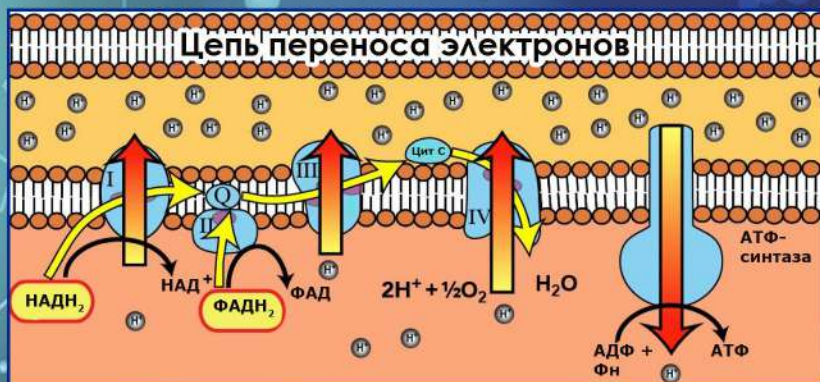


АМИРОВА М.Ф.

ВСЁ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ: ОТ “А” ДО “Я”





Именем Аллаха Милостивого Прощающего

Светлой памяти павших за освобождение
территории Азербайджана, Нагорного Карабаха,
от армянских оккупантов посвящается.

**АЗЕРБАЙДЖАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

М.Ф.Амирова

ВСЕ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ: ОТ «а» до «я»

Учебное пособие

*Одобрено протоколом № 6 заседания
Ученого Совета Азербайджанского
Медицинского Университета
от 02 июля 2021 года*

Баку - 2021

Автор:**М.Ф. Амирова***Сотрудник кафедры биохимии, д.ф.б.н., доцент***Рецензенты:****Азизова Г.И.***Проф, зав.каф.биохимии АМУ, д.б.н.***Дадашева А.Р.***Ст.преп.каф. биохимии АМУ, д.ф.б.н.***Дашдамирова Г.С.***Асс.каф. биохимии АМУ, д.ф.б.н.***Азизов Г.Р.***Ст.преп. Академии Физ.
Культуры и Спорта, д.ф.м.н.а***DOI: <https://www.doi.org/10.36719/2022/160>**

**Магира Фирудин гызы Амирова. ВСЕ О БИОЛОГИЧЕСКОМ
ОКИСЛЕНИИ: от «а» до «я» учебное пособие. - Баку: “Шафа
Полиграф”, 2021-160 с.**

<https://orcid.org/0000-0001-5598-6995>

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	6
----------------	---

I. Биологическое окисление

I.1. Общее понятие о живых системах и способах получения ими энергии	8
I.2. Макроэргические связи, макроэргические соединения и их роль в организме. Важнейший аккумулятор и источник энергии – АТФ.....	14
I.3. История учения о биологическом окислении	24
I.3.1. Современные представления о биологическом окислении	28
I.3.2. Понятие о свободной энергии	29
I.3.3. Образование субстратов тканевого дыхания. Этапы унифицирования энергии пищевых веществ ...	31
I.3.4. Основные пути использования кислорода в клетке.....	31
I.4. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции	33
I.4.1.Оксидазы	34
I.4.2. Оксигеназы	35
I.4.2.1. Монооксигеназы.....	35
I.4.2.1.1. Микросомальные монооксигеназные системы	36
I.4.2.1.2. Митохондриальные монооксигеназные системы.....	40
I.4.2.2. Диоксигеназы	41
I.4.3. Пероксидазы. Свободные радикалы кислорода	42
I.4.3.1. Образование активных форм кислорода	43
I.4.3.1.1. Ферментативные реакции образования активных формкислорода _	44
I.4.3.1.2. Неферментативные реакции образованияактивных форм кислорода _	45
I.4.3.2. Физиологические функции активных форм кислорода	46

I.4.3.3. Повреждающее действие активных форм кислорода в организме	48
I.4.4. Антиоксидантная система организма.....	48
I.4.4.1. Ферментативная антиоксидантная система	49
I.4.4.2. Неферментативная антиоксидантная система.....	51
I.4.4.3. Соединения для связывания двухвалентного железа	55
I.5. Использование кислорода с целью обеспечения клетки энергией	55
I.5.1. Общие пути окисления пищевых субстратов	55
I.5.1.1. Окисление пирувата пируват-дегидрогеназным (пируват-декарбоксилазным) комплексом	56
I.5.1.2. Окисление ацетата в цикле Кребса.....	59
I.5.1.2.1. Энергетический баланс одного оборота ЦТК	65
I.6. Окислительное фосфорилирование, или дыхательная цепь	65
I.6.1. Митохондрия: особенности химического состава и строения	65
I.6.2. Роль митохондрий в метаболизме и гомеостазе клетки	67
I.6.3. Причины повреждений митохондрий и их последствия	67
I.7. Электрохимический потенциал	70
I.8. Компоненты цепи переноса электронов	73
I.8.1. Особенности ферментов ЦПЭ	77
I.8.2. Подсчет высвобождаемой в цпэ энергии	97
I.8.3. Механизм образования АТФ в митохондриях	102
I.8.4. Современные представления о механизме окислительного фосфорилирования	108
I.8.4.1. Сопряжение окисления и фосфорилирования. Основные домены АТФ-азы	109
I.8.4.2. Структура и работа «мотора» АТФ-синтазы	114
I.8.5. Разобщение фосфорилирования и окисления в митохондриях	122

I.8.6. Расчет коэффициента окислительного фосфорилирования	126
I.8.7. Транспорт веществ через мембрану митохондрий	127
I.8.8. Теплопродукция	130
I.8.9. Дыхательный контроль	131

II. Структурные особенности ферментов, участвующих в реакциях окисления-восстановления

II.1. Особенности строения доменов каталитического центра алкоголь дегидрогеназ (EC 1.1.1)	132
II.2. Структурные особенности активного центра альдегид-дегидрогеназ (EC 1.2.1).....	137
II.3. Эноил-редуктазы (EC 1.3.1): флаavin-содержащие ферменты. Механизм перемещения водорода на субстрат	141
II.4. Механизм переноса аминокислот. глутамат-дегидрогеназы и фенилаланин- дегидрогеназы (EC 1.4.1)	143
Список использованной литературы _	145

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое окисление – это сложный биохимический процесс, тонко регулируемый клетками организма по принципу «спрос рождает предложение». Процессы биологического окисления представляют собой огромный интерес и интенсивно изучаются учеными всего мира. На данный момент открыты структурные особенности многих ферментов, участвующих в биологическом катализе, ведущем к извлечению энергии из органических молекул, однако до сих пор остаются «белые пятна» в понимании механизмов передачи энергии от одних химических веществ к другим и конечного воплощения энергии в химических связях так называемой «энергетической валюты», аденозин трифосфата (АТФ).

В данном учебном пособии представлены основные моменты биологического окисления, используемого как для образования энергии, так и с пластической целью, а иногда и с целью защиты клеток от инородных веществ (как например, в системе иммунной защиты организма и цитохрома Р₄₅₀). Учитывая сложность темы, автор уделила особое внимание понятиям трансформации энергии; поэтапное пояснение процессов биологического окисления служит облегчению восприятия материала. Учебное пособие отличается высокой систематизацией материала, что также служит целям облегчения усвоения материала. Учебное пособие представляет вниманию читателей интересные моменты синтеза АТФ в митохондриях клеток, а также сегодняшние проблемы, все еще ожидающие своей разработки со стороны ученых. Внимательно прослеживая процессы окисления, направленные на поддержание жизнедеятельности организма, невозможно не заметить, настолько они слажены и целесообразны, что однозначно указывают на создание

организма Единым Творцом - Аллахом. Ученые сегодняшнего дня, разрабатывающие методы достижения высоких олимпийских показателей, также изучают процессы биологического окисления, что помогает им в поиске максимально эффективных путей энергообеспечения организма спортсмена во время соревнований, требующих неимоверного труда. Прикладная сторона изучения и применения ферментов биологического окисления состоит также в том, что они интенсивно внедряются в жизнь для обеспечения населения продуктами индустрии. Для этого учеными используются белковые модификации ферментов, позволяющие направлять процессы по требуемому пути метаболизма с получением в конечном итоге необходимого продукта. С помощью новейших методов исследования на сегодня расшифрована структура основных доменов активного центра, что помогает глубже понять процессы регуляции клеточного метаболизма и тонкий механизм участия ферментов в процессе катализа. В учебном пособии собраны материалы, позволяющие ознакомиться с передовыми разработками ученых в этом направлении. Подводя итог вышесказанному, можно смело сказать, что как сами процессы биологического окисления, так и обеспечивающие окисление компоненты еще долго будут изучаться и вносить свой вклад в понимание молекулярных, и даже более глубоких механизмов регуляции организма.

Учебное пособие состоит из двух взаимосвязанных частей. Первая часть детально, с рассмотрением субъединиц катализа, рассматривает процессы биологического окисления в живых системах и предназначена для студентов медицинских ВУЗов в качестве учебного пособия. Вторая часть посвящена последним научным разработкам, ведущимся в области изучения субклеточных структур, обеспечивающих окислительно-восстановительные процессы и методам их практического использования.

I. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

I.1. Общее понятие о живых системах и способах получения ими энергии.

Люди, животные и растения получают энергию, необходимую для их физического существования, из окружающей их среды. В зависимости от того, какой источник используется ими для получения энергии, все организмы делятся на фототрофы (живущие за счет собственного фотосинтеза) и хемотрофы (существующие за счет химических веществ, поглощаемых из других организмов). К фототрофам относятся некоторые цианобактерии, галобактерии; гелиобактерии и некоторые несерные бактерии. Хемотрофы не зависят от солнечной энергии и извлекают энергию химических веществ в окислительно-восстановительных реакциях. Хемотрофы в свою очередь, делятся на хемо-автотрофы (от древнегреческого αὐτός - «сам» и τροφή - «пища») и хемо-гетеротрофы (от древнегреческого ἕτερος - «иной», «различный» и τροφ - «пища») [1]. Хемо-автотрофы - это микроорганизмы, синтезирующие органические вещества из неорганических за счет хемосинтеза. В качестве восстановителей (доноров протонов и электронов) они используют такие неорганические соединения как сероводород, сера, аммоний и железо, а также способны синтезировать органические соединения из углекислого газа. Они живут в глубоководных источниках, куда не проникает солнечный свет; это сероокисляющие бактерии, метаногены, галофилы, термоацидофилы, нитрификаторы и другие организмы, обитающие в экстремальных условиях. Хемо-гетеротрофы не

могут синтезировать органические вещества из неорганических; они делятся на хемо-лито-гетеротрофы и хемо-органогетеротрофы. Хемо-органогетеротрофы получают энергию и углерод из органических соединений, таких как белки, углеводы и липиды. Все животные и человек входят в эту категорию живых существ. Хемо-лито-гетеротрофы – это микроорганизмы, получающие энергию из окисления неорганических соединений. Они способны использовать восстановленные неорганические соединения в качестве дополнительного источника энергии, но для построения своего организма используют органический углерод внешней среды. К хемо-лито-гетеротрофам относятся сульфатвосстанавливающие бактерии и метанобразующие археи [2]. В то же время в зависимости от метода построения своих макромолекул из полученных питательных веществ, организмы делятся на аутоотрофы и гетеротрофы. Аутоотрофы, т.е. растения и некоторые бактерии-аутоотрофы преобразовывают энергию солнечного излучения в энергию химических связей, включаемых во вновь синтезированные молекулы. Тогда как гетеротрофы строят свой организм используя уже готовые, синтезированные растениями молекулы, поскольку неспособны сами синтезировать органические вещества. Энергия, извлекаемая гетеротрофами при распаде этих молекул, используется также для погашения своих собственных нужд в энергообеспечении. Представленная ниже диаграмма отражает приблизительное распределение ферментов различных классов, используемых в процессах жизнедеятельности клеток в живых системах.

