

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Биологический факультет

Кафедра биохимии

СОГЛАСОВАНО

Председатель учебно-методической
комиссии биологического факультета
Поликсенова В.Д.

СОГЛАСОВАНО

Декан
биологического факультета
Лысак В.В.

« 26 » октября 2016 г.

« 26 » октября 2016 г.

Регистрационный номер № УД- 545

**ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ
КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

Биоэнергетика

для специальности
1-31 01 02 Биохимия

Составитель: канд. биол. наук, доцент Губич О.И.

Рассмотрено и утверждено
на заседании
Научно-методического совета БГУ

« 01 » ноября 2016 г.

протокол № 1 .

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Кафедра физиологии и биохимии Учреждения образования «Белорусский государственный университет физической культуры»;

Аверин В.А., ученый секретарь ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», канд. биол. наук

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	6
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	30
3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	30
Структура рейтинговой системы	30
Задания и тесты для самоконтроля	30
Темы рефератов	31
Вопросы для подготовки к экзамену	31
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ	33
Учебно-программные материалы	33
Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов	33

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебно-методический комплекс (УМК) по учебной дисциплине «Биоэнергетика» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 Биохимия. Содержание разделов УМК соответствует образовательному стандарту высшего образования данной специальности.

Главная цель УМК – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации по учебной дисциплине «Биоэнергетика».

Структура УМК включает:

1. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

1.1. Теоретический раздел (с указанием цели и задач учебной дисциплины, основными рассматриваемыми в лекционном курсе вопросами).

1.2. Практический раздел (материалы для проведения лабораторных занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

2. Контроль самостоятельной работы студентов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательного стандарта высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. вопросы для подготовки к экзамену, задания, тесты, вопросы для самоконтроля, тематика рефератов и др.).

3. Вспомогательный раздел.

3.1. Учебно-программные материалы (типовая учебная программа, учебная программа УВО).

3.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с УМК должна включать на первом этапе ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в типовой учебной программе. Для подготовки к лабораторным занятиям и промежуточным зачетам необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы.

В ходе подготовки к итоговой аттестации рекомендуется ознакомиться с требованиями к компетенциям по дисциплине, изложенными в типовой учебной программе, структурой рейтинговой системы, а также перечнем вопросов к экзамену.

Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе УМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Биоэнергетика является одной из важнейших дисциплин в системе подготовки высококвалифицированных специалистов-биохимиков, поскольку дает информацию об источниках энергообеспечения процессов жизнедеятельности, регуляции энергетических процессов, взаимопревращении различных видов энергии в живом организме. Современная биоэнергетика тесно связана с биохимией, биофизикой, микробиологией, ксенобиологией, мембранологией, физиологией, космической биологией. Изучение данной дисциплины позволяет расширить научный кругозор студентов-биохимиков, способствует получению знаний и практических навыков, необходимых для самостоятельного проведения исследований на современном научно-методическом уровне.

Краткое содержание лекционного курса

Введение.

Биоэнергетика – наука, изучающая процессы энергообеспечения организма. В зависимости от источника энергии все живые организмы подразделяются на фототрофы (используют энергию солнечного света) и хемотрофы (используют энергию окислительно-восстановительных реакций). Хемотрофы в зависимости от природы доноров электронов подразделяются на хемоорганотрофы (донор электронов – органические молекулы) и хемолитотрофы (донор электронов – водород, сера и другие простые неорганические соединения).

Совокупность окислительных реакций, протекающих в биологических объектах и обеспечивающих их энергией и необходимыми метаболитами, называется *биологическим окислением*. Основными функциями биологического окисления являются энергетическое обеспечение организма (поддержание температуры тела, энергообеспечение процессов биолуминесценции, химических синтезов, осмотической работы, электрических процессов, механической работы), детоксикация ксенобиотиков (первая стадия биотрансформации), энергообеспечение синтеза ключевых метаболитов. Реакции биологического окисления ускоряются ферментами, относящимися к классу оксидоредуктаз.

В настоящее время выделяют 2 типа биологического окисления:

1. Свободное окисление, не сопряженное с фосфорилированием АДФ, не сопровождающееся трансформацией энергии, выделяющейся при окислении в энергию макроэргических связей. При свободном окислении высвобождающаяся при распаде химических связей энергия переходит в тепловую и рассеивается. По типу свободного окисления идут оксигеназные реакции, окислительные процессы, сопровождающиеся образованием или распадом перекисей, многие оксидазные реакции.

Процессы свободного окисления происходят в цитозоле, в мембранах эндоплазматического ретикулума, лизосом, пероксисом, аппарата Гольджи, на внешних мембранах митохондрий и хлоропластов, ядерном аппарате клетки.

2. Окисление, сопряженное с фосфорилированием АДФ. Оно подразделяется на 2 подтипа:

- Субстратное фосфорилирование. Если макроэргическая связь возникает в момент непосредственного окисления субстрата, а затем передается на фосфатный остаток, который, в свою очередь, используется для синтеза АТФ, то фосфорилирование называется субстратным. Процесс локализован в цитозоле клетки.

- Окислительное фосфорилирование. Если окисляемый субстрат не принимает участия в активировании неорганического фосфата, а атомы водорода с коферментов дегидрогеназ, окисляющих субстрат, передаются в оксидоредуктазную цепь, где сопряженно с переносом протонов и электронов на молекулярный кислород происходит активирование фосфата и при его посредстве фосфорилирование АДФ с образованием АТФ, то фосфорилирование называется окислительным. Процесс локализован на внутренних мембранах митохондрий и тилакоидов хлоропластов.

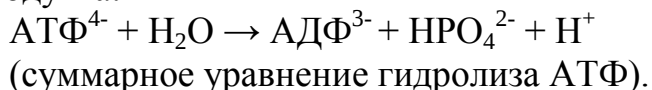
Энергетические источники жизни.

Главные материальные носители свободной энергии – это химические связи между атомами. Следовательно, при образовании или разрыве химической связи изменяется уровень свободной энергии вещества. Если при образовании или разрыве химической связи уровень свободной энергии изменяется на величину, превышающую 6000 кал на моль преобразуемого вещества, связь называется *макроэргической*, а соединение его содержащее – *макроэргическим веществом (макроэргом)*. По своей химической природе все макроэргические вещества представлены фосфор- или серосодержащими соединениями, что определяется способностью данных элементов образовывать химические связи, характеризующиеся внутренней нестабильностью.

Центральное место в процессах переноса химической энергии в клетке принадлежит аденозинтрифосфорной кислоте (АТФ). АТФ был впервые выделен в 1929 г. из кислых экстрактов мышц К. Ломаном, С. Фиске и Й. Суббароу. Химический синтез АТФ был впервые осуществлен в 1932 г. в лаборатории А. Тодда.

При гидролизе АТФ, в результате которого образуются АДФ и неорганический фосфат, изменение стандартной свободной энергии составляет 7300 кал/моль. Столь значительная величина высвобождающейся энергии определяется следующими факторами:

1. При pH 7,0 АТФ почти полностью ионизирован, т.е. представлен анионом АТФ^{4-} , в результате гидролиза данного макроэрга образуются 3 продукта:



В стандартном состоянии, используемом для определения расчетов изменения стандартной свободной энергии, концентрации АТФ^{4-} , АДФ^{3-} и НРО_4^{2-} равны 1 моль, а концентрация H^+ при этом составляет 10^{-7} моль/л. Таким образом, концентрация протонов очень мала по сравнению со стандартными концентрациями других компонентов системы, и следовательно, по закону действующих масс, при pH 7,0 равновесие реакции гидролиза АТФ сильно сдвинуто вправо.

2. При pH 7,0 молекулы АТФ обладают 4 отрицательными зарядами, располагающимися в непосредственной близости друг от друга, вследствие чего между ними действуют силы отталкивания. Когда при гидролизе АТФ концевая фосфатная связь разрывается, электростатическое напряжение внутри молекул АТФ снижается за счет пространственного разъединения отрицательно заряженных продуктов гидролиза АДФ^{3-} и НРО_4^{2-} .

3. АДФ^{3-} и НРО_4^{2-} представляют собой резонансные гибриды, т.е. такие структурные формы, для которых характерна повышенная устойчивость, поскольку часть их электронов находится в конфигурациях, обладающих значительно меньшим запасом энергии по сравнению с таковым, которым они обладали в конфигурациях, характерных для молекул АТФ. Поэтому при гидролизе АТФ электроны в продуктах данной реакции (АДФ^{3-} и НРО_4^{2-}) переходят на более низкие энергетические уровни, чем в негидролизованной молекуле данного макроэрга. Таким образом, гидролиз АТФ приводит к уменьшению запаса свободной энергии и выгоден с точки зрения термодинамики.

