, поскольку три ферментативных этапа этого пути особенно уязвимы, т.е. подвержены генетическим изменениям, в результате которых возникают три вида врожденных нарушений обмена. У некоторых людей дефект затрагивает первый фермент данного метаболического пути: фенилаланин—4-монооксигеназу (ее называют также фенилаланин-гидроксилазой), катализирующую гидроксилирование фенилаланина до тирозина, (он называется также оксигеназой со смешанной функцией), потому что один атом  $O_2$  появляется в продукте реакции, другой в  $H_2O$ . В данном случае мутация происходит в составе интрона, что приводит к нарушению сплайсинга, в результате мРНК не созревает, и синтез белка фенилаланин монооксигеназа не синтезируется (редкий случай когда нарушение не кодирующей части ДНК приводит к проявлению в фенотипе). Этот дефект служит причиной заболевания, которое носит название фенилкетонурии. При наследственном дефекте, затрагивающем фенилаланин-4-монооксигеназу, на первый план выступает второстепенный путь обмена фенилаланина, в норме мало используемый. На этом второстепенном пути фенилаланин претерпевает трансаминирование в реакции с  $\alpha$ -кетоглутаратом, что приводит к образованию фенилпирувата. Однако дальнейшим превращениям фенилпируват не подвергается, т.е. это тупиковый путь; фенилпируват (а также и фенилаланин) накапливается в крови и тканях, а затем выводится с мочой. Избыток фенилпирувата в крови у новорожденного нарушает нормальное развитие мозга и служит причиной умственной отсталости. Фенилкетонурия (ФКУ) – одно из первых врожденных нарушений обмена, открытых у человека. При достаточно раннем выявлении фенилкетонурии можно с помощью соответствующей диеты создать условия для нормального развития и избежать умственной отсталости.

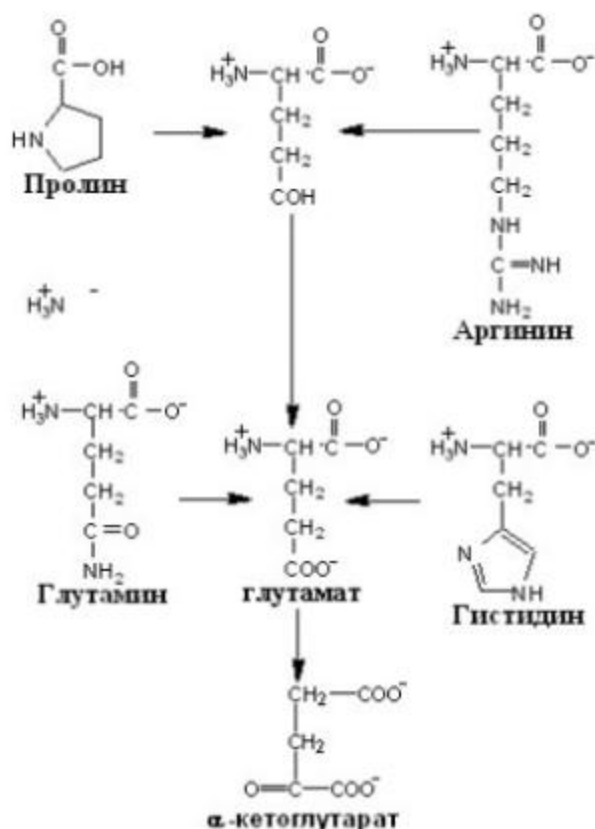
Из рациона должны быть при этом исключены любые продукты, в состав которых входят белки с высоким содержанием фенилаланина. Поскольку почти во всех белках содержится какое-то количество фенилаланина и так как в малых количествах он все же необходим для нормального роста (это одна из незаменимых аминокислот), состав такого рациона должен контролироваться очень тщательно. Природные белки, например казеин молока, следует предварительно подвергать гидролизу и удалять из них фенилаланин.