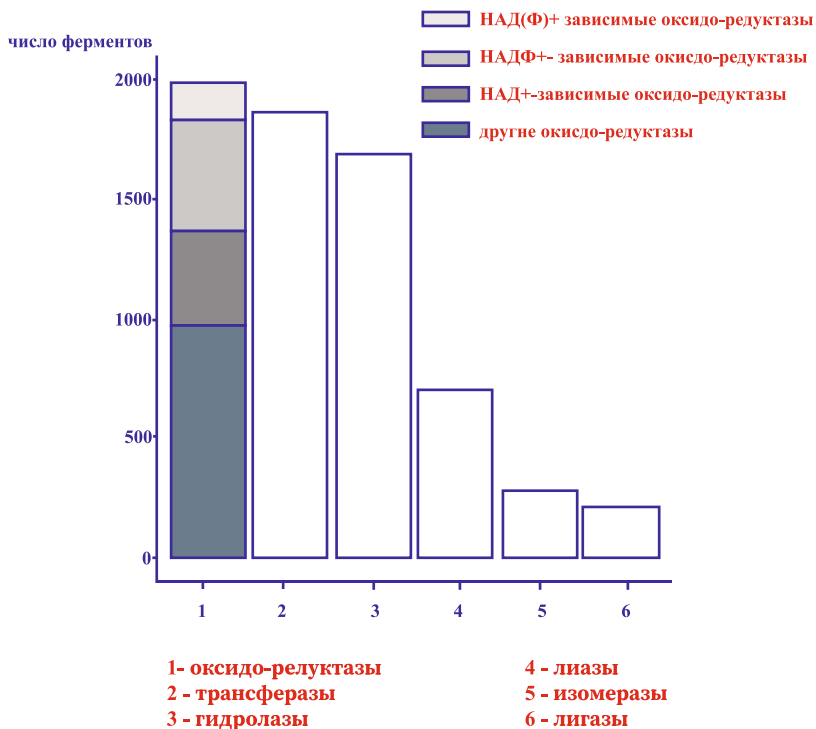


Рис. 1. Количество ферментов, участвующих в каждом типе химических реакций. На долю оксидо-редуктаз приходится почти 30% общей ферментативной активности клеток, причем 50% из них используют в качестве кофактора НАД⁺/НАДН₂ и/или НАДФ⁺/НАДФН₂.

Как видно из рис. 1, основная часть клеточных ферментов задействована в реакциях окисления – восстановления, что еще раз указывает на важность процессов энергообеспечения для поддержания существования любого организма. Главными источниками энергии для человеческого организма являются такие питательные вещества как углеводы, жиры, белки, которые в первую очередь при распаде превращаются в пировиноградную кислоту, а затем обычно в

активную форму ацетата – ацетил-КоА. Если в среде присутствует кислород, то пируват далее включается в первый и второй общие пути катаболизма. Но если кислород отсутствует, то некоторые организмы, такие как дрожжи и молочнокислые бактерии, используют затем пируват в реакциях внутримолекулярного окисления, превращая его соответственно в этанол и лактат.

Поскольку вся комбинация окислительно-восстановительных реакций, протекающих в организме, называется **биологическим окислением**, понятно что эти реакции сопровождаются перераспределением электронов между атомами и изменением степени окисления этих атомов. Сам же механизм биологического окисления может быть разнообразным и зависит от вида организма, его метаболического статуса и присутствия кислорода в среде. В зависимости от наличия или отсутствия кислорода в реакциях окисления, все реакции катаболизма делятся на аэробные и анаэробные. В присутствии кислорода многие эукариоты переходят на аэробный путь окисления, для выживания же в среде где кислород отсутствует, такие организмы как факультативные анаэробы (например, дрожжи) переключаются на анаэробный путь окисления. Однако некоторые организмы являются облигатными анаэробами, т.е. они используют исключительно анаэробный путь окисления субстратов и даже погибают в присутствии кислорода. Как мы отметили выше, анаэробное окисление завершается образованием лактата, а иногда – этанола. Однако следует заметить, что гликолиз является общим путем, который задействован как в анаэробном, так и аэробном окислении. Так, при аэробном окислении образованные из глюкозы продукты (пируват) включаются в общие пути катаболизма, и затем – в реакции окислительного фосфорилирования. В этом случае одна часть реакций окисления протекает в цитоплазме, а другая часть – в митохондриях. При анаэробном же окислении

глюкозы продукты гликолиза превращаются либо в лактат, либо в этанол, что зависит от типа организма.

Главными источниками энергии животного организма являются в основном гликоген, иногда - жиры, и редко – белки, потому что белки дают не более 16% общей энергии, получаемой извне [3, 4]. Процесс извлечения энергии из макромолекул начинается с их расщепления в желудочно-кишечном тракте до простых составляющих, таких как глюкоза или фруктоза, жирные кислоты, глицерин и т.д. Этот процесс составляет **первую стадию** катаболизма. Иначе говоря, на первой стадии катаболизма все сложные макромолекулы расщепляются до своих мономеров: углеводы – до глюкозы, липиды – до глицерина и жирных кислот, белки – до аминокислот. Затем эти образованные в желудочно-кишечном тракте продукты переваривания поступают в кровоток и разносятся ко всем органам и тканям. На **второй стадии** катаболизма эти мономеры включаются в специфические реакции окисления: гликолиз, β -окисление, дезаминирование, декарбоксилирование. Все эти реакции протекают в анаэробных условиях и завершаются превращением в такие метаболиты как пируват, ацетил-КоА, α -кетоглутарат, оксалоацетат, сукцинил-КоА, фумарат и т.д. Затем названные продукты неполного расщепления пищевых компонентов поступают в митохондрии и включаются в общие пути катаболизма. Так начинается **третья стадия** катаболизма. Она включает в себя первый и второй общие пути катаболизма. Третья стадия катаболизма - крайне важная в процессе энергообеспечения живого организма. Она запускается только при наличии в митохондрии кислорода и наличии митохондрий в клетках. Так что можно сказать, что для эукариотических клеток высших организмов митохондрии столь же важны, как и включающее ДНК ядро. Раньше в литературе появлялись сообщения об обнаружении одноклеточных организмов

эукариот без митохондрий, однако они не были подтверждены. Но сейчас такой организм чешскими учеными найден: им оказались представленные на рис.2 микроорганизмы *Monocercomonoides*, родственные паразитам типа трихомонад и кишечных лямблий.

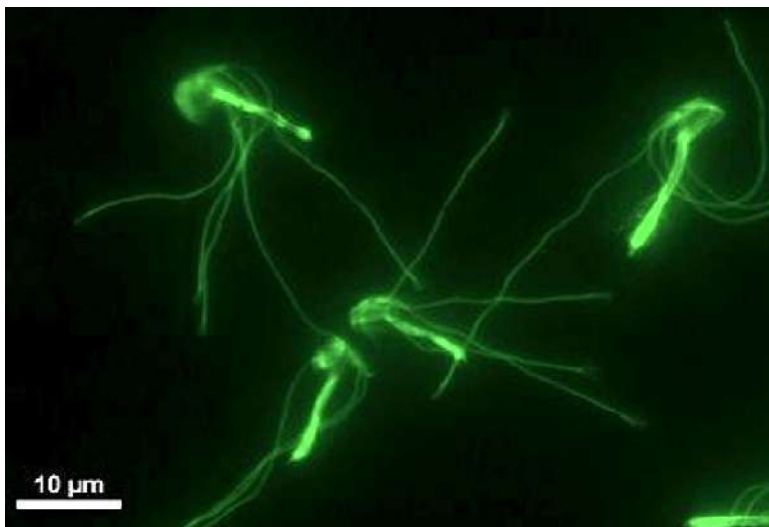


Рис.2. Микроорганизмы Monocercomonoides, увеличенные под микроскопом.

Было показано, что в этих клетках нет митохондрий, и они не могут синтезировать комплекс железосерных кластеров, кофакторов окислительно-восстановительных реакций, входящих в состав целого ряда митохондриальных белков и используемых в основном для клеточного дыхания. У *Monocercomonoides* функцию железо-серных белков выполняют цитозольные белки системы *Sulfur Mobilisation* [5]. Некоторые клетки многоклеточных организмов (эритроциты) также не имеют митохондрий, и потому существуют только за счет анаэробного окисления, гликолиза.

Митохондрия напоминает малый мешочек (внешняя мембрана), в который вставлен большой мешок (внутренняя

мембрана), отчего многократно сложившись, внутренний большой мешок образует кристы. Внутренняя полость митохондрии называется матрикс. Митохондриальный матрикс весьма компартментализирован благодаря наличию в нем крист, образованных глубокими складками внутренней мембраны. Заполняющий внутреннюю камеру митохондрии матрикс содержит весь набор ферментов первого и второго общих путей катаболизма: пируватдегидрогеназный комплекс и ферменты цикла Кребса. В матриксе митохондрии имеются также и другие ферменты, а именно – необходимые для β -окисления жирных кислот, катаболизма аминокислот, метаболизма нуклеиновых кислот и белков. Во время окисления поступающих в митохондрию молекул, образованных из пищевых компонентов энергия, содержащаяся в их связях, трансформируется в энергию макроэргических связей: в основном – в АТФ (аденозин трифосфат) и совсем немного – в ГТФ (гуанозинтрифосфат), а также других богатых энергией молекул.

1.2. Макроэргические связи, макроэргические соединения и их роль в организме. Важнейший аккумулятор и источник энергии - АТФ

В живых организмах существует большая группа органических фосфатов, гидролиз которых приводит к освобождению достаточно большого количества свободной энергии, и такие соединения называют высокоэнергетическими фосфатами, или макроэргами. Различные фосфорилированные соединения обладают разным запасом свободной энергии. К группе высокоэнергетических фосфатов помимо АТФ относят энол-фосфаты, ангидриды и фосфо-гуанидины. При гидролизе концевой фосфоангидридной связи высвобождается неорганический фосфат P_n , и АТФ превращается в АДФ. При этом изменение свободной энергии ве-

щества составляет около -7,3 ккал/моль. Величина свободной энергии гидролиза АТФ делает возможным его обратное образование из АДФ за счёт переноса фосфатного остатка от таких высокоэнергетических фосфатов как фосфоенол-пируват или 1,3-бис-фосфоглицерат. В свою очередь, АТФ может участвовать в таких эндергонических реакциях, как фосфорилирование глюкозы или глицерина с поднятием их на более высокий энергетический уровень. АТФ выступает также в роли донора энергии в эндергонических реакциях многих анаболических процессов. Однако некоторые биосинтетические реакции в организме могут протекать при участии других нуклеозид-трифосфатов, аналогов АТФ. К ним относят гуанозин-трифосфат, уридин-трифосфат (УТФ) и цитидин-трифосфат (ЦТФ). Все эти нуклеотиды образуются при использовании свободной энергии терминальной фосфатной группы АТФ. И наконец, за счёт свободной энергии АТФ совершаются различные виды работы, обеспечивающие жизнедеятельность организма, например, такие как мышечное сокращение или активный транспорт веществ и т.д. Таким образом, АТФ - это главный непосредственно используемый донор свободной энергии во всех биологических системах. Молекула АТФ расходуется в клетке в течение одной минуты после ее образования. Каждые сутки у человека образуется и разрушается количество АТФ, равное массе тела. Использование АТФ как источника энергии возможно только при условии непрерывного синтеза АТФ из АДФ, и происходит это всегда за счёт энергии окисления органических соединений. Цикл АТФ/АДФ - это основной механизм обмена энергии во всех биологических системах, так что АТФ - это универсальная «энергетическая валюта».