Следует особо отметить, что АТФ представляет собой универсальный макроэрг, в то время как прочие нуклеозидтрифосфаты выполняют в клетке строго специализированные функции: УТФ принимает участие в обмене углеводов, ЦТФ активирует промежуточные продукты биосинтеза липидов, ГТФ обеспечивает энергией процессы биосинтеза белка.

При этом, будучи универсальным источником энергии в организме, АТФ занимает промежуточное место в термодинамической шкале фосфорилированных соединений. Именно эта особенность АТФ позволяет ему служить промежуточным переносчиком фосфатных групп от сверхвысокоэнергетичных соединений, которые при гидролизе обеспечивают выделение большего количества свободной энергии, чем АТФ, к акцепторам фосфата, характеризующимся более низкими значениями ΔG_0 .

Соединения, характеризующиеся большим, по сравнению с АТФ, значением ΔG_0 , подразделяются на 3 класса:

1. Макроэрги, образующиеся в процессе расщепления энергетического материала и обеспечивающие синтез АТФ в реакциях, обратных киназным. К данной группе относятся фосфоенолпируват (ФЕП) и 1,3-дифосфоглицерат.

2. Запасные источники энергии (фосфагены), аккумулирующие и запасавшие энергию в форме высокоэнергичных фосфатных связей. Важнейшим фосфогеном позвоночных является креатинфосфат.

Креатинфосфат играет основную роль в энергетике возбудимых тканей: мышечной и нервной, - передавая свою фосфатную группу на АДФ в реакции, катализируемой креатинкиназой:



Благодаря креатинфосфату концентрация АТФ в возбудимых тканях постоянно поддерживается на высоком уровне. Особенно это важно для скелетной мускулатуры, сокращающейся прерывисто, но с большой скоростью и амплитудой. Каждый раз, когда часть АТФ в мышцах расходуется на сокращение, креатинкиназа быстро восстанавливает его нормальный уровень. Благодаря обратимости креатинкиназной реакции накопившийся в период усиленной мышечной активности креатин в период покоя вновь фосфорилируется за счет АТФ, превращаясь в креатинфосфат. У беспозвоночных животных аналогичную функцию выполняет аргининфосфат.

3. Высокомолекулярные полифосфаты представляют собой совокупность остатков фосфорной кислоты, соединенных макроэнергическими фосфодиэфирными связями, при расщеплении каждой из которых выделяется столько же энергии, сколько расходуется при синтезе одной молекулы АТФ. Считается, что у пробионтов данные соединения выполняли функции современного АТФ, однако утратили свое значение, когда возникла необходимость в функционировании веществ с более компактной и специфической структурой, способных к взаимодействию с более широким кругом биологических молекул клетки. Именно поэтому данные макроэрги имеют принципиальное значение в биоэнергетике водорослей, грибов и некоторых высших растений, у высших животных они сохранились лишь в небольших количествах как атавизмы в мембранах эндоплазматического ретикулума, митохондрий и ядра, где они участвуют в регуляции экспрессии ряда генов и транспортных процессов, а также выполняя роль резерва активированных фосфатных групп для очень специфических процессов нуклеинового обмена.

Пути образования энергии в клетке.

Фосфорокластические реакции – это реакции расщепления связей С-С, С-N, С-S, протекающие у микроорганизмов и направленные на образование ацилфосфата, донора фосфатных групп для синтеза АТФ. Примером подобных реакций может служить фосфоролиз цитрулина, протекающий у стрептококков, фосфоролиз пирувата, протекающий у бактерий рода

Clostridium.

Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса) – один из способов извлечения энергии из глюкозы, происходящий в анаэробных условиях. Данный процесс является экзергоническим, так как освобождающаяся при распаде молекулы глюкозы энергия аккумулируется в фосфатных связях АТФ.

Суммарное уравнение гликолиза имеет следующий вид:

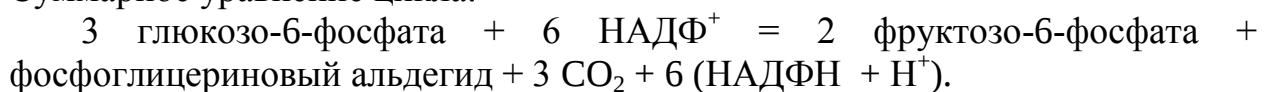


Энергетическая ценность гликолиза составляет 2 АТФ на каждую расщепляемую молекулу глюкозы. Эффективность данного процесса составляет ~ 6,9 %, то есть в процессе гликолиза высвобождается 6,9 % от той энергии, которая могла бы высвободиться при полном окислении глюкозы до CO₂ и H₂O. Однако, несмотря на то, что гликолиз обеспечивает малый выход энергии, это единственный процесс в клетках организма, продуцирующий энергию в отсутствие кислорода. Например, при кратковременной мышечной нагрузке, когда кислород не успевает поступать в ткани и обеспечивать окисление пирувата и сопряженный с ним синтез АТФ, скелетная мускулатура использует имеющийся в них запас гликогена и генерируют АТФ исключительно посредством гликолиза. Огромное значение имеет этот процесс для поддержания целостности и обеспечения функционирования зрелых эритроцитов, не имеющих митохондрии и продуцирующих АТФ исключительно в процессе гликолиза.

Данные сравнительной физиологии позволяют заключить, что переход от дыхания к гликолизу у некоторых низших позвоночных (рыб) может на некоторое (иногда длительное) время полностью заменить дыхание. Однако это имеет место только тогда, когда нормальные физиологические потребности в энергии у животного очень малы. Это относится, в первую очередь, к сравнительно малоподвижным животным, постоянно обитающим при низкой температуре окружающей среды.

В то же время в активно работающих органах, например, в мозге гликолиз не способен заменить окислительное фосфорилирование даже на короткий промежуток времени, исчисляемый минутами или секундами. Так, известно, что переход от дыхания воздухом к дыханию чистым азотом вызывает у человека потерю сознания через 20-25 с.

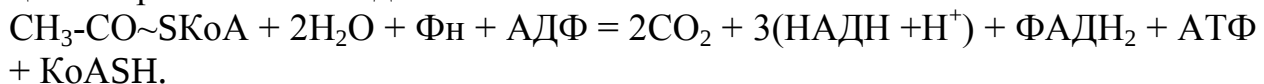
Энергетическая значимость пентозофосфатного пути окисления углеводов. Пентозофосфатный цикл является ответвлением (шунтом) гликолиза на стадии глюкозо-6-фосфата, обеспечивающим образование в тканях животных 2 специальных продуктов: НАДФН и рибозо-5-фосфата. Суммарное уравнение цикла:



Энергетически 6 молекул НАДФН равнозначны 18 молекулам АТФ. Кроме того, НАДФН используется для обезвреживания ксенобиотиков и эндогенных токсинов в монооксигеназной системе печени, в синтезе жирных кислот, структурных и резервных липидов, в синтезе холестерина и его производных, в обезвреживании аммиака при восстановительном аминировании.

Цикл Кребса. Цикл Кребса – общий конечный путь окислительного катаболизма всех видов клеточного топлива в аэробных условиях. Цикл Кребса и дыхательная цепь завершают расщепление метаболитов, образующихся в реакциях катаболизма углеводов, жирных кислот и аминокислот до конечных продуктов – углекислого газа и воды. Именно эти процессы в основном и обеспечивают энергией клетку в условиях аэробноза. Энергетический выход полного окисления глюкозы в аэробных условиях составляет 38 молекул АТФ на 1 исходную молекулу глюкозы (КПД дыхания составляет ~ 50%).

Суммарное уравнение превращения ацетил-коэнзима А ферментами цикла Кребса имеет вид:



Основные биохимические функции цикла Кребса:

- интегративная: данный цикл объединяет катаболизм углеводов, липидов, белков;
- амфиболическая: данный цикл является как катаболическим (в нем происходит распад ацетильных остатков), так и анаболическим (промежуточные продукты цикла могут использоваться для синтеза других веществ);
- энергетическая: в ходе цикла образуется 1 молекула АТФ на 1 моль поступившего ацетил-КоА;
- водороднодонорная: цикл является основным генератором водорода для дыхательной цепи.

Регуляция функционирования цикла Кребса осуществляется углеродсодержащими субстратами и промежуточными продуктами реакций цикла, а также адениловыми нуклеотидами. Так, скорость цитратсинтазной реакции регулируется ацетил-КоА (его присутствие определяется активностью пируватдегидрогеназного комплекса), а также щавелево-уксусной кислотой. Активность цитратсинтазы ингибируется высокими концентрациями сукцинил-КоА, жирными кислотами, цитратом и высокими концентрациями НАДН. Окисление изоцитрата до α-кетоглутарата под действием изоцитратдегидрогеназы регулируется путем аллостерической активации фермента АДФ. В то же время НАДН и НАДФН действуют как ингибиторы изоцитратдегидрогеназы. Ингибитором активности α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса служит сукцинил-КоА.