Выявить фенилкетонурию и назначить ребенку соответствующую диету необходимо в первые же недели после рождения, в противном случае неизбежна необратимая задержка умственного развития. При отсутствии лечения многие больные фенилкетонурией не доживают до 25 лет; других приходится всю жизнь содержать в соответствующих учреждениях и тратить на это много труда и средств. Фенилкетонурия – серьезная проблема здравоохранения. Болезнь эта достаточно широко распространена: на 10000 новорожденных приходится в среднем один с таким дефектом. В США в большей части штатов все новорожденные подвергаются обязательной проверке на фенилкетонурию. Обнаружение этого заболевания не представляет затруднений: требуется только определить содержание фенилаланина и фенилпирувата в моче. В некоторых случаях в результате генетической мутации дефектным оказывается также четвертый фермент фенилаланинового пути – **гомогенизат—1,2-диоксигеназа**. У людей с таким генетическим дефектом не подвергается дальнейшему расщеплению один из промежуточных продуктов катаболизма фенилаланина – **гомогенизат**, который накапливается в жидкостях тела и выводится из организма с мочой. На воздухе такая моча темнеет. Объясняется это тем, что из-за разложения части мочевины с образованием аммиака рН мочи сдвигается в щелочную сторону; **гомогенизат** при этом спонтанно окисляется атмосферным  $O_2$  и превращается в темный пигмент, сходный с тем, который содержится в коже людей черной расы. Это врожденное нарушение обмена носит название **алкаптонурии**. У носителей такого дефекта здоровье явным образом ни в чем не страдает, если не считать беспокойства, вызываемого у них самим видом черной мочи. Это тоже немаловажно: известны случаи, когда люди действительно заболели от одного только страха – черная моча считалась дурным знаком. В таблице 6 указаны и некоторые другие врожденные нарушения аминокислотного обмена.

**Таблица 1. Врожденные нарушения аминокислотного обмена**

Нарушение	Затронутый фермент
Альбинизм	Тирозин—3-монооксигеназа

Алкаптонурия	Гомогентизат— 1,2-диоксигеназа
Аргининосукцинатацидемия	Аргининосукцинатлиаза
Гомоцистинурия	Цистатионин— $\beta$ -синтаза
Болезнь кленового сиропа (лейциноз)	Дегидрогеназа $\alpha$ -кетокислот с разветвленной цепью
Фенилкетонурия	Фенилаланин—4-монооксигеназа
Гипервалинемия	Валин-трансаминаза



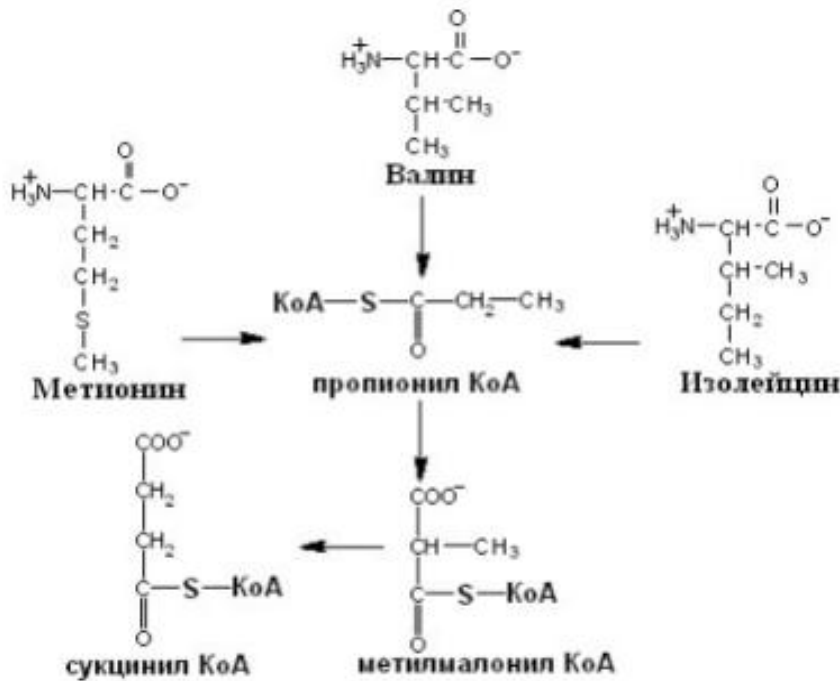
**Рисунок 35: Схема окисления аминокислот, окисление которых приводит к  $\alpha$ -кетоглутарату**