Высокоэнергетические фосфаты, образованные в процессах окисления, играют центральную роль в энергетическом метаболизме клетки. НАДН₂ и ФАДН₂ также богаты энергией, и даже содержат энергии в три раза больше чем в

АТФ и ГТФ. Помимо нуклеозид-трифосфатов клеткой в качестве источника энергии могут использоваться также ФЭП (фосфо-энолпируват), ЦТФ (цитидинтрифосфат), дифосфоглицерат, креатин фосфат и т.д. также, но уже не в качестве универсального донора энергии, а в специфических путях метаболизма. Итак, высокоэнергетические фосфаты, образующиеся в различных путях катаболизма, также играют центральную роль в энергетическом метаболизме клетки. В общей сложности все богатые энергией соединения можно классифицировать на 5 групп:

1) рибонуклеотид-5'-трифосфаты (АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ и т.д.)

2) карбоксил-фосфаты (ацетил-фосфат)

3) энол-фосфаты (фосфоэнол-пируват)

4) фосфамидные соединения (креатин фосфат)

5) ацил-тиоловые эфиры (ацетил-КоА).

Вышеперечисленные соединения отличаются по емкости энергии, заключенной в их высокоэнергетических связях. Энергия связи – это разность между энергией состояния, в котором составляющие части системы максимально удалены друг от друга, или иначе говоря, находятся в состоянии *покоя* (атомы вещества удалены и не контактируют друг с другом), и полной энергией *связанного* состояния системы (когда атомы находятся во взаимодействии):

$$\Delta E = \sum_{i=1}^N E_i - E$$

где ΔE – это энергия связи системы,

E_i – это энергия отдельного компонента в несвязанном состоянии,

E – это полная энергия связанной системы.

Богатые энергией соединения при гидролизе высвобождают из химической связи **более 21 кДж** энергии. Энергия

в ккал/моль, высвобождающаяся при расщеплении отдельных видов связи, в среднем выражается нижеперечисленными величинами:

C-H = 98 ккал/моль, O-H = 110 ккал/моль, C-C = 80 ккал/моль, C-O = 78 ккал/моль, H-H = 104 ккал/моль, C-N = 65 ккал/моль, O=O = 116 ккал/моль, C=C = 145, ккал/моль C=O=187 ккал/моль. Более точно характеризуют прочность связи между атомами данные, приведенные в нижеследующих таблицах (табл. 1 и 2). Чем больше энергия разрыва связи, тем значит прочнее химическая связь. Приводим энергию разрыва связей R-H:

Табл.1. Энергия разрыва связей между водородом и некоторыми атомами, а также группами атомов.

Тип связи : H-X	Энергия разрыва связи типа H-X в ккал/моль
H-H	104.2
H-OH	119
H-ОСН ₃	102
H-ОС ₆ Н ₅	85
H-F	135.8
H-Cl	103
H-Br	87.5
H-I	71.3
H-CH ₃	104
H-CH ₂ CH ₃	98
H-CH(CH ₃) ₂	94.5
H-C(CH ₃) ₃	91
H-C ₆ H ₅	103
H-CH=CH ₂	103
H-C≡CH	125
H-NH ₂	103

Из таблицы 1 видно, что максимальная энергия разрыва связи Н-Х наблюдается в случае Н-Н, минимальная – в соединении водорода с йодом.

Табл.2. Энергия разрыва связи С-С в различных соединениях [6].

Соединение типа С-С	Энергия разрыва связи С-С в ккал/моль
$\text{CH}_3\text{-CH}_3$	88
$\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{-C}(\text{CH}_3)_3$	67.5
$\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{-C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	15
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}_6\text{H}_5$	100
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	163
$\text{CH}\equiv\text{CH}$	230

В АТФ содержатся две макроэргические связи, тогда как в АДФ - всего одна. Высвобождение одного фосфата из состава АТФ требует расщепления связи гидролитическим путем и приводит к освобождению 7.3 ккал/моль энергии с образованием АДФ. Ферменты, которые переносят фосфатную группу АТФ на другие соединения, называются *киназами*. Обратная реакция, т.е. образование АТФ, когда неорганический фосфат присоединяется к АДФ или АМФ с образованием АТФ, называется *фосфорилированием*. Существуют 2 типа реакций фосфорилирования: 1) субстратное, 2) окислительное. Второй способ - это фосфорилирование в мембранах митохондрий в цепи переноса электронов (ЦПЭ). Окислительное фосфорилирование является источником основного пула АТФ в аэробных организмах. Окислительное фосфорилирование позволяет аэробам высвобождать много больше заключенной в субстратах энергии, нежели анаэробы. Во время этого процесса водороды, высвобождаемые от субстратов, соединяются с кислородом, что ведет к высвобождению имеющейся в них свободной энергии. Окислительное фосфорилирование является

столь основополагающим и жизни утверждающим процессом, что любые повреждения этого процесса ведут к летальному исходу [7]. Необходимые для этого процесса богатые энергией субстраты образуются в процессе окисления углеводов, жирных кислот и аминокислот. Окисление 1г углеводов до CO_2 и H_2O дает 4.1 ккал энергии, белки тоже дают 4.1 ккал энергии, тогда как полное окисление жиров, или триацилглицеридов (ТАГ) дает 9.3 ккал энергии [3,4].

Биологическое окисление включает в себя весь набор окислительно-восстановительных превращений различных веществ в живых системах. Окислительно-восстановительными называют реакции, протекающие с изменением степени окисления участвующих в реакции атомов вследствие перераспределения электронов между ними. Причина изменения степени окисления атомов заключается в том, что в реакциях между ионами и свободными радикалами происходит потеря, либо приобретение электронов. В таблице 3. приводится список важнейших природных восстановителей и окислителей.

Табл. 3. Важнейшие восстановители и окислители.

Важнейшие окислители	Важнейшие восстановители
Галогены	Металлы
Азотная кислота	Водород
Конц. серная кислота	Уголь
Оксид меди CuO	Оксид углерода CO
Перекись водорода	Сероводород
Хлорид железа FeCl_3	Оксид серы SO_2
Бертолетова соль	Азотистая кислота
	Аммиак
	Гидразин
	Оксид азота NO
	Катионы металлов в низших степенях окисления

Как видим, водород и металлы находятся в ряду важнейших восстановителей, а галогены, перекись водорода – наоборот, в ряду окислителей. Известно, что *окислением* называется потеря электронов и протонов, тогда как приобретение таковых называется *восстановлением*. Эта же концепция относится и к органическим ковалентным соединениям, хотя органические элементы больше склонны *делиться* электронами, нежели полностью отдавать или приобретать их. Но этот процесс, протекающий в органических системах, зачастую представляется упрощенно с одной лишь целью: для лучшего понимания сути процесса. Поэтому достаточно просто запомнить, что процесс окисления и восстановления в реакциях представляется намного проще, нежели он выглядит на самом деле. В отношении органических молекул *окислением* можно назвать тот процесс, в котором углерод приобретает связи с более электро-негативным элементом, чаще всего с кислородом. И наоборот, *восстановление* является процессом, в котором углерод приобретает связи с менее электро-негативным элементом, чаще всего с водородом. Нижеследующая схема наглядно помогает наиболее полно понять сказанное.



алкан спирт альдегид муравьиная кислота диоксид углерода

Соединением с наиболее восстановленным состоянием углерода является CH_4 , а наиболее окисленным состоянием углерода является CO_2 . Здесь необходимо отметить некоторые важные моменты. Так, несмотря на то что процесс происходит намного сложнее, чем просто изменение количества связей, для простоты понимания приобретение или потеря электронов органическим веществом представляется не более чем в виде манипуляции с количеством связей. Так, двойная связь воспринимается как две связи, а тройная – как три. Поэтому общепринято, что в функциональной карбоксильной группе ($-\text{C}=\text{O}$) углерод связан с кислородом двумя

связями. Поэтому этот углерод считается более окисленным, нежели углерод в спиртовой группе, имеющей всего одну связь с кислородом. Упрощая понятие окисления мы говорим, что альдегидная группа является более окисленной функциональной группой, нежели спиртовая. Таким образом, подводя итог всему вышесказанному, можно сказать, что *реакция окисления* – это реакция, в которой центральный углерод функциональной группы в продукте реакции переходит в свою более окисленную форму. *Реакция же восстановления* – это реакция, в которой центральный углерод функциональной группы в продукте реакции переходит в свою более восстановленную форму. Кроме того, возможно существование нескольких функциональных групп, у которых углерод имеет одну и ту же степень окисления, как например углероды, связанные с кислородом в спиртах и эфирах. То же самое можно сказать об альдегидах и их гидратных формах [8].

Рассмотрим теперь понятие «степень окисления». Степень окисления - это число, которое выражает *число* электронов, которое элемент может отдать, присоединить или которыми может делиться в химическом соединении. Для лучшего понимания протекающих в организме реакций окисления-восстановления важно запомнить следующие неизменные постулаты и опираться на них при подсчете степени окисления отдельного атома:

❖ Степень окисления интактного атома равна нулю. Что же касается общей степени окисления всех атомов вещества, то если вещество электронейтрально, то степень окисления всех вместе взятых атомов вещества (их сумма) тоже равна нулю. Когда же вещество распадается на ионы, то степень окисления каждого иона равна его заряду.

❖ Металлы первой группы имеют степень окисления +1, а металлы второй группы имеют степень окисления +2.

❖ Степень окисления фтора в соединениях равна -1.

❖ Водород в соединениях всегда имеет степень окисления +1

❖ Кислород в соединениях всегда принимает степень окисления -2 [6]. Для того чтобы найти степень окисления каждого отдельно взятого атома реагента и продукта, воспользуемся простейшим примером с реакцией, в которой участвуют металл с переходной валентностью (в качестве донора электронов) и кислород (в качестве акцептора электронов):



Степень окисления железа до реакции была +3, поскольку железо, образуя Fe_2O_3 , отдало кислороду свои три электрона. Однако после реакции степень окисления железа стала 0 (железо не отдает свои электроны и не вступает в реакцию с каким-либо атомом). Итак, железо перешло из более электропозитивного состояния (+3) в относительно более электроотрицательное (0), значит оно восстановилось. Углерод до реакции находится в индивидуальном, интактном состоянии, так что степень окисления углерода до реакции равна 0. После реакции степень окисления углерода стала +4, т.е. углерод, наоборот, перешел в свое более электропозитивное состояние, и таким образом углерод окислился [6, 7].

Существуют несложные правила для определения степени окисления углерода в составе функциональных групп, которые приводятся на рис. 3.

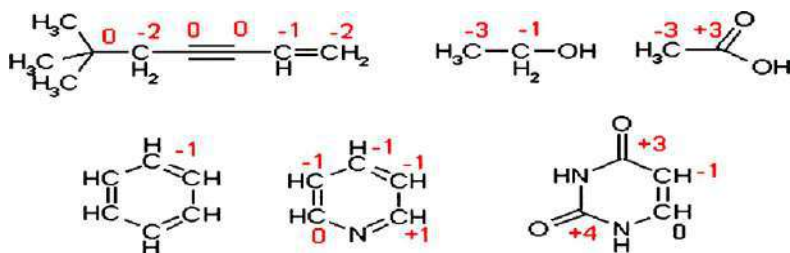


Рис. 3. Общие правила для определения степени окисления углерода

На рис. 4 представлены степени окисления углерода в различных органических соединениях [9].

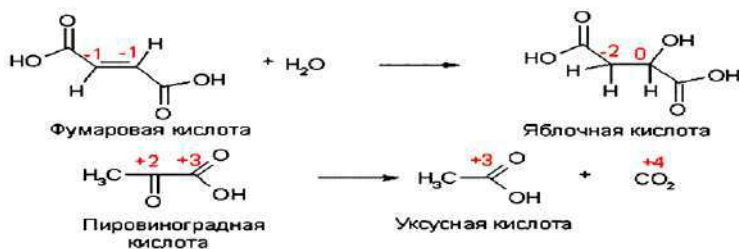


Рис.4. Степени окисления углерода в метаболитах I и II общих путей катаболизма

Табл. 4. Степени окисления углерода в различных соединениях и в составе функциональных групп.