Анаплеротические реакции цикла Кребса. Специальные ферментативные реакции, обеспечивающие пополнение пула промежуточных продуктов цикла Кребса, называются анаплеротическими. К ним относятся следующие процессы: ферментативное карбоксилирование пирувата с образованием щавелево-уксусной кислоты (протекает в печени и почках человека и млекопитающих), ферментативное расщепление фосфоенолпирувата с образованием оксалоацетата и запасанием избытка энергии в форме ГТФ (протекает в миокарде и скелетной мускулатуре), глиоксилатный цикл, обеспечивающий образование сукцината и оксалоацетата (протекает у растений, особенно в прорастающих семенах, а также у ряда микроорганизмов, например, *E. coli*).

Митохондрии как преобразователи энергии.

Химический состав и структура митохондрий. В составе митохондрий 65% приходится на белки (причем примерно половина из них – нерастворимые структурные белки: гемопротеины и липопротеины), 26-28% липидов (главным образом, это фосфолипиды, легко реагирующие со структурными белками митохондрий, образуя липопротеиновые комплексы, необходимые для поддержания архитектоники митохондриальных мембран). Митохондрии представляют собой двумембранные органоиды, расстояние между мембранами составляет 50-100 Å⁰, толщина мембран – 50-60 Å⁰. Наружная мембрана обеспечивает транспорт субстратов, ионов, воды, нуклеотидов; она проницаема для практически всех ионов небольшого размера, маркер мембраны – моноаминоксидаза. Внутренняя мембрана митохондрий образует кристы, число, расположение и величина которых зависит от функциональной специфичности клетки. Благодаря кристам общая поверхность внутренней мембраны митохондрий приблизительно в 5 раз больше общей поверхности внешней и составляет около трети всех мембран клетки. Особенностью внутренней мембраны является высокое содержание кардиолипинов (около 10% от всех липидов мембраны), отсюда – малая проницаемость данной мембраны для ионов. Внутренняя мембрана включает в себя 3 типа белков: 1) оксидоредуктазы дыхательной цепи, 2) ферментные комплексы: АТФ-синтетаза, цитохромоксидаза (маркер внутренней мембраны), 3) транспортные белки, регулирующие перенос метаболитов в матрикс и из него.

Внутреннее пространство митохондрий заполнено матриксом, на 50% состоящим из белка. В матриксе митохондрий находятся ферменты цикла Кребса, пируватдегидрогеназной системы, системы β-окисления жирных кислот. Маркер митохондриального матрикса – глутаматдегидрогеназа.

Изучение ультраструктуры митохондриальной мембраны позволило установить, что входящие в ее состав флавопротеины и цитохромы располагаются в виде отдельных групп, называемых дыхательными ансамблями. Компоненты дыхательного ансамбля обеспечивают перенос протонов и электронов, связывающий окисление органических веществ с

восстановлением кислорода, причем энергия извлекается только из электронных переходов.

Существует 4 способа переноса электронов от одной молекулы к другой:

1. Прямой перенос электронов, например, $\text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+} = \text{Cu}^{+} + \text{Fe}^{3+}$.

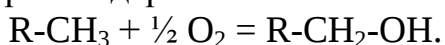
2. Перенос в составе атомов водорода по схеме



А - акцептор электронов, Д – донор электронов.

3. Перенос электронов от донора к акцептору в форме гидрид-иона (H^-), несущего 2 электрона, как это имеет место в случае пиридин-зависимых дегидрогеназ.

4. Перенос путем прямого взаимодействия органического восстановителя с кислородом, приводящего к образованию продукта, в котором содержится ковалентно связанный кислород



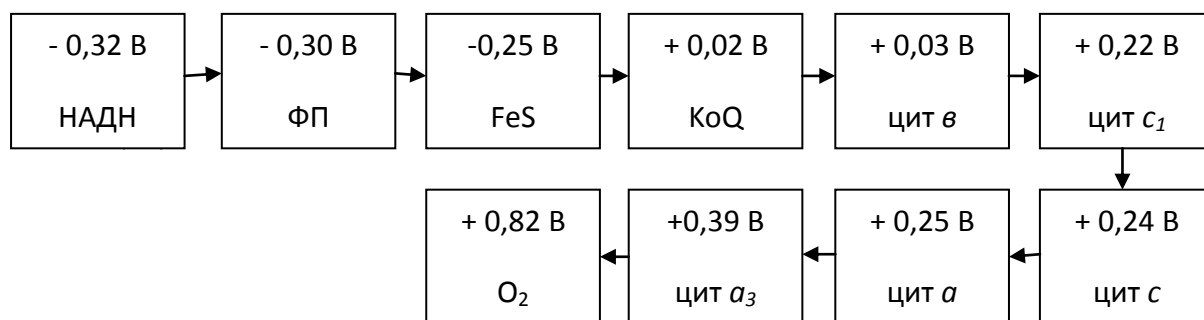
В этой реакции донором электронов является углеводород, а акцептором – атом кислорода.

Перенос электронов в митохондриях совершается в различной форме: в форме атомов водорода, гидрид-ионов и прямым способом.

Для обозначения одного электронного эквивалента, участвующего в окислительно-восстановительной реакции, часто используют термин – “восстановительный эквивалент”. При ферментативном окислении молекул биологического топлива обычно отщепляется по 2 восстановительных эквивалента и каждый атом кислорода также присоединяет к себе 2 электрона. Поэтому единицей биологического окисления принято считать перенос одной пары восстановительных эквивалентов от субстрата на кислород.

Окислительно-восстановительные потенциалы и изменение свободной энергии. Знание окислительно-восстановительного (ox/red) потенциала различных окислительно-восстановительных пар позволяет предсказать направление потока электронов от одной окислительно-восстановительной пары к другой в присутствии катализатора в стандартных условиях (25 °С, рН 7,0, концентрации всех компонентов равны 1,0 моль/л). В таких условиях электроны будут переходить от более электроотрицательной окислительно-восстановительной пары, например, от НАДН/НАД⁺ ($E'_0 = - 0,32 \text{ В}$), к более электроположительным акцепторам электронов, например к паре восстановленный цитохром *c*/ окисленный цитохром *c* ($E'_0 = + 0,23 \text{ В}$). Эта способность электронов переходить от электроотрицательных систем к электроположительным связана с тем, что такой поток электронов сопровождается уменьшением величины свободной энергии.

В соответствии с этим, оксидоредуктазная цепь внутренней мембраны митохондрий имеет следующий вид:



Изменение стандартной свободной энергии в реакциях, связанных с переносом электронов, вычисляют по формуле:

$$\Delta G_0' = -n \cdot F \cdot \Delta E_0', \text{ где}$$

$\Delta G_0'$ – изменение стандартной свободной энергии, выраженной в калориях,

n – число электронов,

F – число Фарадея (23062 кал/В· моль)

$\Delta E_0'$ – разность стандартных потенциалов электрон-донорной и электрон-акцепторной систем.

В соответствии с данным уравнением, при переходе 2 электронов от окислительно-восстановительной пары НАДН/НАД⁺ ($E_0' = -0,32$ В) к паре $\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2} \text{O}_2$ ($E_0' = +0,82$ В) изменение стандартной свободной энергии составляет - 52,6 ккал. Аналогичным путем можно рассчитать изменение стандартной свободной энергии для любого отрезка цепи переноса электронов по разности стандартных потенциалов соответствующих ox/red пар.

Окислительное фосфорилирование – это процесс синтеза АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфата, осуществляющийся в живых клетках, благодаря энергии, выделяющейся при окислении органических веществ в процессе клеточного дыхания.

Окислительное фосфорилирование открыто В. А. Энгельгардтом в 1930 году при работе с эритроцитами птиц. В 1939 году В. А. Белицер и Е. Т. Цыбакова показали, что окислительное фосфорилирование сопряжено с переносом электронов в процессе дыхания; к такому же заключению несколько позднее пришел Г. М. Калькар. Поскольку АТФ абсолютно необходим для осуществления множества процессов, требующих затраты энергии, окислительное фосфорилирование играет важнейшую роль в жизнедеятельности аэробных организмов. У животных, растений и грибов окислительное фосфорилирование протекает в митохондриях. В матриксе митохондрий идет ряд метаболических процессов, поставляющих субстраты окисления АН_2 для окислительного фосфорилирования. Наиболее важные из этих процессов – цикл Кребса и β -окисление жирных кислот. Интермедиаты этих процессов подвергаются ферментативному окислению; причем электроны передаются в электрон-

транспортную цепь внутренней мембраны митохондрий. Электронтранспортная цепь осуществляет многоступенчатый экзергонический перенос электронов от соответствующих субстратов к молекулярному кислороду, а высвобождающаяся при этом энергия используется расположенным в той же мембране ферментом АТФ-синтетазой для фосфорилирования АДФ.