Аспарагин и аспарат превращаются в оксалоацетат. Аспарат, аминокислота, содержащая четыре атома углерода, прямо трансаминируется в оксалоацетат, промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот, Аспарагин гидролизуется под действием аспарагиназы, образуя  $\text{NH}_4^+$  и аспарат. Углеродные скелеты пяти аминокислот поступают в цикл лимонной кислоты через  $\alpha$ -кетоглутарат; к этим аминокислотам относятся аргинин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин и пролин. Углеродные скелеты метионина, изолейцина и валина расщепляются в реакциях, приводящих, в конечном счете, к сукцинил-СоА, то есть к одному из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты. Превращения изолейцина и

валина протекают сходным образом в цикл лимонной кислоты, распад этих аминокислот идет через метилмалонил-СоА. Для изомеризации метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА требуется дезоксиаденозилкобаламин, производное



витамина В<sub>12</sub>.



**Рисунок 36: Схема окисления аминокислот, которые окисляются до пропионил-СоА**

корринового кольца с центрально расположенным атомом кобальта. Корриновое кольцо, подобно порфиру, имеет четыре пиррольных кольца. Два из них (кольца А и D) прямо связаны друг с другом, а другие соединяются при помощи метиленовых мостиков, как это имеет место в порфиринах. Заместителями в пиррольных кольцах являются метильная, пропионамидная и ацетамидная группы. Здесь эти фрагменты окисляются уже полностью до двуокиси углерода и воды. Во время переноса электронов в процессе окислительного фосфорелирования синтезируется АТФ. Таким путем аминокислоты вносят свой вклад в общее обеспечение организма энергией. Известно, что пять аминокислот, распадаясь, превращаются, в конце концов, в ацетоацетил-СоА. В печени из этих аминокислот могут образовываться кетоновые тела, потому что ацето-ацетил-СоА способен превращаться в ацето-ацетат и β-гидроксибутират. Пять аминокислот, о которых идет речь, носят, поэтому название кетогенных. Их способность образовывать кетоновые тела проявляется особенно отчетливо в случае нелеченого сахарного диабета; в печени при этом вырабатываются большие количества кетоновых тел, источником которых служат помимо жирных кислот еще и кетогенные аминокислоты. Пятнадцать аминокислот, распадающихся с образованием α-кетоглутарата, сукцината и оксалоацетата, могут превращаться в глюкозу и гликоген по пути глюконеогенеза. Их называют глюконеогенными аминокислотами. Между кетогенными и глюконеогенными аминокислотами нет

Кобаламин (витамин В<sub>12</sub>) привлекает к себе большой интерес биохимиков и врачей с тех пор, как в 1926 г. Георг Мино и Виллиам Мерфи открыли, что пернициозную анемию можно лечить введением в рацион больных больших количеств печени. Кобаламин был получен в очищенном виде и кристаллизован в 1948 г. Его сложную трехмерную структуру раскрыла Дороти Ходжкин в 1956 г. Ядро кобаламина состоит из

четкой границы, поскольку две аминокислоты (фенилаланин и тирозин) принадлежат одновременно и к той, и к другой группе. Некоторые из аминокислот, превращающихся в пируват, в частности аланин, цистеин и серин, также потенциально способны образовывать ацетоацетат через ацетил-СоА, особенно у больных сахарным диабетом.