Соединение углерода	Степень окисления
CH ₄	-4
R-CH ₃ ; CH ₃ -CH ₃	-3
R ₂ -CH ₂ ; CH ₂ =CH ₂ ; CH ₃ -Cl; CH ₃ -OH; R-CH ₂ -CH ₂ -R	-2
R ₃ -CH; CH≡CH; R-CH=CH-R; R ₂ -CH-CH-R; C ₆ H ₆ ; R-CH ₂ -OH	-1
R ₄ -C; R ₃ C-CR ₃ ; R ₂ C=CR ₂ ; R-C≡C-R; H ₂ C=O; CH ₂ Cl ₂ ; R ₂ -CH-OH	0
R ₃ -C-OH; R-HC=O	+1
R ₂ C=O; H-COOH; CH-Cl ₃	+2
R-COOH	+3
CO ₂ ; C-Cl ₄ ; H ₂ CO ₃	+4

Как видим из нижеследующей таблицы (табл.4), степень окисления углерода может изменяться от -4 (самое восстановленное состояние) до +4 (самое окисленное состояние). Итак, углерод может и отдавать, и принимать электроны, выступая в первом случае в качестве восстановителя, во втором – в качестве окислителя.

1.3. История учения о биологическом окислении

Процессы окисления в организме давно привлекали внимание ученых, и начиная с XVIII века до наших дней ведется их интенсивное изучение. Существенный вклад в понимание процессов биологического окисления внес А. Лавуазье. В дальнейшем значительный вклад в исследование процессов окисления-восстановления в живых системах, их локализации в клетках, связи с остальными процессами обмена веществ, механизмы ферментативных окислительно-восстановительных реакций, аккумуляции и превращения энергии внесли О. Варбург, Г. Виланд, Д. Кейлин, Х. Кребс, П. Митчел, Д. Грин, А.Ленинджер, Б. Чанс, Э. Рэкер, А.Н.Бах, В.И.Палладин, В.А.Энгельгардт, С.Е.Северин, В.А.Белицери др. Так, в 1777 г. Лавуазье впервые близко к истине истолковал процесс горения как явление, основанное на соединении веществ с O_2 . Так как и горение, и дыхание сопровождаются потреблением O_2 и выделением CO_2 , ученый предположил, что в их основе лежит один и тот же процесс – процесс окисления-восстановления. Однако, как мы понимаем, у дыхания были существенные отличия от горения, поскольку дыхание происходит при низкой температуре, без пламени и, самое главное - в присутствии воды, тогда как горение в неорганической среде в присутствии воды невозможно. В конце XIX века работая независимо друг от друга, исследователи А.Н. Бах и В.И. Палладин предложили 2 основные теории, могущие пролить свет на процессы, протекающие в ходе биологического окисления. В 1897 г А.Н. Бах сформулировал перекисную теорию окисления, согласно которой для инициации реакции биологического окисления сначала активируется молекула кислорода O_2 . Активация O_2 происходит в результате разрыва одной из его связей $O=O$ с образованием $-O-O-$, после чего происходит его присоединение к органическим веществам – оксидазам. Согласно его гипотезы, активированный O_2 при взаимодействии с окисляемым веществом образует в

конечном итоге перекись [10,11,12]. Теория «перекисного окисления» Баха не нашла подтверждения в пояснении процессов биологического окисления с образованием энергии, потребляемой организмом в качестве энергетической валюты, однако она все-таки нашла свое подтверждение в других процессах. В.И.Палладин предложил теорию дыхания, в которой биологическое окисление рассматривалось как совокупность ферментативных процессов, в которых главным компонентом, поставщиком энергии выступал водород. Он предположил, что окисление богатых водородом субстратов должно происходить в 2 фазы: аэробную и анаэробную.

а. Первая фаза, анаэробная. В этой фазе особые вещества, которые он назвал хромогенами (R), отщепляют протон H^+ от субстратов, восстанавливаясь при этом до (RH_2). Как выяснилось впоследствии, так называемые «хромогены» входили в состав ферментов - дегидрогеназ и представляли собой их активную коферментную часть: НАД, ФМН, ФАД. Восстанавливаясь, эти коферменты принимали свою восстановленную форму: НАД- H_2 , ФМН- H_2 , ФАД- H_2 .

б. Вторая фаза, аэробная. Восстановленные хромогены RH_2 (НАД- H_2 , ФМН- H_2 , ФАД- H_2) передают протон H на кислород O_2 с образованием молекулы воды [8, 10, 11]. Впоследствии теория В.И. Паладина подтвердилась для процессов митохондриального окисления, а хромогены, принимающие участие в отнятии водорода от субстратов, в настоящее время называются ферментами “дегидрогеназами”. На сегодня известно не менее четырех типов биологического окисления:

❖ *Аэробное, или митохондриальное окисление* происходит с целью извлечения энергии из питательных веществ с участием кислорода и накопления ее в виде АТФ. Аэробное окисление называется также *тканевым дыханием*, поскольку при его протекании в клетки тканей активно

поступает кислород и из них выделяется углекислый газ («ткани дышат»).

❖ *Анаэробное окисление* является вспомогательным способом извлечения энергии веществ, происходит без участия кислорода. В многоклеточных организмах анаэробное окисление существенного вклада в образование энергии не вносит, поскольку основной путь образования энергии в них – аэробный. Однако анаэробное окисление имеет большое значение для бактерий. У многоклеточных, в частности у человека анаэробное окисление становится основным путем поставки энергии в клетки только при недостатке кислорода (гипоксемии, гипоксии), а также при выполнении интенсивной мышечной работы.

❖ *Микросомальное окисление* происходит в везикулах микросом и предназначено для обезвреживания лекарств и ядов, а также с пластической целью, а именно для синтеза различных веществ: адреналина, норадреналина, меланина в коже, коллагена, жирных кислот, желчных кислот, стероидных гормонов. При микросомальном окислении один или оба атома молекулярного кислорода внедряются в структуру субстрата, образуя в нем гидроксильную группу, делая субстрат более реакционно-способным и водорастворимым.

❖ *Свободнорадикальное окисление* происходит обычно в поврежденных клетках или клетках иммунной системы. Оно необходимо также для регуляции обновления и проницаемости клеточных мембран [12]. Основным путем биологического окисления является аэробное, или митохондриальное окисление, поскольку оно связано с обеспечением организма энергией в доступной для использования форме. Источниками энергии в митохондриальном пути окисления для человека могут быть самые разнообразные органические соединения, но как мы уже отмечали, в первую очередь углеводы, жиры и белки. В результате аэробного окисления питательные вещества распадаются до своих конечных продуктов, в основном – до CO_2 и H_2O , так что тканевое

дыхание можно назвать окислением органических веществ в клетках, сопровождающимся потреблением O_2 и выделением CO_2 и воды. При распаде белков дополнительно образуется также аммиак NH_3 , поэтому белки в основном не используются в качестве поставщиков энергии, а больше служат организму в качестве строительного материала. Главным поставщиком энергии для клеток можно назвать глюкозу, представляющую собой «экологически чистый продукт», при распаде которого не образуется дополнительных, обременительных для организма шлаков. Образующиеся же из глюкозы CO_2 и H_2O беспрепятственно покидают организма: один через легкие, другой – через почки. Фактически *субстратом тканевого дыхания* может быть любое вещество, которое отдает электрон непосредственно в цепь окислительного фосфорилирования, например на $НАД^+$ с образованием $НАД-H_2$, или на $ФАД$ с образованием $ФАДН_2$ и т.д. Цепь переноса электронов в митохондриях называется «*дыхательная цепь*». В переносе электронов от окисляемых субстратов к кислороду O_2 принимают участие:

- ✓ $НАД^+$ - и $НАДФ^+$ - зависимые дегидрогеназы;
- ✓ $ФАД$ - и $ФМН$ - зависимые дегидрогеназы;
- ✓ коэнзимQ;
- ✓ цитохромы;
- ✓ белки, содержащие негемовое железо.

Выделяемая из заключенных в питательных веществах энергия трансформируется в энергию химических связей макроэргических соединений, преимущественно – АТФ (рис. 5). АТФ затем используется практически на все процессы, протекающие с потреблением энергии, по этой причине АТФ называют энергетической валютой живых организмов [10].

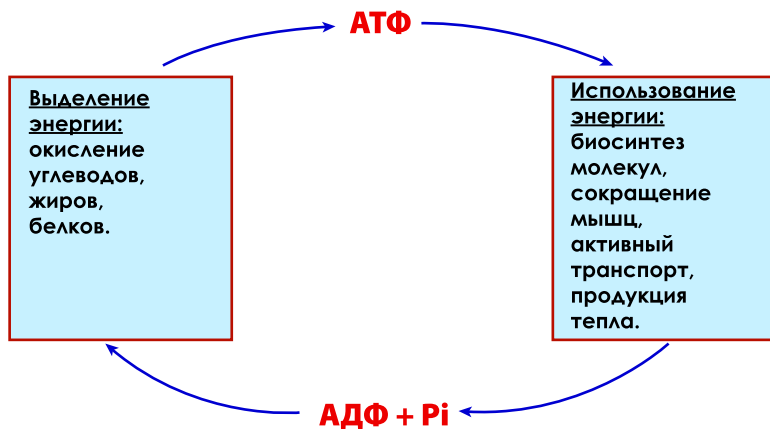


Рис. 5. Основные пути образования энергии и ее использования в организме.

1.3.1. Современные представления о биологическом окислении

Отметим основные постулаты современной теории о биологическом окислении:

- а. Окисление может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях.
- б. В аэробных организмах существует несколько путей использования O_2 .
- с. Реакции биологического окисления необходимы в первую очередь для получения энергии в форме АТФ, но также для синтеза новых веществ, разрушения ксенобиотиков и других нежелательных продуктов метаболизма.
- д. Биологическое окисление является сложным, многостадийным процессом, в котором главную роль играют ферменты: оксидо-редуктазы [13, 14, 15].

Более конкретно окислительно-восстановительные реакции можно определить как реакции, в которых меняется степень окисления субстрата за счет присоединения и/или отщепления: 1) $1 e^-$; 2) $2e^-$ и $2H^+$; 3) атомов кислорода. Из

вышесказанного становится ясно, что **окисление** является реакцией отнятия водорода и электронов от химического соединения или же включение кислорода в данную молекулу. По этой причине *субстратом* биологического окисления может выступать любое вещество, способное отдавать (принимать) электрон и/или протон, т.е. любые вещества, способные вступать в реакции окисления.

1.3.2. Понятие о свободной энергии

Каждое органическое вещество обладает определенным запасом внутренней энергии. Часть этой внутренней энергии может быть использована для совершения полезной работы, и такую энергию уже называют свободной энергией **G**. Направление химической реакции определяется изменением свободной энергии веществ, выражаемым знаком ΔG . У катаболических процессов значение ΔG отрицательно, это означает что общее количество энергии, содержащейся во вступающих в реакцию реагентах после реакции снижается, поскольку часть их энергии выделяется в среду, это указывается знаком $- \Delta G$. Субстраты такой реакции сами поставляют энергию, необходимую для протекания реакции; так что эти реакции протекают самопроизвольно и называются «экзергоническими реакциями». У анаболических реакций ΔG положительно, это означает что для протекания реакции необходимо поглощение реакции извне, это указывается знаком $+\Delta G$. Эти реакции протекают только при поступлении свободной энергии из среды и называются «эндергоническими реакциями». Выражается величина свободной энергии в кДж [15].