В интактной митохондриальной мембране перенос электронов в электрон-транспортной цепи и фосфорилирование АДФ тесно сопряжены между собой. В настоящее время наибольшим признанием пользуется хемиосмотическая теория сопряжения, предложенная в 1961 году П. Митчеллом.

Данная теория основана на том, что внутренняя (сопрягающая) мембрана митохондрий имеет высокое электрическое сопротивление и очень низкую проницаемость для заряженных частиц. Ферменты электрон-транспортной цепи расположены поперек внутренней мембраны. В ней содержатся также протонные насосы, которые, используя энергию переноса электронов, выкачивают протоны (без сопровождающих анионов) из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Оно закисляется, а наружная сторона сопрягающей мембраны приобретает положительный заряд. В матриксе митохондрий при этом образуется избыток ОН-ионов, а внутренняя поверхность сопрягающей мембраны несет отрицательный заряд. Таким образом, на сопрягающей мембране возникает разность электрохимических потенциалов ($\Delta\mu\text{H}^+$):

$$\Delta\mu\text{H}^+ = F \cdot \Delta\psi + 2,3 \cdot R \cdot T \cdot \Delta \text{pH}, \text{ где}$$

F – число Фарадея,

T – абсолютная температура,

R – газовая постоянная,

$\Delta\psi$ – мембранный потенциал.

Протоны, накопившиеся в межмембранном пространстве, стремятся вернуться в матрикс. Энергезированная сопрягающая мембрана разряжается при помощи H^+ -АТФазы, причем именно поток H^+ является движущей силой для синтеза АТФ. В соответствии с теорией П. Митчелла, на каждые 2H^+ , прошедшие через мембрану в матрикс митохондрий, синтезируется 1 молекула АТФ. Объясняя процесс утилизации энергии $\Delta\mu\text{H}^+$, П. Митчелл постулировал прямое взаимодействие протонного потока с активным центром H^+ -АТФазы.

АТФ-синтаза (протонная АТФаза, H^+ -АТФаза) представлена 2 белковыми комплексами, состоящими, в свою очередь, из субъединиц.

Первый из них, полностью “утопленный” в сопрягающую мембрану и пронизывающий ее насквозь, состоит из трех видов гидрофобных полипептидных цепей, и обозначается F_0 . Основная функция F_0 -фактора – перенос протонов через липидный бислой с внешней стороны митохондриальной мембраны к активному центру фермента.

Непосредственно в переносе H^+ участвует ДЦКД-связывающий протеолипид, обладающий 2 гидрофобными участками и 1 гидрофильным, находящимся в центре молекулы. Протеолипид располагается поперек мембраны, образуя шпильку, так что полярный участок оказывается на внешней стороне сопрягающей мембраны и служит входом H^+ в канал. В переносе протонов принимают участие остатки глутаминовой кислоты, аргинина и тирозина, входящие в состав протеолипида. Наиболее вероятный механизм переноса протонов – эстафетная передача по протон-донорным и протон-акцепторным группам этих аминокислот.

Второй комплекс протонной АТФазы включает в свой состав 5 различных полипептидов и выпуклает из сопрягающей мембраны в виде грибовидного выступа. Это F_1 -фактор, непосредственно ответственный за биосинтез АТФ. Субъединичный состав F_1 -фактора соответствует формуле $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Считается, что каталитический центр, ускоряющий реакцию синтеза АТФ, образован β -субъединицами, α -субъединицы защищают каталитический центр от негативного воздействия компонентов митохондриального матрикса. Основная функция ϵ -субъединицы – ингибирование способности фермента гидролизовать АТФ.

В настоящее время описано 3 возможных механизма синтеза АТФ в активном центре АТФазы:

1. движение H^+ по протон-проводящему каналу приводит к их концентрированию в активном центре фермента. 2 протона, оказавшись в активном центре, воздействуют на кислород уже находящегося в нем неорганического фосфата, и, соединяясь с ним, образуют молекулу воды. Это делает фосфат высоко реакционноспособным и определяет его способность взаимодействовать с АДФ с образованием АТФ.

Протонирование неорганического фосфата является энергозависимым, именно здесь используется энергия $\Delta\mu H^+$.

2. протон, поступающий по протон-проводящему каналу F_0 - фактора, активируют неорганический фосфат, связанный с активным центром β -субъединицы, отнимая от него ОН-группу. Одновременно ОН-группа концевой фосфата АДФ теряет H^+ за счет взаимодействия с ОН-группой матрикса, где гидроксильные группы накапливаются в результате переноса H^+ в межмембранное пространство. Активированные молекулы АДФ и неорганического фосфата взаимодействуют друг с другом, приводя к образованию АТФ.

3. обладая не менее чем 2 центрами связывания АДФ и неорганического фосфата, F_1 -фактор способен синтезировать АТФ, если связывающий центр находится в закрытом состоянии. При этом АДФ и неорганический фосфат находятся в нем в окружении аминокислот, обеспечивающих отрыв молекулы воды от исходных субстратов и синтез АТФ. При транслокации протона центр связывания открывается, и АТФ поступает из него в матрикс, а его место занимают АДФ и неорганический фосфат. Новый цикл

конформационных перестроек переводит этот центр связывания в закрытое состояние с одновременным высвобождением молекулы АТФ из другого связывающего центра, переходящего в открытое состояние.

Таким образом, согласно конформационной теории, энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, сначала используются для транспорта протонов через сопрягающую мембрану против сил электрического поля и в направлении большей концентрации протонов (энергизация мембраны). Затем энергия, накопленная в электрической и осмотической формах, используется в качестве движущей силы для совершения полезной работы.

Многие вещества, среди которых имеются яды и лекарственные средства, способны изменять энергетические процессы в клетке путем снижения эффективности окислительного фосфорилирования. Среди подобных веществ особую роль играют разобщители окислительного фосфорилирования.

Разобщители окислительного фосфорилирования - соединения, не препятствующие созданию протонного потенциала, но способствующие его расходованию минуя H^+ -АТФазу.

Механизм действия разобщителей заключается в том, что они являются переносчиками протонов и других катионов через мембрану. Этим они переводят энергию мембранного потенциала ($\Delta\psi$) или ΔpH в тепловую энергию, “отключая” фосфорилирование от дыхания. При их действии дыхание усиливается, а фосфорилирование подавляется. Все разобщители относятся к мембранотропным веществам. По механизму действия они подразделяются на протонофоры и прочие ионофоры.

Протонофоры способствуют переносу через мембрану H^+ , выравнивая их концентрацию и разность зарядов по обе стороны мембраны. Поэтому в соответствующих концентрациях они могут полностью разобщать дыхание и фосфорилирование, так как ликвидируют оба компонента протонного потенциала ($\Delta\psi$ и ΔpH). Фосфорилирующее окисление полностью переходит в свободное, и митохондрии начинают функционировать в качестве “нагревательного прибора клетки”.

К разобщителям этого типа относятся:

1. свободные жирные кислоты;
2. 2,4-динитрофенол;
3. производные бензимидазола и фенилгидразона;
4. салицилаты;
5. дикумарол и фенилин;
6. гормоны щитовидной железы (тироксин и трийодтиронин).

Все разобщители-протонофоры липофильны и содержат в молекуле легко отщепляемый протон, который они связывают на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, переносят на внутреннюю сторону и высвобождают в матрикс.

Особый интерес в настоящее время вызывает разобщение окислительного фосфорилирования жирными кислотами. Установлено, что они способны стимулировать дыхание в отсутствие синтеза АТФ, активировать латентную АТФазу митохондрий и снижать параметр P/O (АДФ/О). Данные эффекты жирных кислот зависят от длины углеводородной цепи и структуры молекулы. Максимальное действие на латентную АТФазу оказывает миристиновая кислота. Эффективность жирных кислот по стимуляции дыхания возрастает с увеличением длины цепи от 8 до 12 атомов углерода, остается константной у миристиновой и пальмитиновой кислот и резко снижается при увеличении длины цепи от 18 до 20 атомов углерода. Наибольший эффект на параметр АДФ/О выявлен у пальмитиновой кислоты, значительно менее эффективны лауриновая и стеариновая кислоты. В разобщающем действии жирных кислот принимают участие переносчик дикарбоновых кислот; АДФ/АТФ-антипортер и аспартат-глутаматный антипортер. Участие АТФ/АДФ-антипортера в разобщении окисления и фосфорилирования заключается в содействии трансмембранному переносу анионов жирных кислот, в то время как их протонированные формы свободно пересекают мембрану по градиенту концентрации, причем не исключается возможность их протонирования в активном центре переносчика. Аналогичное участие в разобщающем действии жирных кислот принимают переносчик дикарбоновых кислот и аспартат-глутаматный антипортер.

Разобщители-ионофоры увеличивают проводимость внутренней мембраны митохондрий или одновременно для протонов и других ионов, или какого-нибудь одного катиона (чаще K^+ или Na^+). К ионофорам относятся полипептидные антибиотики – валиномицин, нигерицин, грамицидин А.

Циклическая, липофильная, состоящая из неполярных аминокислот молекула *валиномицина* избирательно связывает ионы K^+ на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, переносит их через мембрану и высвобождает в матрикс митохондрий. Данный перенос полностью компенсирует разность зарядов, но не ликвидирует избыток протонов в межмембранном пространстве. Именно поэтому валиномицин вызывает сильное, но не полное разобщение дыхания и фосфорилирования.

Нигерицин также способен осуществлять перенос ионов K^+ , но в антипорте с H^+ . Он выравнивает разницу концентраций протонов по обе стороны сопрягающей мембраны, то есть устраняет ΔpH , но не влияет на величину $\Delta\psi$. Поскольку величина ΔpH составляет 1/5 трансмембранного электро-химического потенциала протонов ($\Delta\mu H^+$), то разобщающий эффект нигерицина слабее, чем валиномицина.

Грамицидин А, полипептидная структура которого состоит из неполярных аминокислот, образует в мембране канал, состоящий из 2 спиральных молекул антибиотика. По этому каналу беспрепятственно по

градиенту концентраций проникают ионы K^+ , Na^+ , H^+ , что приводит к полному разобщению дыхания и фосфорилирования.

Необходимо заметить, что антибиотики-ионофоры выравнивают ионные градиенты на любой, а не только митохондриальной мембране. У аэробных микроорганизмов ферменты дыхательной цепи и фосфорилирования находятся в клеточной мембране, поэтому антибиотики-ионофоры, прекращая выработку энергии и выравнивая ионные градиенты между внутри- и внеклеточной средой, вызывают быструю гибель микроорганизмов.

Эффективность окислительного фосфорилирования.

Эффективность окислительного фосфорилирования выражается через величины P/O , ADP/O или величину дыхательного контроля.

P/O – отношение связанного неорганического фосфата к поглощенному кислороду – отражает отношение фосфорилирующего и свободного окисления. ADP/O – отношение количества потребленного АДФ к поглощенному кислороду, более часто встречающийся в русскоязычной литературе вариант. Дыхательный контроль – отношение поглощения кислорода митохондриями в состоянии III (по Чансу) к поглощению кислорода в состоянии IV (по Чансу). Понятие о 5 состояниях дыхательной цепи введено в 60-е гг. 20 в. У. Чансом и М. Уильямсом. Эти состояния отличаются друг от друга по скорости реакций окисления, природе лимитирующих факторов, соотношению окисленных и восстановленных форм переносчиков.

I. Эндогенное дыхание. Наблюдается при отсутствии добавляемых субстратов окисления и фосфорилирования (лимитирующие факторы).

II. Наблюдается при добавлении в систему субстрата фосфорилирования (АДФ) и не добавлении субстрата окисления. Все переносчики находятся в окисленном состоянии. Лимитирующий фактор – наличие субстрата окисления.

III. Активное состояние. Наблюдается при внесении в систему субстрата окисления, при этом происходит активация дыхания интактных митохондрий. Скорость дыхания в этом состоянии ограничена скоростью проникновения субстрата в митохондрии и мощностью митохондриальных ферментов. После исчерпания резервов АДФ интенсивность дыхания снижается.

IV. Состояние дыхательного контроля. Наблюдается при добавлении новой порции АДФ и сопровождается возвратом в состояние III. Наблюдается до исчезновения АДФ или полного исчерпания кислорода.

V. Анаэробное дыхание. Наблюдается при исчерпании резерва кислорода. Все дыхательные переносчики находятся в восстановленной форме.

Обычно большая часть клеток, находящихся в покое, пребывает в состоянии IV, при котором скорость дыхания определяется

доступностью АДФ. При повышении скорости дыхания (например, при физической работе) клетка приближается к состоянию III или к состоянию V: т.е. исчерпываются возможности дыхательной цепи или величина осмотического давления кислорода опускается ниже K_m для цитохрома a_3 .

Основные пути использования энергии в организме животных и человека.

Мембранный транспорт. Типы переноса веществ через биологические мембраны. Энергетическое обеспечение процессов мембранного транспорта. Перенос через мембраны неорганических соединений.

Транспортная функция является одной из важнейших функций биологических мембран. Их избирательная проницаемость является основой поддержания постоянства внутренней среды клетки и ее компартментов, а также обеспечения поступления необходимых метаболитов в клетку и выведения из нее секретов и отходов. От транспорта веществ через мембраны зависят различные электрические и химические градиенты, возникающие по обе стороны мембраны и имеющие колоссальное значение для многих физиологических процессов, таких как проведение возбуждения, мышечное сокращение, выделительные процессы, осмотическая работа и др. Поэтому значительная доля молекул АДФ, синтезируемая в клетке, расходуется на протекание мембранных транспортных процессов.

Транспортные процессы подразделяются на 2 типа, различающихся по механизму, обеспечивающему перемещение веществ через мембрану. Первый тип носит название *пассивного транспорта*. В этом случае ионы или молекулы перемещаются через мембрану по электрическому, концентрационному или электрохимическому градиенту. В основе данного процесса лежит явление диффузии – движение частиц из области большей их концентрации в область с меньшей концентрацией (или из области с большей концентрацией заряда в менее заряженную область). В мембране перенос по градиенту представлен двумя процессами: непосредственно диффузией через липидный бислой и так называемой облегченной диффузией. Последняя осуществляется за счет специальных белков-переносчиков (ионных каналов и транспортных белков) и, в первую очередь, необходима для транспорта веществ, которые в силу своей гидрофильности или размеров не способны преодолеть мембрану путем простой диффузии. Кроме того, облегченная диффузия ускоряет скорость транспорта. Таким образом, пассивный транспорт осуществляется по электрохимическому градиенту, использует энергию этого градиента и не требует для своего функционирования дополнительных источников энергии в форме макроэргических соединений.

Второй тип мембранного транспорта называется *активным*, его роль заключается в переносе частиц против электрохимического градиента. Такой транспорт требует дополнительного источника энергии, в качестве которого чаще всего выступает АДФ, а также другие макроэрги (фосфоенолпируват,

ГТФ, ЦТФ) или энергия света. В зависимости от того, какой источник энергии используется для активного транспорта, различают *первично-активный* и *вторично-активный транспорт*.

Протекание *вторично-активного* транспорта определяется наличием созданных независимо от данного транспорта градиентов на мембране, например, градиента протонов или Na^+ . Энергия таких градиентов и (или) мембранного потенциала используется для переноса других соединений. В настоящее время известны три схемы вторичного активного транспорта: *унипорт*, *симпорт*, *антипорт*. При этом подразумевается, что переносчик в нагруженном или ненагруженном состоянии одинаково хорошо пересекает мембрану.

Однонаправленный перенос иона в комплексе со специфическим переносчиком получил название унипорта. При этом через мембрану заряд переносится либо комплексом (если молекула переносчика электронейтральна), либо свободным переносчиком (если перенос обеспечивается заряженным переносчиком). Результат переноса – накопление ионов за счет снижения мембранного потенциала. Такой эффект наблюдается при накоплении ионов калия в присутствии валиномицина в энергезированных митохондриях.

Встречный перенос ионов с участием одноместной молекулы-переносчика получил название антипорта. В этом случае молекула-переносчик образует прочный комплекс с каждым из переносимых ионов. Перенос осуществляется в два этапа: сначала один ион пересекает мембрану в одном направлении, затем второй ион – в обратном. Движущей силой этого процесса служит разность концентраций одного из переносимых ионов. Классическим примером антипорта служит перенос через клеточную мембрану ионов калия и водорода с участием антибиотика нигерицина.

Совместный однонаправленный перенос ионов с участием двухместного переносчика называется симпортом. Предполагается, что в мембране могут находиться 2 электронейтральные молекулы переносчика: переносчик в комплексе с катионом и анионом и свободный переносчик. Поскольку мембранный потенциал в такой системе не изменяется, то причиной переноса может служить разность концентраций одного из ионов. Считается, что по схеме симпорта осуществляется накопление клеткой аминокислот. Калий-натриевый насос создает начальный градиент концентрации ионов натрия, которые затем способствуют накоплению аминокислот. Этот процесс должен сопровождаться значительным смещением осмотического равновесия, поскольку в одном цикле через мембрану переносятся 2 частицы в одном направлении.

Первично-активный транспорт осуществляется за счет работы специальных мембранных ферментов, получающих энергию за счет гидролиза АТФ - транспортных АТФаз. Такие переносчики (ионные насосы) могут транспортировать небольшие молекулы и ионы. Выделяют 4 класса

АТФ-зависимых транспортных ферментов мембран: Р-АТФазы, V-АТФазы, F-АТФазы и ABC-АТФазы. Все они характеризуются наличием по меньшей мере одного сайта связывания АТФ и способностью к ее гидролизу.