Реакции окисления-восстановления всегда состоят из пары, в которой одно вещество является донором, а другое – акцептором определенной формы энергии (например электронов, протонов). Поэтому в этой паре всегда происходят взаимодействия между окислителем и восстановителем, что и

дало название типу этих реакций – окислительно-восстановительные. В каждой окислительно-восстановительной системе обязательно участвуют и окисленная, и восстановленная формы двух соединений, которые образуют сопряженную окислительно-восстановительную пару, иначе называемую редокс-парой. Разные окислительно-восстановительные пары обладают различным сродством к электрону. Мерой сродства соединения к электрону служит *окислительно-восстановительный потенциал*, называемый также редокс-потенциалом « E_o' ». Величину E_o' выражают в вольтах, эта величина прямо пропорциональна изменению свободной энергии ΔG во время реакции. Чем положительнее E_o' , тем значит больше сродство соединения к электрону, и оно более остальных соединений способно присоединять электрон. И наоборот, чем отрицательнее E_o' , тем значит меньше сродство соединения к электрону, и оно более остальных соединений способно отдавать электрон. Так, самое низкое сродство к электрону у водорода, поскольку его E_o' равно $-0,42\text{В}$. Самое высокое сродство к электрону у O_2 , т.к. его E_o' равно $+0,82\text{В}$. Остальные компоненты дыхательной цепи митохондрий имеют редокс-потенциалы, занимающие промежуточное положение между $-0,42\text{В}$ и $+0,82\text{В}$ [16]. Естественно, в дыхательной цепи вещества переносящие электрон, располагаются в порядке увеличения их редокс-потенциала, поскольку электрон движется от соединений, способных отдавать его, к соединениям, способным его принимать. Иначе говоря, электрон перемещается по дыхательной цепи от веществ с низким сродством к электрону к веществам с более высоким сродством к электрону. Во время этого перемещения электрона по цепи переноса электронов выделяет кванты энергии [13], что означает, что происходит высвобождение заключенной в нем свободной энергии. Часть этой энергии фиксируется в виде макроэргических соединений, в основном АТФ. Электроны в дыхательной цепи берутся от субстратов тканевого дыхания.

1.3.3. Образование субстратов тканевого дыхания Этапы унифицирования энергии пищевых веществ.

Образование субстратов тканевого дыхания осуществляется в несколько основных шагов:

- При переваривании в желудочно-кишечном тракте происходит гидролиз полимеров, таких как белки, полисахариды, и жиры до **мономеров**, которые потом всасываются в кровь, поступают в клетки и там включаются в промежуточный обмен.

- В ходе катаболизма, за исключением некоторых аминокислот, все **мономеры**, т.е. моносахариды, жирные кислоты и большинство аминокислот превращается в универсальное вещество - ацетил-КоА.

- Ацетил-КоА поступает в цикл трикарбоновых кислот, где из него в последовательных реакциях образуются субстраты для тканевого дыхания: изоцитрат, α -кетоглутарат, сукцинат и малат.

- Окисление субстратов тканевого дыхания сопровождается одновременным восстановлением коферментов: НАД до НАДН₂ и ФАД – до ФАДН₂, которые затем передают свои протоны и электроны в редокс-цепь для окислительного фосфорилирования.

1.3.4. Основные пути использования кислорода в клетке

Коротко коснемся основных реакций с вовлечением в процесс кислорода. В настоящее время выделяют 4 основных пути использования кислорода в организме:

-  **Оксидазный путь**, характеризуется тем, что в этих реакциях электроны и протоны передаются непосредственно на кислород. Окислительное фосфорилирование относится к этому типу реакций.

✚ Оксидазы участвуют также в катаболизме D- и L-аминокислот. Что касается окислительного фосфорилирования, то оно протекает в митохондриях и является основным источником АТФ в аэробных тканях. Этот процесс потребляет 90% кислорода, поступающего в организм.

✚ **Оксигеназный путь**, характеризуется тем, что в этих реакциях кислород внедряется непосредственно в молекулу субстрата. Различают два вида этого пути: Монооксигеназный и диоксигеназный.

а. Монооксигеназный путь, обеспечивает включение 1 атома кислорода в молекулу субстрата. Используется этот путь с пластической целью, т.е. для синтеза новых веществ, например синтеза стероидных гормонов из холестерина, с целью детоксикации чужеродных соединений, например обезвреживания ксенобиотиков и токсических продуктов обмена в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме.

б. Диоксигеназный путь, обеспечивает включение обоих атомов молекулы кислорода в субстрата. Используется для деградации аминокислот, например, фенилаланина (гомогентизат-диоксигеназа), и синтеза новых веществ.

✚ **Пероксидазный путь**. Кислород в данных реакциях участвует в образовании перекисей, Перекись может выступать также в качестве акцептора протонов, как например в реакции, катализируемой каталазой.

✚ **Свободнорадикальный путь**. Кислород участвует в образовании активных форм кислорода: радикалов, которые необходимы в пероксисомах для внутриклеточного пищеварения, разрушения макрофагами бактерий, вирусов, регуляции метаболизма и т.д [17, 18, 19]. Но перекиси и активные кислородные радикалы оказывают также повреждающее воздействие на структуры клеток и тканей, активируя перекисное окисление липидов. Разрушение перекисей, инаktivация свободных радикалов с целью ограждения клетки от их разрушающего действия осуществляется с

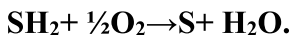
помощью ферментативной и неферментативной **антиоксидантной** системы клеток.

Как было сказано выше, все ферменты, участвующие в окислении-восстановлении, например, катализирующие отщепление водорода от субстрата и присоединение его к другой молекуле, относятся к классу оксидо-редуктаз. Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа может служить примером таких ферментов. В соответствии с типом катализируемой реакции, все оксидо-редуктазы разделены на 17 групп [14, 18]. Основные 5 групп этих ферментов – это **оксидазы, аэробные дегидрогеназы, анаэробные дегидрогеназы, оксигеназы, пероксидазы**

1.4. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции

1.4.1. Оксидазы

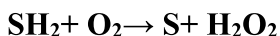
Оксидазы отщепляют протон от субстрата, используя в качестве акцептора протона только кислород O_2 . Цитохром-оксидаза, тирозиназа, уриказа являются примерами этих ферментов. Продуктом реакции, катализируемой оксидазами, является вода. Все оксидазы содержат медь, как например цитохромоксидаза, являющаяся последним ферментом дыхательной цепи. Общую реакцию, производимую оксидазой, можно схематично представить в нижеследующей форме:



а. Аэробные дегидрогеназы, или ФАД-зависимые оксидазы, относятся к металло-флавопротеинам, содержат ФАД/ФАД- H_2 , ФМН/ФМН- H_2 , Fe, Cu, Mo. Эти ферменты находятся в пероксисомах и наружной мембране митохондрий. Они отщепляют протон от субстрата и передают его на

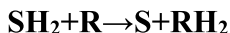
молекулярный кислород O_2 или еще какой-либо аналогичный промежуточный акцептор, например на метиленовую синь. Одним из продуктов реакции всегда является перекись водорода.

Дегидрогеназа L-аминокислот, называемая также оксидазой L-аминокислот осуществляет окислительное дезаминирование аминокислот в почках. *Ксантин-дегидрогеназа*, называемая также ксантин-оксидазой превращает метаболиты пуринов в мочевую кислоту. *Моноаминоксидазы (МАО)*, окисляют в клетках организма гормон адреналин и некоторые другие биогенные амины. *Диаминоксидазы (ДАО)*, окисляют гистамин и другие диамины и полиамины организма. Образующаяся в этих реакциях перекись оказывает бактерицидное действие. Схематично реакцию можно представить в следующем виде:



б. Анаэробные дегидрогеназы – это многочисленная группа ферментов, которая всегда переносит водород от субстрата на промежуточный переносчик, и никогда - на кислород. Такими акцепторами водорода являются ФАД, НАД⁺, ФМН. Некоторые гемопротеины, цитохромы также относятся к этому классу ферментов. НАД⁺/НАД-Н₂, НАДФ⁺/НАДФН₂, ФАД/ФАД-Н₂, ФМН/ФМН-Н₂ и цитохромы выполняют в этих ферментах роль коферментов. Они отщепляют протон от предыдущего субстрата и передают его на следующий промежуточный переносчик, но не на кислород. Иначе говоря, они не используют в качестве акцептора протона кислород O_2 . Анаэробные дегидрогеназы выполняют две главные функции: 1. перенос протона с одного субстрата на другой в сопряженной окислительно-восстановительной реакции, и 2. транспорт электронов в дыхательной цепи. Примеры ферментов анаэробных дегидрогеназ:

- изоцитрат дегидрогеназа, содержит НАД⁺/НАД-Н₂ в качестве кофактора,
- сукцинат дегидрогеназа, содержит в качестве кофактора ФАД/ФАД-Н₂,
- цитохромы b, c₁, c. Схематично катализируемую анаэробной дегидрогеназой реакцию можно представить в виде:



I.4.2. Оксигеназы

Оксигеназы – эти ферменты, которые включая кислород в молекулу субстрата, работают в составе мультиферментного комплекса, содержащего ФАД/ФАД-Н₂- зависимую дегидрогеназу, железо-серный белок Fe₂S₂, цитохромы Р₄₅₀ и/или b₅. Этот комплекс встроен в мембрану эндоплазматического ретикулума или внутреннюю мембрану митохондрий.

I.4.2.1. Монооксигеназы

а) Монооксигеназы – это ферменты, обеспечивающие включение одного атома кислорода в молекулу субстрата. Другой атом кислорода восстанавливается до воды. В качестве восстановителей используются НАДФ⁺/НАДФН₂, НАД⁺/НАДН₂ и аскорбат (витамин С). Они называются также оксигеназами со смешанной функцией. Участвуют в пластических реакциях, таких как синтез стероидных гормонов, обезвреживание ксенобиотиков. Фенилаланин-4-монооксигеназа является представителем этой группы ферментов, она окисляет фенилаланин в тирозин. Пролин-гидроксилаза, активируемая аскорбатом, гидроксилирует пролин в гидроксипролин в проколлагене, способствуя

созреванию коллагена. Обозначим восстановитель через R, и тогда реакцию можно представить в виде:



или если представить в более общей форме, получим формулу:



где R может быть представлен НАДФН₂, НАДН₂ или витамином С. Этот процесс называют микросомальным окислением. Моноксигеназные реакции протекают на цитоплазматической поверхности гладкого эндоплазматического ретикулума и на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрии. В соединительной ткани моноксигеназы участвуют в гидроксилировании пролина в оксипролин в молекуле коллагена (пролин-гидроксилазы). Донором протонов и электронов является витамин С. С оксипролином зрелый коллаген приобретает механическую прочность.

1.4.2.1.1. Микросомальные моноксигеназные системы

Эти ферментные комплексы катализируют низкоспецифичные реакции и функционируют в комплексе с различными ЦПЭ, как например цепь А:

Цепь А: НАДФН₂ - Р₄₅₀ редуктаза → Цитохром Р₄₅₀

Донорами протонов и электронов для этой цепи является НАДФ-Н₂. Субстратами этой цепи могут являться практически любые гидрофобные вещества экзогенного происхождения, такие как лекарства, ксенобиотики. Эта же система обезвреживает и метаболиты эндогенного характера: стероиды, жирные кислоты и т.д. Регуляция активности этой микросомальной системы осуществляется индукцией синтеза ферментов; открыто более 250 веществ-индукторов

микросомального окисления: барбитураты, спирты, кетоны, стероиды, ароматические углеводороды и т.д.



Рис.6. Схема микросомального монооксигеназного окисления цепи A.

Отдельно рассмотрим ферменты приведенной системы:

□ **НАДФН₂-P₄₅₀ редуктаза.** Цитозольный домен этого фермента содержит 2 кофермента: ФАД и ФМН, его гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране (см. рис 6). Как ясно из названия фермента, НАДФН₂-P₄₅₀ редуктаза переносит электроны с НАДФН₂ на цитохром P₄₅₀, производя восстановление последнего.

□ **Цитохром P₄₅₀** – это интегральный гемопrotein, который содержит простетическую группу – гем. Он имеет участки связывания для молекулярного кислорода O₂ и субстрата R. Открыто 150 генов, кодирующих разные изоформы цитохрома P₄₅₀; каждая из изоформ P₄₅₀ имеет множество субстратов и отличается от других изоформ P₄₅₀ только белковым компонентом.