Р-АТФазы характеризуются наличием 2 основных субъединиц - α и β , первая из которых называется каталитической и непосредственно выполняет каталитическую функцию, а вторая является регуляторной. К данному классу относятся такие широко распространенные в клетках живых организмов мембранные ферменты, как H^+ -АТФаза, H^+, K^+ -АТФаза, Na^+, K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза.

АТФазы V-класса – крупные сложные интегральные мембранные комплексы, транспортирующие исключительно протоны водорода. Особенностью их локализации в клетке является то, что они обнаруживаются в мембранах клеточных органелл, в частности в мембранах тонопласта вакуолей растительных клеток и грибов, в мембранах эндосом и лизосом клеток животных. Размер данных ферментов значительно превосходит размер Р-АТФаз. Работа V-АТФаз обеспечивает АТФ-зависимое удаление протонов из цитозоля (в полости органелл или во внеклеточное пространство), что приводит к закислению соответствующих компартментов или межклеточного пространства. Это необходимо для создания в органеллах величин рН, оптимальных для созревания и функционирования соответствующих ферментов, а в случае остеокластов – для разрушения костной ткани.

F-АТФазы отличаются от остальных классов АТФаз тем, что в ходе их функционирования происходит не гидролиз АТФ, а его синтез из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии электро-химического протонного градиента. Такой процесс может иметь место на плазмалемме бактериальных клеток, на внутренней мембране митохондрий и на мембранах тилокоидов в хлоропластах. В результате создания на этих мембранах электро-химического градиента протонов, H^+ движутся через мембрану по протон-проводящему каналу F-АТФаз, где происходит синтез АТФ, причем именно этот процесс лежит в основе получения энергии большинством организмов.

Суперсемейство *ABC-АТФаз* интересно тем, что осуществляет перенос через мембраны большого числа разнообразных низкомолекулярных соединений. В частности, такие ферменты в плазмалемме грамотрицательных бактерий переносят сопряжено с гидролизом АТФ аминокислоты, моносахариды, небольшие пептиды, кроме того, они обнаружены в плазмалемме и мембранах эндоплазматического ретикулума млекопитающих, где они ответственны за транспорт некоторых пептидов, в том числе участвующих в представлении антигенов белками главного комплекса гистосовместимости, а также за транспорт некоторых фосфолипидов и низкомолекулярных соединений. Данные ферменты устроены достаточно просто и включают два трансмембранных домена, образующих канал для прохождения транспортируемых веществ, и два

цитоплазматических домена, связывающих АТФ и осуществляющих их гидролиз.

В плазматических и субклеточных мембранах живых клеток возможно одновременное функционирование первичного и вторичного активного транспорта. Примером этому может служить внутренняя мембрана митохондрий. Ингибирование АТФазы в ней лишает митохондрии возможности накапливать вещества за счет вторичного активного транспорта. Такой способ накопления особенно важен для тех метаболитов, насосы для которых отсутствуют (аминокислоты, углеводы).

Энергетика мышечного сокращения.

Энергию одиночному сокращению дает АТФ. Однако запасы АТФ в мышцах невелики. В экспериментах на животных с применением 1-фтор-2,4-динитробензола, блокирующего ресинтез АТФ, показано, что его достаточно для совершения интенсивных движений в течение 2-3 с, после чего требуется его ресинтез, который осуществляется несколькими путями:

1. креатинкиназная реакция. Первый и наиболее быстрый путь ресинтеза. С использованием монойодуксусной кислоты, не влияющей на креатинкиназную реакцию, но выключающей другие пути ресинтеза АТФ, показано, что за счет креатинфосфата животное может интенсивно двигаться в течение 20-30 с.

2. гликолиз. Гликолиз протекает за счет глюкозы легко мобилизуемого запасного полисахарида гликогена. Мышцы содержат от 0,5-1,0 % гликогена, печень – от 4-6%. Если с помощью 2,4-динитрофенола блокировать окислительное фосфорилирование, то животное сможет интенсивно двигаться около 1 часа.

3. Окислительное фосфорилирование.

Возможности аэробного генерирования АТФ почти безграничны, поскольку субстраты окисления при условиях нормального питания практически неисчерпаемы.

4. миокиназная реакция.

Суть данного процесса состоит в том, что макроэргическая фосфатная группа переносится с одной молекулы АДФ на другую в присутствии миокиназы, в результате чего восстанавливается 1 АТФ и образуется молекула АМФ, которая дезаминируется аденозинфосфатдезаминазой и превращается в инозинмонофосфорную кислоту.

Соотношение указанных путей ресинтеза АТФ при конкретной мышечной деятельности зависит от интенсивности и длительности последней. В пусковой фазе ресинтез АТФ происходит анаэробными путями: с помощью креатинкиназной реакции и гликолиза. Если интенсивность мышечной деятельности максимальна, а длительность кратковременна, то на этой пусковой фазе она и заканчивается.

При работе субмаксимальной интенсивности, но большей длительности значение креатинкиназного пути уменьшится, гликолиз будет еще

достаточно интенсивен, но включается и окислительное фосфорилирование. Субстратом гликолиза является в данном случае не глюкоза гликогена, а глюкоза, приносимая кровью из печени. Происходит мобилизация продуктов расщепления липидов: жирных кислот и глицерина. Снижение уровня АТФ замедлится, расходование мышечного гликогена станет менее значительным, а уровень креатинфосфата может несколько повыситься вследствие частичного его ресинтеза.

При мышечной деятельности еще меньшей интенсивности и большей длительности после кратковременной пусковой фазы преобладающее значение получает дыхательный ресинтез АТФ. Уровень АТФ и креатинфосфата в мышцах повышается и стабилизируется.

Таким образом, существует определенная последовательность включения и преобладания различных путей ресинтеза АТФ по мере продолжения мышечной деятельности: первые 2-3 с расщепляется только АТФ, от 3 до 20 с - преимущественно креатинфосфат, через 30-40 с максимальной интенсивности достигает гликолиз, затем преобладает аэробное окисление. В особых ситуациях включается миокиназный путь.

При напряженной работе большой интенсивности на долю углеводов приходится 67% энергопродукции, на долю аэробно окисляемых жирных кислот – 33%. В условиях устойчивого состояния за счет углеводов покрывается 13-42% энергозатрат, за счет жирных кислот – 58-87%.

К альтернативным функциям клеточного дыхания относятся:

- рассеивание энергии дыхания при терморегуляции,
- образование полезных соединений, как промежуточных продуктов аэробного метаболизма,
- обезвреживание эндо- и экзогенных токсических веществ (I стадия биотрансформации),
- ускорение эволюции путем накопления мутаций вследствие образования активных форм кислорода и их влияния на структуру ДНК.

Интеграция и регуляция энергетического метаболизма.

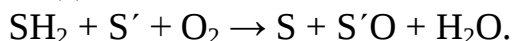
Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита. Нефосфорилирующее дыхание как механизм, предотвращающий образование активных форм кислорода.

Кислород играет ключевую роль в энергетике большинства живых организмов, так как служит окислителем питательных веществ при дыхании животных, растений, грибов и бактерий. Без кислорода существуют лишь сравнительно немногочисленные анаэробные виды, покрывающие свои энергетические потребности за счет брожения.

Основная часть клеточного запаса кислорода (80-90%) используется по оксидазному пути в дыхательной цепи митохондрий:

$\text{SH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{S} + \text{H}_2\text{O}$, причем активатором кислорода в данной реакции выступает цитохромоксидаза.

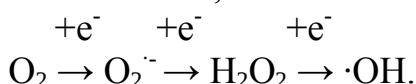
Большая часть оставшегося кислорода расходуется по монооксигеназному пути, причем, главным образом, в окислительных цепях эндоплазматического ретикулума клеток печени и митохондриях клеток коры надпочечников:



Таким образом, основным продуктом реакций биологического окисления, использующих кислород, является вода.

Однако высокая окислительная способность кислорода, необходимая для его функционирования в дыхательной системе, становится опасной, если принять во внимание возможность протекания самопроизвольных неферментативных химических реакций окисления кислородом различных веществ живой клетки. Эти реакции всегда начинаются с одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода с образованием супероксид-анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot -}$).

Окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot -}$ расположен в отрицательной области (-0,2 В), а кинетические барьеры реакций одноэлектронного восстановления кислорода веществами клетки достаточно высоки. Поэтому процесс образования в клетке супероксид-анион-радикала протекает медленно, однако представляет определенную опасность при его накоплении в количествах, превышающих физиологический базовый уровень, поскольку окислению будут подвергаться любые соединения клетки с соответствующим ок/red потенциалом. Более того, в реакции дисмутации $\text{O}_2^{\cdot -}$ служит источником пероксида водорода, который, в свою очередь, восстанавливаясь, обеспечивает появлением гидроксид-радикала ($\cdot\text{OH}$):



Окислительно-восстановительный потенциал системы ($\cdot\text{OH} + \text{H}^+$)/ H_2O составляет +1,35 В, а реакционная способность $\cdot\text{OH}$ очень велика. Поэтому данный радикал способен окислять с высокой скоростью практически любое вещество клетки, включая ДНК.

Именно поэтому клетка обладает системой антиоксидантной защиты, которая включает в себя:

1. фермент супероксиддисмутазу (катализирует превращение $\text{O}_2^{\cdot -}$ в пероксид водорода);
2. фермент каталазу (катализирует разложение H_2O_2 с образованием воды и молекулярного кислорода);
3. ферменты пероксидазы (используют пероксид водорода для окисления специфических субстратов);
4. антиоксиданты мембран (витамины групп Е, А, каротиноиды) и антиоксиданты цитозоля (аскорбиновая кислота, карнозин, ансерин) (прерывают цепные реакции, индуцированные одноэлектронным восстановлением кислорода).

Благодаря наличию и функционированию системы антиоксидантной защиты, уровень активных форм кислорода в норме не превышает допустимый физиологический предел, необходимый для реализации активными формами кислорода их биологических функций. Физиологическая роль радикалов кислорода в явлениях онтогенеза заключается в:

1. активации реакций, связанных с морфогенезом растений, например, супероксидный анион-радикал участвует в растяжении листовых пластинок растений;

2. контроль реакций сверхчувствительности и апоптоза;

3. выполнение функции вторичных мессенджеров в сигнальной трансдукции в геном, в том числе при стрессе, что может быть связано с изменением редокс-потенциала различных сенсорных белков. Активные формы кислорода способны окислять редокс-чувствительные белки непосредственно или опосредованно через молекулы, контролирующее окислительно-восстановительное состояние клетки (глутатион). Изменяя степень окисленности/восстановленности серы в составе тиольных групп, или окисляя FeS-кластеры, активные формы кислорода способны влиять на конформацию белковых молекул и, следовательно, - функциональную активность.

4. обеспечении реакций клеточного иммунитета (окислительный путь инактивации микроорганизмов, раковых клеток и др.);

5. ускорении обновления костной ткани: разрушение кости остеокластами с использованием активных форм кислорода является обязательным условием ее обновления.

6. стимулировании образования в клетке цАМФ и цГМФ, накопления ионов Ca^{2+} в цитозоле и фосфорилирования белков в результате активации протеинкиназ (особенно протеинкиназы C) и др.

Универсальная роль биологических мембран в энергообеспечении животных, растительных и бактериальных клеток.

Основные процессы энергообеспечения живых систем – фотосинтез и дыхание – локализованы в клеточных мембранах. Разрушение мембран сопровождается потерей способности к аккумуляции энергии, освобождаемой при использовании энергетических ресурсов. Увеличение проницаемости мембран приводит к утечке энергии, рассеивающейся в виде тепла.

Мембранные структуры, в которых локализованы ферменты переноса электронов и сопряженного с ним фосфорилирования, называются сопрягающими мембранами. К ним относятся внутренние мембраны митохондрий, мембраны тилакоидов хлоропластов, хромофоров фотосинтезирующих бактерий, клеточные мембраны бактерий. Все перечисленные мембраны способны образовывать АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет утилизации энергии, освобождающейся при

переносе электронов и (или) протонов. Сопрягающие мембраны имеют толщину 7-9 нм и характеризуются преобладанием белков над липидами. Среди белков около 1/3 составляют ферменты, осуществляющие перенос электронов: цитохромы, флавопротеины и FeS-белки.

Помимо сопрягающих мембран существует ряд биологических мембран, неспособных к процессу окислительного фосфорилирования АДФ неорганическим фосфатом. Таковыми являются внешняя мембрана митохондрий, мембраны эндоплазматического ретикулума, внешние плазматические мембраны животных и растительных клеток. В этих мембранах встречаются ферменты, осуществляющие гидролиз АТФ сопряжено с транспортом неорганических ионов (АТФазы). При обращении работы этих ионных помп экспериментально установлена возможность синтеза АТФ. Однако эти мембранные структуры не являются сопрягающими, так как реакция фосфорилирования в них осуществляется за счет энергии ионных градиентов, а не при использовании энергии, освобождающейся в процессе переноса электронов по оксидоредуктазным цепям.

Регуляция потоков восстановительных эквивалентов между цитозолем и митохондриями. Участие челночных систем в окислении немитохондриального НАДН.

Восстановленный НАДН, образующийся в цитоплазме, например, при катаболизме углеводов, не проникает через мембрану митохондрий и поэтому не может непосредственно использоваться для окисления кислородом и образования энергии. Транспорт водорода между немитохондриальным и внутримитохондриальным пространствами осуществляется с помощью так называемых челночных систем.

Наиболее важной из них является малат-аспартатный челночный цикл. Водород НАДН цитоплазмы собирается оксалоацетатом, который восстанавливается в малат с помощью изоферментов малатдегидрогеназы цитоплазмы. Малат является восстановительным эквивалентом НАДН.

Малат проникает через митохондриальную мембрану с помощью переносчика, обмениваясь с 2-оксоглутаратом, который выходит из митохондрий в цитоплазму, то есть наблюдается антипорт малата и 2-оксоглутарата. В митохондриях малат отдает водород внутримитохондриальному НАД^+ с помощью малатдегидрогеназы. Образовавшийся оксалоацетат не проникает через мембрану митохондрий. Его транспортной формой является аспартат, который образуется в митохондриях при переаминировании оксалоацетата с глутаматом. Аспартат путем антипорта с глутаматом переходит в цитоплазму, где превращается в оксалоацетат, и цикл замыкается. В результате челночных перемещений метаболитов этого цикла за один акт переносится пара атомов водорода из цитоплазмы в митохондрию.

Другой путь транспорта водорода – глицерофосфатный челночный цикл. Он активно функционирует в летательных мышцах насекомых, в клетках человека и животных малоактивен.

НАДН восстанавливает диоксиацетонфосфат, образовавшийся глицеролфосфат легко проникает через мембрану митохондрий. Внутри митохондрий глицеролфосфатдегидрогеназа окисляет глицеролфосфат до диоксиацетонфосфата. Образующийся ФАДН₂ используется не только для введения восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь, но и для терморегуляции, так как большая его часть окисляется путем свободного окисления. Освобождающаяся тепловая энергия позволяет избежать наступления равновесия реакций глицерофосфатного челночного цикла и создает условия для его непрерывной работы.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе эффекта Пастера. Если в суспензию анаэробных клеток, потребляющих глюкозу с большой интенсивностью, ввести O₂, то уровень потребления глюкозы резко понизится, одновременно с этим прекратится накопление лактата. Этот эффект, характерный для факультативных анаэробов, называется эффектом Пастера. Эффект Пастера – пример взаимосвязи анаэробных и аэробных путей получения энергии. Биологический смысл данного явления: для того, чтобы образование АТФ в анаэробных условиях происходило с такой же скоростью, что и в аэробных, потребление глюкозы должно быть эффективнее в 19 раз.

При гликолизе лактат образуется из пирувата за счет НАДН, восстановленного на стадии триоз. В аэробных условиях НАДН, образовавшийся в результате гликолиза, вновь окисляется, но не за счет пирувата, а с помощью челночной системы и дыхательной цепи, которые опережают лактатдегидрогеназу в конкуренции за НАДН.

Интеграция и регуляция энергетического обмена.

Основные задачи энергетического обмена – генерирование АТФ, восстановительных эквивалентов и строительных блоков для биосинтетических реакций.

1. Генерирование АТФ как обязательный аспект жизнедеятельности. Высокий потенциал переноса фосфатной группы у АТФ позволяет ему служить универсальным макроэргом. Гидролиз 1 АТФ изменяет равновесное соотношение концентраций веществ, вступающих в сопряженную реакцию, и ее продуктов примерно в 10⁸ раз, таким образом, термодинамически невыгодную последовательность реакций можно сделать выгодной, если осуществить ее сопряжение с гидролизом достаточного числа молекул АТФ. Образование АТФ происходит, главным образом, из глюкозы и жирных кислот, как в анаэробных (гликолиз), так и аэробных (цикл Кребса и дыхательная цепь) условиях.

2. Образование НАДФН как основного донора электронов в восстановительных реакциях биосинтеза. В большинстве биосинтетических

реакций продукты находятся в более восстановленном состоянии, чем предшественники, поэтому помимо АТФ необходим восстановительный эквивалент. Необходимое количество НАДФН образуется в пентозофосфатном пути и под действием малатдегидрогеназы при переносе ацетил-КоА из митохондрий в цитоплазму для синтеза жирных кислот.