Цитохром P₄₅₀ передает 2 электрона на 1 атом молекулы кислорода, который превращается в O₂⁻ и после взаимодействия с 2 протонами превращается в молекулу воды. Второй атом молекулы кислорода включается в субстрат R-H, образуя R-OH.

Примером монооксигеназ может служить фенилаланин-гидроксилаза, осуществляющая превращение незаменимой аминокислоты фенилаланин в заменимую – тирозин (рис.7).

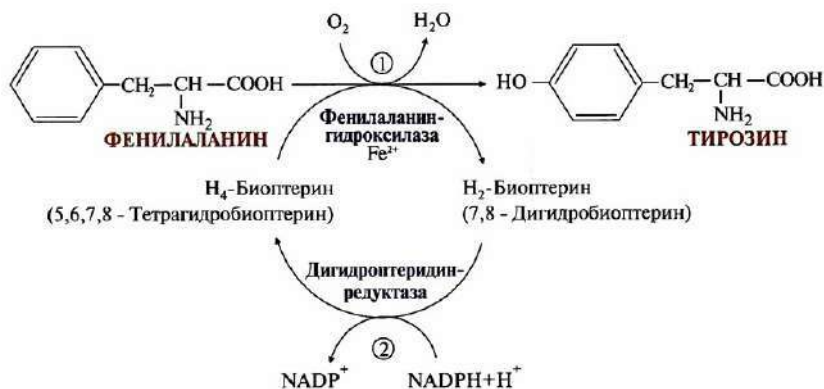


Рис. 7. Фенилаланин-4-монооксигеназа (фенилаланин-гидроксилаза). Фенилаланин-гидроксилаза внедряет в молекулу фенилаланина один атом кислорода, превращая его в тирозин. Коферментом в этой реакции служит тетрагидробиоптерин.

Существует также цепь Б микросомального окисления субстратов:

Цепь Б: НАДН_2 – цитохром b_5 редуктаза $\rightarrow$ Цитохром $\text{b}_5 \rightarrow$ стеаронл – K_A - десатураза

Более подробно цепь Б представлена на рис. 8. Донором протонов и электронов для этой цепи, как видим, является НАДН_2 .

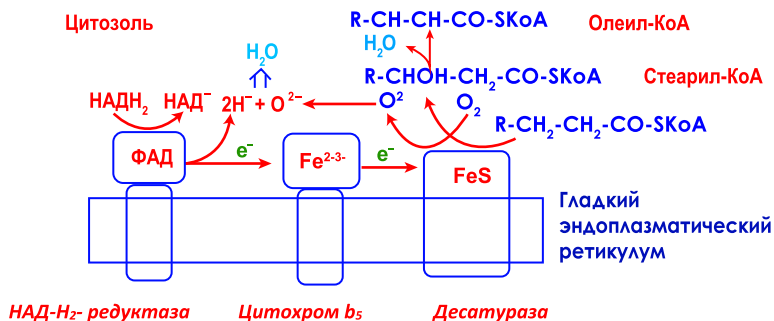


Рис.8. Схема микросомальной цепи Б.

■ **НАДН₂-цитохром b₅ редуктаза** — это двухдоменный белок, цитозольный домен которого содержит ФАД, а гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране. НАДН₂-b₅ редуктаза переносит электроны с НАДН₂ на цитохром b₅.

■ **Цитохром b₅** — его цитозольный домен содержит гем, а гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране. Цитохром b₅ может передавать свои электроны на различные ферменты: цитохром P₄₅₀, стеароил-КоА-десатуразу и т.д. При этом он каждый раз образует различные цепи переноса электронов, что позволяет ему участвовать в десатурации и элонгации жирных кислот, синтезе холестерина, плазминогенов и церамида.

■ **Стеароил-КоА-десатураза** — это интегральный фермент, который содержит негеминовое железо. Он катализирует образование 1 двойной связи между 9-м и 10-м атомами углерода жирных кислот. Стеароил-КоА-десатураза переносит электроны с цитохрома b₅ на 1 атом молекулы кислорода, который при участии протонов образует воду. Второй атом кислорода включается в стеариновую кислоту с образованием ее окси-ацила, который впоследствии дегидрируется до олеиновой кислоты.

1.4.2.1.2. Митохондриальные монооксигеназные системы

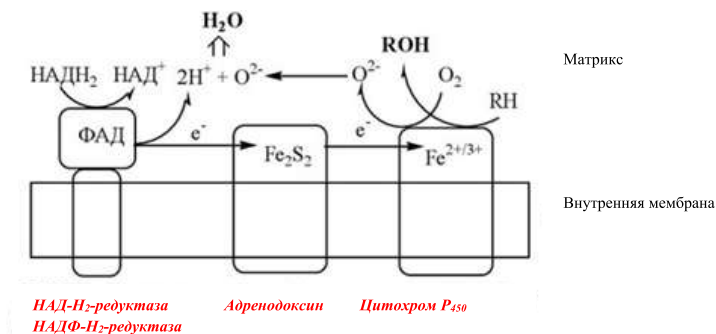


Рис. 9. Митохондриальная монооксигеназная система

Митохондриальные монооксигеназные цепи (рис. 9) локализованы на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий. Эта группа оксигеназ катализирует высокоспецифичные реакции. Компонентами этих монооксигеназных систем могут быть НАДН₂-зависимые ФАД-содержащие редуктазы, Fe₂S₂-белки – в адренодоксине, цитохромы P₄₅₀,b₅, элонгазы и т.д.

Функции митохондриальных монооксигеназных систем:

- в печени – участвуют в синтезе желчных кислот из холестерина;
- в почках – участвуют в синтезе 1,25-дигидрокси-холекальциферола, активной формы витамина Д₃ из 25-гидрокси-холекальциферола;
- в коре надпочечников и соответствующих органах – участвуют в синтезе стероидных гормонов из холестерина, при этом происходит гидроксирование по С₂₂ и С₂₀ и в положениях 11β- и 18 отщепляется боковая цепь.

1.4.2.2. Диоксигеназы

Диоксигеназы, обеспечивающие включение молекулы кислорода в молекулу субстрата, окисляют циклические соединения как правило, с разрывом цикла. Если циклическое соединение представить в виде S, то схематично реакцию можно представить в виде:



Таким путем окисляются циклические трудноокисляемые структуры. Диоксигеназные реакции протекают на цитоплазматической поверхности гладкого эндоплазматического ретикулума. К ферментам этой группы относится L-триптофан-диоксигеназа печени (рис. 10), которая содержит гем и участвует в катаболизме триптофана: триптофан-оксигеназа превращает триптофан в фенилкинуренин.

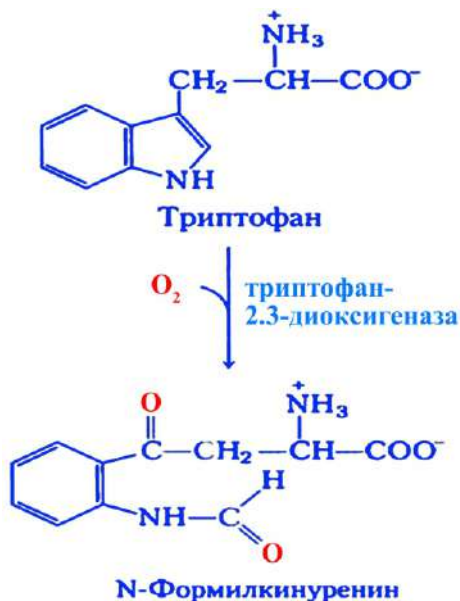


Рис.10. Триптофан-2, 3-диоксигеназа печени.

Гомогентизат-диоксигеназа (рис. 11), как следующий представитель диоксигеназ, является ферментом, превращающим гомогентизиновую кислоту внедрением кислорода в малеил-ацетоацетат, а затем фумарил-ацетоацетат. Гомогентизат-диоксигеназа печени содержит Fe^{2+} и участвует в катаболизме тирозина.

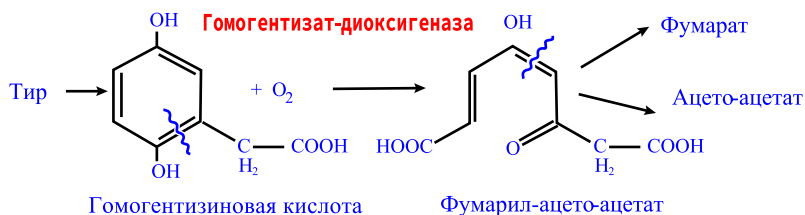


Рис.11. Гомогентизат-диоксигеназа печени

1.4.3. Пероксидазы. Свободные радикалы кислорода

В связи со способностью кислорода легко вступать в реакции с практически любыми природными соединениями, потенциально он является опасным для клетчииокислителем. Молекулярный O_2 является би-радикалом ($\cdot\text{O}::\text{O}\cdot$), но несмотря на это он стабилен, так как 2 неспаренных электрона внешней орбиты имеют параллельные спины, и таким образом подавляют радикальную активность друг друга. Кислород в составе молекулы H_2O стабилен, потому что его внешняя электронная орбита полностью укомплектована электронами ($\text{H}:\text{O}:\text{H}$). Однако химические соединения, в составе которых кислород имеет промежуточную степень окисления, имеют высокую реакционную способность и называются активными формами кислорода, к которым относятся свободные радикалы кислорода и перекиси. Известно, что свободный радикал - это свободный атом или частица с неспаренным электроном.

1.4.3.1. Образование активных форм кислорода

Активные формы кислорода во многих клетках образуются ферментативных и неферментативных реакциях;

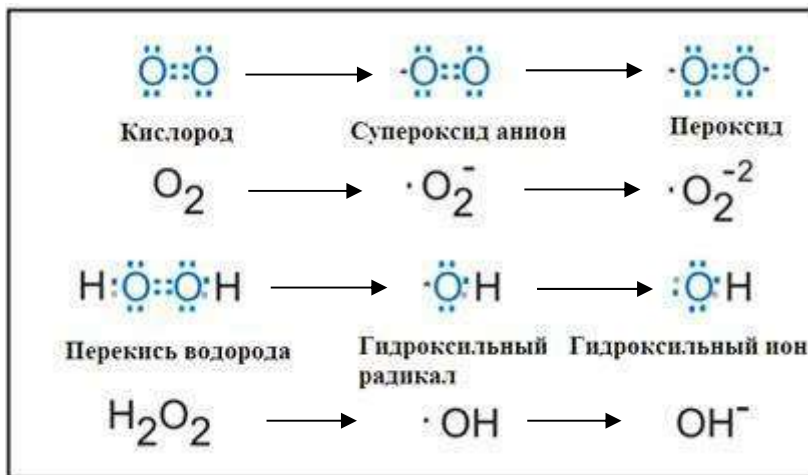


Рис. 12. Активные формы кислорода

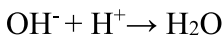
Это является результатом последовательного присоединения электрона к кислороду, как это представлено на рис.12. Процесс выглядит следующим образом. Молекула кислорода присоединяет один электрон и трансформируется в супероксидный анион: $\text{O}_2 + 1\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^-$ (супероксидный анион - радикал $[\text{O}::\text{O}]$). Затем супероксидный анион присоединяет следующий электрон и превращается в пероксидный анион: $\text{O}_2^- + 1\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{2-}$ (пероксидный анион: $\text{O}::\text{O}$). Пероксидный анион, связавшись в свою очередь с протоном, образует перекись водорода: $\text{O}_2^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$: $\text{H}::\text{O}::\text{O}::\text{H}$. Перекись водорода, присоединив электрон, может образовать воду:



Гидроксильный радикал быстро протонируется с образованием воды:



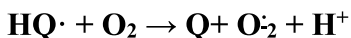
Гидроксильный ион также способен образовать воду:



1.4.3.1.1. Ферментативные реакции образования активных форм кислорода

Электроны, идущие на образование активных форм кислорода могут быть утечкой дыхательной цепи: в большинстве клеток основным путем образования в активных форм кислорода является именно утечка электронов из ЦПЭ на кислород. Происходит это на следующих этапах ЦПЭ:

1. Один из мобильных компонентов цепи окислительного фосфорилирования убихинон Q, принимая 1 электрон от восстановителя, превращается в свободный радикал семихинон $\text{HQ}^\cdot$, который при реоксигенации ишемических тканей может входить во взаимодействие с кислородом, образуя супероксидный *анион-радикал*:



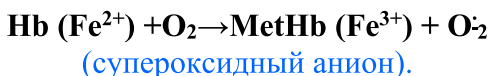
2. В монооксигеназных реакциях электрон с цитохрома P_{450} переходит на кислород с образованием *супероксидного анион-радикала*, который иногда может теряться с активного центра.