3. Образование строительных блоков для биосинтетических реакций.

В живом организме крупные молекулы строятся из сравнительно небольшого числа блоков. При этом реакции, в ходе которых образуются АТФ и НАДФН, поставляют строительные блоки для синтеза более сложных молекул. Например, дигидроксиацетонфосфат, образующийся при гликолизе, превращается в глицероловый скелет фосфатидилхолина. Сукцинил-КоА, промежуточный продукт цикла Кребса, - предшественник порфиринов и т.д.

Биосинтез и расщепление почти всегда осуществляются различными путями. Благодаря этому процессы расщепления и синтеза постоянно оказываются термодинамически выгодными. Принципиально важно, что скорость протекания метаболических реакций определяется не законом действующих масс, а активностью ключевых ферментов.

В регуляции энергетического обмена выделяются следующие особенности:

- аллостерическая регуляция ферментов, катализирующих начальные и ключевые реакции соответствующего пути, например, фосфофруктокиназы (гликолиз).

- регуляция посредством ковалентной модификация ферментов. Это заключительная стадия каскада реакций, усиливающих сигнал. Благодаря этому метаболический путь может быстро включаться и выключаться под действием очень слабых сигналов.

- регуляция посредством изменения концентрации ферментов. Скорости синтеза и деградации регуляторных ферментов регулируются гормональными факторами.

- регуляция посредством изменения компартментализации биомолекул. Превращения некоторых молекул определяется тем, где они находятся. Например, жирные кислоты, будучи перенесенными в митохондрии, быстро расщепляются, тогда как в цитоплазме они эстерифицируются или выделяются во внеклеточное пространство.

- метаболическая специализация органов. Энергетический обмен в мозге, мышцах, печени и жировой ткани сильно различается. Например, глюкоза – практически единственный источник энергии в мозге человека за исключением условий продолжительного голодания, когда в качестве источника энергии для мозга выступают кетоновые тела. Основные источники энергии в скелетной мускулатуре – глюкоза, жирные кислоты, кетоновые тела. Основным и единственным источником энергии в жировой ткани является глюкоза. В качестве источника энергии в печени выступают кетокислоты.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Учебно-методическое пособие

Биоэнергетика. Практикум: учеб.-метод. пособие/ сост. Губич О.И. – Минск: БГУ, 2016. – 87 с.

доступно по адресу <http://elib.bsu.by/handle/123456789/152466>

В пособии приводятся методы количественного и качественного определения макроэргических соединений в биологическом материале, способы определения активности ключевых ферментов энергетического обмена и антиоксидантной защиты клетки, приемы, используемые для исследования процесса окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий и процессов активного транспорта ионов, а также вопросы и задания для итогового контроля знаний по курсу “Биоэнергетика”. Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-31 01 01 “Биология” (по направлениям), 1-31 01 02 “Биохимия”.

Учебно-методическое пособие

Биохимия : справочник студента / Сост. Кукулянская Т.А., Орел Н.М.. - Минск: БГУ, 2011. - 83 с.

доступно по адресу <http://elib.bsu.by/handle/123456789/25799>

В справочнике по биохимии приводятся данные об основных свойствах химических веществ, правилах приготовления растворов и реактивов. Кратко изложены методические указания для проведения количественного и качественного исследования биополимеров, основные правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории. Предназначено для студентов биологического факультета.

3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Структура рейтинговой системы

Структура рейтинговой системы приведена в учебной программе УВО по дисциплине «Биоэнергетика» по специальности 1-31 01 02 Биохимия, которая доступна по адресу

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/162249>

Задания и тесты для самоконтроля

Задания и тесты для контроля самостоятельной работы студентов представлены в пособии **Биоэнергетика.** Практикум. / Губич О.И. – Минск: БГУ, 2016. – 87 с., которое доступно по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/152466>.

Темы рефератов

1. Энергетическое обеспечение процессов мембранного транспорта.
2. Энергетика мышечного сокращения.
3. Этапы синтеза белков, протекающие с затратой энергии.
4. Этапы синтеза углеводов, протекающие с затратой энергии.
5. Этапы синтеза липидов, протекающие с затратой энергии.
6. Этапы синтеза нуклеиновых кислот, протекающие с затратой энергии.
7. Дыхание как механизм обезвреживания чужеродных соединений.
8. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита.
9. Эволюция биоэнергетических механизмов.
10. Бактериородопсин, его биологическая роль.
11. История развития биоэнергетики.
12. Характеристика энергетической системы хлоропластов.
13. Роль ионов натрия в мембранной энергетике: натриевый цикл морских щелочеустойчивых и анаэробных бактерий.

Вопросы для подготовки к экзамену

1. История развития учения о биологическом окислении.
2. Источники углерода и энергии для жизнедеятельности клеток.
3. Источники энергии в биологических системах.
4. Природа макроэргических связей. Роль и значение АТФ в биоэнергетических процессах.
5. Высоко- и низкоэнергетические фосфорилированные соединения, высокополимерные полифосфаты.
6. Высокоэнергетические нуклеотид-5-трифосфаты и их роль в биоэнергетике клетки.
7. Роль и значение АТФ в биоэнергетических процессах.
8. Внутриклеточная локализация механизмов энергетического обмена.
9. Химизм и баланс энергии гликолиза.
10. Молекулярные механизмы аккумуляции энергии в реакциях субстратного фосфорилирования гликолиза.
11. Энергетическая значимость пентозофосфатного пути окисления углеводов.
12. Фосфорокластические реакции.
13. Накопление энергии при окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты.

14. Накопление энергии при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты.
15. Энергообразующая функция цикла Кребса. Баланс энергии.
16. Анаплеротические реакции цикла Кребса.
17. Регуляция цикла Кребса оксалоацетатом, ацетил-КоА, цитратом, системой нуклеотидов.
18. Механизм субстратного фосфорилирования в цикле Кребса.
19. Химический состав и структура митохондрий.
20. Реакции переноса электронов, окислительно-восстановительные потенциалы и изменение свободной энергии.
21. Ультраструктура внутренней митохондриальной мембраны. Дыхательные ансамбли.
22. Обратный транспорт электронов, его особенности и значение.
23. Характеристика компонентов митохондриальной цепи переноса электронов. Последовательность их расположения.
24. Генераторы мембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий, механизм их действия.
25. Локализация пунктов сопряжения в дыхательной цепи.
26. Фракционирование и реконструкция компонентов дыхательной цепи.
27. Конформационная гипотеза сопряжения окисления и фосфорилирования.
28. Химические гипотезы сопряжения.
29. Хемиосмотическая гипотеза сопряжения Митчелла.
30. Разобщающие агенты и ингибиторы процесса окислительного фосфорилирования.
31. Жирные кислоты – разобщители процесса окислительного фосфорилирования.
32. H^+ -АТФаза: строение, механизм действия, биологическая роль.
33. Характеристика основных состояний митохондрий.
34. Эффективность окислительного фосфорилирования (коэффициенты P/O , ADP/O , дыхательный контроль).
35. Энергетическая эффективность анаэробного и аэробного превращения дыхательного субстрата.
36. Участие челночных систем в окислении немитохондриального НАД.
37. Транспортные системы митохондрий.
38. Молекулярные механизмы, лежащие в основе эффекта Пастера.
39. Альтернативные пути транспорта электронов.
40. Дыхание как процесс, ускоряющий эволюцию.
41. Нефосфорилирующее дыхание – механизм, предотвращающий образование активных форм кислорода.
42. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита.
43. Митоптоз – запрограммированная смерть митохондрий

44. Апоптоз, роль активных форм кислорода в развитии программируемой клеточной гибели.
45. Этапы синтеза липидов, протекающие с затратой энергии.
46. Энергетическое обеспечение процессов мембранного транспорта.
47. Этапы синтеза белков, протекающие с затратой энергии.
48. Этапы синтеза нуклеиновых кислот, протекающие с затратой энергии.
49. Этапы синтеза углеводов, протекающие с затратой энергии.
50. Теплообразующая функция биомембран.
51. Механизм и энергетика мышечного сокращения.
52. Альтернативные функции клеточного дыхания.
53. Взаимосвязь различных типов энергетического обмена.
54. Интеграция и регуляция энергетического обмена клетки.
55. Универсальная роль биологических мембран в энергообеспечении животных, растительных и бактериальных клеток.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Учебно-программные материалы

Типовая учебная программа для высших учебных заведений по специальности 1-31 01 02 Биохимия (Биоэнергетика. Регистрационный № ТД-G454/тип., 2013 г.)

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/156125>.

Учебная программа УВО по специальности 1-31 01 02 Биохимия
<http://elib.bsu.by/handle/123456789/162249>

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов приведен в типовой программе по учебной дисциплине «Биоэнергетика», которая доступна по адресу: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/162249>