3. Аэробные дегидрогеназы, в частности ФАД-зависимые оксидазы переносят электроны и протоны H^+ с субстрата на кислород с образованием *перекиси водорода*. Примерами таких оксидаз являются оксидазы аминокислот, супероксид дисмутаза, оксидазы, локализованные в пероксисомах.

1.4.3.1.2. Неферментативные реакции образования активных форм кислорода

Источниками электронов, необходимых для образования активных форм кислорода, могут также быть:

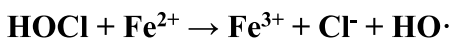
1. Металлы переменной валентности. Наличие в клетках Fe^{2+} или ионов других переходных металлов катализирует реакции образования активных форм кислорода. Например, в эритроцитах окисление железа гемоглобина способствует образованию супероксидного анион-радикала.



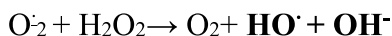
Перекись водорода с ионами двухвалентного железа образует гидроксильный радикал:



Эта реакция называется реакцией Фентона [19, 20]. Из формулы видно, что Fe^{2+} является про-оксидантом и стимулирует реакции образования активного кислорода, стимулируя таким образом разрушение клеток. Однако в норме эта реакция стимулирует воспалительный процесс, направленный на удаление старых и больных клеток. Галогены в составе гипохлорита также участвуют в образовании активных форм кислорода, и эти реакции направлены в основном на повреждение клеточной стенки болезнетворных бактерий:



2. Радикалы также могут быть источниками электронов, необходимых для образования активных форм кислорода. Обмениваясь электроном, активные формы кислорода легко переходят из одной формы в другую:



Активные формы кислорода могут также образовываться в организме под влиянием гомолитического разрыва

связей от действия ионизирующего излучения. Ионизирующее излучение вызывает например, радиоллиз воды с образованием H_2 , H_2O_2 и свободных радикалов $H^\cdot$, $HO^\cdot$, $O^\cdot$. Этот процесс в основном происходит на поверхности тела - в коже, и называется он фотостарением.

1.4.3.2. Физиологические функции активных форм кислорода

Обладая высокой активностью, кислородные радикалы в реакциях свободно-радикального окисления разрушают органические молекулы. Большая часть этих реакций протекает с полиненасыщенными жирными кислотами липидов мембран, и называется перекисным окислением липидов. Реакции перекисного окисления липидов являются цепными. Химически наиболее активным соединением является гидроксильный радикал, поскольку он является сильнейшим окислителем. Он имеет очень короткое время жизни: 1 миллиардная доля секунды, но за это время в месте своего образования он мгновенно вступает в цепные окислительные реакции.

Супероксидный анион-радикал и перекись водорода являются более стабильными веществами, они могут проникать через мембраны клеток и диффундировать от места своего образования. Однако перекись водорода дает начало процессу образования гидроксильного радикала по следующей реакции:



Использование активных форм кислорода в организме

1. Иммунная система. Активные формы кислорода используются фагоцитарными клетками: тканевыми макрофагами, моноцитами и гранулоцитами крови для разрушения бактерий, вирусов и онко-клеток.

• Фагоциты в реакциях с участием НАДФ-Н₂-оксидазы выделяют супероксидный анион:



• Под действием супероксид-дисмутазы супероксидный радикал превращается в перекись водорода:



• Под действием миелопероксидазы Н₂О₂ превращается в гипохлорит – соединение, разрушающее стенки бактериальных клеток:



В клетках при дефиците супероксид-дисмутазы, ферритина, а в плазме – церулоплазмينا и трансферрина активируются альтернативные реакции [19, 20]:

- $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
- $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\cdot + \text{OH}^-$
- $\text{Fe}^{2+} + \text{ClO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- + \text{HO}^\cdot$

2. Поддержание гомеостаза. Одна из функций активных форм кислорода – это поддержание нормального гомеостаза организма. Эйкозаноиды, медиаторы воспаления запускают процесс воспаления, смысл которого заключается в уничтожении поврежденных клеток и предотвращении заражения здоровых [21].

3. Внутриклеточное пищеварение. Активные формы кислорода, образующиеся в пероксисомах, служат процессу расщепления и удаления отстаревшего клеточного материала. Когда пероксисомы сливаются с фагосомами, активные формы кислорода обеспечивают внутриклеточное пищеварение этих компонентов [22, 23].

I.4.3.3. Повреждающее действие активных форм кислорода в организме

Гидроксильный радикал химически исключительно активен и вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот и липидов биологических мембран [19, 20, 21, 23]. В белках под действием этого радикала происходит неферментативное окисление аминокислотных остатков гистидина, цистеина, триптофана [24, 25]. Таким образом активные формы кислорода инактивируют многие ферменты [22, 24]. Особенно тяжелые последствия имеют повреждение ДНК и липидов. Радикалы $\text{HO}\cdot$ вызывают разрыв нитей ДНК, и могут обладать в зависимости от ситуации мутагенным, канцерогенным или цитостатическим действием [23, 24, 25]. Радикалы гидроксила инициируют цепную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), отчего нарушаются физико-химические свойства мембран: их проницаемость, рецепторная функция и работа мембранных белков [24]. Повреждение мембранного барьера приводит к нарушению регуляции внутриклеточных процессов и тяжелым расстройствам клеточных функций. Свободно-радикальные реакции часто вызывают гибель клеток и в целом ускоряют процесс старения организма [22, 23, 24, 25].

I.4.4. Антиоксидантная система организма

В нормальных условиях процесс свободно-радикального окисления находится под строгим контролем ферментативных и неферментативных систем клетки, отчего в норме скорость этих процессов невелика. Химические соединения, влияющие на скорость свободно-радикального окисления, делят на про-оксиданты и анти-оксиданты.

Прооксиданты усиливают процессы свободно-радикального окисления. К про-оксидантам относятся: 1) высокие концентрации кислорода, что наблюдается например,

при длительной гипербарической оксигенации больного [26, 27, 28], 2) ферментные системы, генерирующие супероксидные радикалы, такие как ксантиноксидаза, ферменты плазматической мембраны фагоцитов и др., 3) ионы двухвалентного железа [19, 20].

Антиоксиданты тормозят реакции свободно-радикального окисления; эти соединения составляют ферментативную и неферментативную антиоксидантные системы.

1.4.4.1. Ферментативная антиоксидантная система

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят *супероксид-дисмутазу (СОД)*, *каталазу* и *глютатион-пероксидазу*. Наиболее активны эти ферменты в печени, почках и надпочечниках, особенно богатых митохондриями, цитохромом P₄₅₀ и пероксисомами [29, 30, 31].

Фермент супероксиддисмутаза превращает супероксидные анионы в перекись водорода:

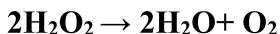


У человека существует три типа СОД: СОД₁, СОД₂ и СОД₃. СОД₁ – это димер, низкомолекулярный белок с молекулярной массой 32,5 кДа, обнаруженный в цитоплазме. СОД₂ – это митохондриальный гомотетрамер с молекулярной массой около 86-88 кДа). СОД₃ – Это самый крупный гомотетрамер СОД с молекулярной массой 135 кД. Цитозольная и внеклеточная супероксиддисмутаза содержат ионы Cu²⁺ и Zn²⁺, тогда как митохондриальная – ионы Mn²⁺. Гены этих форм находятся в хромосомах 21, 6 и 4 под номерами 21q22.1, 6q25.3 и 4p15.3-p15.1. Изоферменты являются как бы первой линией защиты, потому что супероксидный анион – это обычно первый образующийся компонент активных форм кислорода. [31, 32, 33, 34]. Супероксиддисмутаза – это индуцируемый фермент [33, 34], т.е.

синтез его увеличивается при активации в клетках свободно-радикального окисления.

Гидрокси-пероксидазы разрушают перекись водорода и органические перекиси. Ферментами, относящимися к этой группе, являются пероксидаза и каталаза. Пероксидазы, содержат в качестве простетической группы протогем и восстанавливают перекись до воды. Реакция восстановления перекиси водорода до воды протекает с участием хинонов, аскорбата или цитохрома С.

Каталаза берет свое название от греческого $\kappa α τ α λ υ ω$ - разрушать, ломать [1]. Это геминный фермент, который катализирует реакцию разрушения перекиси водорода. При этом образуется вода и молекулярный кислород:



Являющаяся гемопротеином каталаза использует одну молекулу перекиси водорода H_2O_2 как донор электронов e^- , а вторую молекулу H_2O_2 - как акцептор e^- , так что в результате реакции образуется вода и молекула кислорода. Каталазы много в эритроцитах крови, костном мозге, слизистых оболочках, печени и почках. Каталаза находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество перекиси водорода, в лейкоцитах она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва», а в эритроцитах она защищает гем гемоглобина от окисления.

Глутатион-пероксидаза содержит селен и глутатион, γ -глутамил-цистеинил-глицин (глутатион) в качестве простетической группы, восстанавливает перекись до воды за счет окисления глутатиона. Глутатион-пероксидаза обеспечивает разрушение перекиси водорода и гидропероксидов липидов при одновременном окислении глутатиона (глутатион выступает в этих реакциях в роли донора электронов и протонов, т.е. восстановителя). Если восстановленный глутатион представить в виде RH_2 , то схематично реакция разрушения перекиси будет выглядеть следующим образом:

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R-H}_2$ (восстановленный глутатион) $\rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}$ (окисленный глутатион),

или, представив восстановленный глутатион в виде GSH, а окисленный – в форме G-S-S-G, получим уравнение:



Глутатион-редуктаза восстанавливает окисленный глутатион с участием НАДФ-Н₂, что обеспечивает дальнейшее участие глутатиона в глутатион-пероксидазной реакции. Реакцию восстановления окисленного глутатиона можно представить в виде:

Глутатион-редуктаза



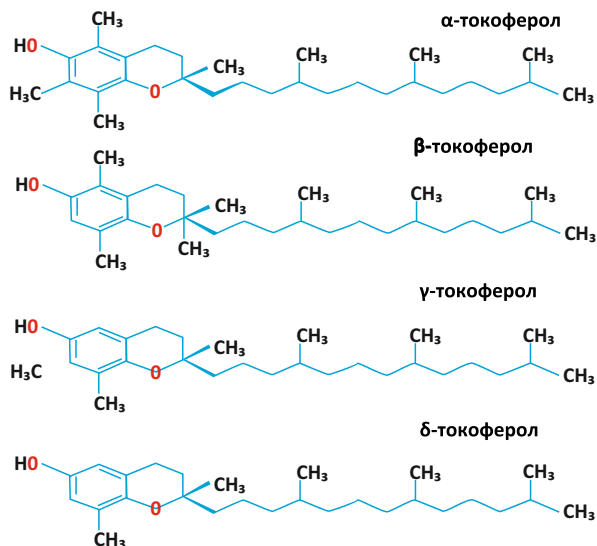
Недостаток глутатиона в клетках, например эритроцитах, может быть обусловлен действием токсических веществ, например ионами тяжелых металлов или наследственным недостатком глутатион-редуктазы. Это приводит к активации перекисного окисления, что в частности наблюдается при некоторых видах гемолитических анемий [35].

Фосфолипаза в мембране поврежденных клеток отщепляет окисленные жирные кислоты от фосфолипидов, подвергшихся перекисному окислению и содержащих гидроперекисную группу (-LOOH). В результате действия фосфолипазы разрушаются гидроперекиси липидов, и этим предотвращается разветвление цепей окисления липидов в мембранах [36].

1.4.4.2. Неферментативная антиоксидантная система

Липидные антиоксиданты – это производные фенола, которые способны инактивировать свободные радикалы в гидрофобном слое мембран и предотвращать развитие цепных реакций перекисного окисления липидов. К ним относятся: 1) α-токоферол, или витамин Е, 2) убихинон, т.е. коэнзим Q, 3) тироксин, 4) синтетические соединения, например ионол, являющийся бутилированным гидрокситолуолом [37].

Рис. 13. Наиболее часто встречающиеся в природе формы витамина Е. Среди всех токоферолов выраженным антиоксидантным действием обладает только α -токоферол.



Различают 8 типов токоферолов, но наиболее активен α -токоферол. **Витамин Е** - это самый распространенный природный липофильный антиоксидант, который обеспечивает защиту мембран от свободно-радикальных реакций. В соответствии с количеством и местом присоединения метильных групп различают α -токоферол, β -токоферол, γ -токоферол и δ -токоферол. На рис. 13 представлены структурные формулы токоферолов.

В реакциях антиоксидантной защиты α -токоферол отдает атом водорода липидному радикалу $\text{ROO}^\bullet$ и восстанавливает его до гидропероксида - ROOH . Сам токоферол при этом превращается в малоактивный свободный радикал, за счет чего цепная реакция перекисного окисления липидов прерывается (рис. 15).

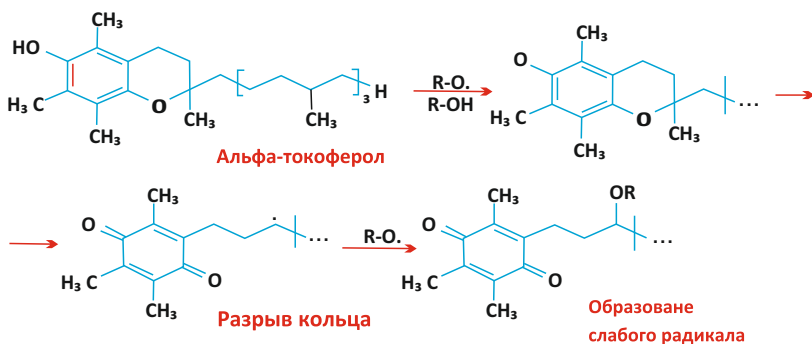


Рис.14. Окисление α – токоферола: «гашение» α – токоферолом цепной реакции перекисного окисления липидов.

Обратную регенерацию α -токоферола, т.е. его восстановление в первоначальное состояние осуществляет витамин С [38]. Свободный радикал витамина Е стабилен, малоактивен и не поддерживает реакций перекисного окисления,

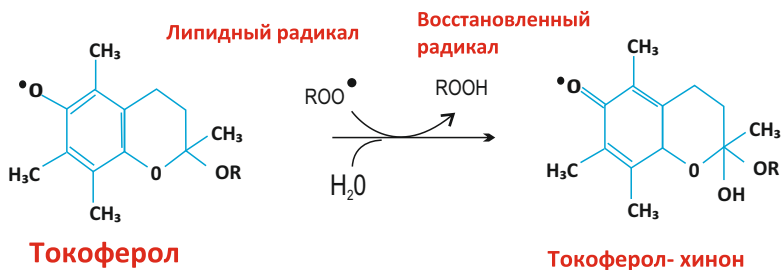


Рис.15. Реакция превращения радикала токоферола в менее реакционно-способное производное – токоферол-хинон.

а напротив, взаимодействуя с радикалами липидных перекисей, восстанавливает их; при этом сам токоферол превращается в стабильную окисленную форму, токоферол-хинон [38, 39]. **Витамин С** ингибирует реакции перекисного окисления за счет двух различных механизмов:

1) В соответствии с нижеследующей реакцией он восстанавливает в мембранах токоферол-хинон до витамина Е:

а) **НО-аскорбат-ОН + α -токоферол-О $\cdot$ $\rightarrow$ α -токоферол-ОН + НО-аскорбат-О $\cdot$** (*семидегидро-аскорбиновая кислота*)

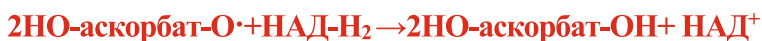
б) **НО-аскорбат-О $\cdot$ + α -токоферол-О $\cdot$ $\rightarrow$ α -токоферол-ОН + О=аскорбат=О** (*дегидро-аскорбиновая кислота*)

2) витамин С взаимодействует с активными формами кислорода [40], такими как супероксидный анион (O $\cdot$ 2), перекись водорода (H $_2$ O $_2$), гидроксильный радикал (НО $\cdot$), инактивируя их.

Затем протекает реакция *регенерации аскорбиновой кислоты*. Регенерация аскорбиновой кислоты идет с участием следующих микросомальной, цитозольной и митохондриальной ферментативных систем [40]:

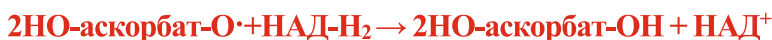
В микросомах:

С участием комплекса НАД-Н $_2$ -редуктаза-цитохром b $_5$:



В митохондриях:

С участием НАД-Н $_2$ -семидегидроаскорбат-редуктазы:



В цитозоле:

С участием НАДФ-Н $_2$ -дегидроаскорбат-редуктазы:



В цитозоле:

С участием GSH-дегидроаскорбат-редуктазы:



β -Каротин- это предшественник витамина А, который также обладает антиоксидантным действием и препятствует перекисному окислению мембранных липидов.

I.4.4.3. Соединения для связывания двухвалентного железа.

Для детоксикации двухвалентного железа в организме существует налаженная система окисления и связывания ионов двухвалентного железа. Большинство из соединений этой группы, включая природные соединения вроде дипептида карнозина, связывают железо и не позволяют ему проникнуть в липидную фазу мембран, поскольку в силу своей полярности образующиеся комплексы не проникают в гидрофобную толщу мембранных липидов [41]. В плазме крови система детоксикации железа представлена ферментом ферро-оксидазой (белком церрулоплазмином) и трансферрином [42]. Ферро-оксидаза окисляет с помощью кислорода Fe^{2+} до Fe^{3+} без образования свободных радикалов [42, 43]. Белок трансферрин связывает и переносит в кровяном русле ионы трехвалентного железа, которые затем захватываются клетками, в основном занимающимися гемопоезом. В клетках железо может восстанавливаться аскорбиновой кислотой и другими восстановителями, но затем оно вновь окисляется и депонируется уже в окисленной форме внутри белкового ферментного комплекса ферритина. Поскольку железо является про-оксидантом, то являющиеся «ловушками железа» ферритин и трансферрин являются неспецифическими маркерами воспалительного процесса, особенно в фазу альтерации [44].

I.5. Использование кислорода с целью обеспечения клетки энергией.

I.5.1. Общие пути окисления пищевых субстратов.

Как мы отмечали выше, все химические соединения в конечном итоге, пройдя специфические пути окисления, включаются в общие пути окисления. Общими путями окисления называются:

* Декарбоксилирование пировиноградной кислоты – I общий путь катаболизма,

* Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), или цикл лимонной кислоты, называемый также циклом Кребса -это II общий путь катаболизма.

Глюкоза является центральным субстратом, поставляющим энергию в живые системы. Глюкоза - это шестиуглеродный моносахарид, в химических связях, электронах и протонах которого накоплена энергия квантов солнечного излучения. Поэтапное окисление глюкозы в клетке ведет не только к освобождению имеющейся в ней энергии, но и снабжает организм промежуточными продуктами с углеродными скелетами, могущими в дальнейшем использоваться на синтез других необходимых компонентов, таких как аминокислоты, азотистые основания, нуклеотиды, липиды и т.д. [45]. Но основное предназначение глюкозы - это все-таки гликолиз, т.е. путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (от греч. Γλυκός – сладкий и греч. λύσις – расщепление). Это снабжение организмов энергией, большая часть которой высвобождается уже после ее превращения в пируват. Пируват образуется также из таких аминокислот как глицин, аланин, серин, цистеин, треонин, гидроксипролин, цистин и т.д. и глицерина. Пируват образуется в цитозоле, затем пересекает мембрану митохондрии для дальнейшего окисления. Переносчиком пирувата в толщу митохондрий является *карнитин фосфат* [46].

I.5.1.1. Окисление пируватапируватдегидрогеназным (пируватдекарбоксилазным) комплексом

После поступления пирувата в матрикс митохондрии начинается извлечение из него энергии.



Начинается процесс с окисления пирувата до ацетил-КоА под действием важнейшего ферментного комплекса под названием пируват-дегидрогеназа. Этот комплекс состоит из 12 единиц [47]. Этот мультиферментный комплекс, состоящий из 3 ферментов, принимает участие в реакциях дегидрирования и декарбоксилирования. Пируват-дегидрогеназный комплекс содержит 3 фермента:

1. Пируват – декарбоксилаза (кофермент – тиамин-пирофосфат (ТПФ))
2. Дигидролипоат-трансацилаза (кофермент – липоевая кислота (ЛК))
3. Дигидролипоат-дегидрогеназа (кофермент – флавиноаденин динуклеотид (ФАД)).

Для проявления активности пируват-дегидрогеназный комплекс требует наличия определенных витаминов в форме коферментов. В I общем пути катаболизма помимо ТПФ, ФАД и ЛК участвуют HS-КоА и НАД⁺, находящиеся в среде в свободном виде. Так что в I общем пути катаболизма в общей сложности участвуют 3 фермента и 5 коферментов. Во время этого многоэтапного процесса трехуглеродный пируват окисляется до содержащего два углерода ацетил-КоА. Сам же пируват-дегидрогеназный комплекс регулируется специфическими киназами и фосфатазами [48].

I общий путь катаболизма протекает в 5 стадий. Как только пируват проникает в пируват-дегидрогеназный комплекс, реакция его окисления протекает до конца, так что процесс сопровождается освобождением с поверхности комплекса конечного продукта – ацетил-КоА, тогда как промежуточные продукты всегда остаются связанными с ферментами комплекса [49].

В первой реакции **пируватдегидрогеназа** за счет тиамин-пирофосфата отщепляет от пирувата диоксид углерода с образованием гидроксизтильного производного тиазолового кольца ТПФ. На второй стадии от гидроксизтильной группы отщепляются атомы водорода, что сопровождается переносом ацетильной группы к остатку серы липоевой кислоты, являющейся простетической группы **дигидролипоил-трансацилазы**. На третьем этапе ацетильная группа переносится от липоевой кислоты на тиоловую группу HS-CoA. По окончании реакции с поверхности мультиферментного комплекса высвобождается образованный в этой реакции конечный продукт - ацетил-КоА. Во время этой реакции липоевая кислота восстанавливается до дигидролипоамида. На четвертой стадии дигидролипоамид дегидрогеназа отщепляет водороды от дигидролипоамида. На этой стадии соединенный с **дигидролипоамид дегидрогеназой** кофермент ФАД восстанавливается до ФАД-Н₂, а липоат вновь переходит в свою окисленную форму. На пятой стадии водороды, все еще соединенные с коферментом ФАД третьего фермента - дигидролипоамид дегидрогеназы, в виде гидрид-ионов переносятся на НАД⁺, в результате чего образуется НАД-Н + Н (НАДН₂). Итак, одна молекула пирувата при окислении в пируватдегидрогеназном комплексе образует одну молекулу ацетил-КоА, одну молекулу СО₂ и одну молекулу НАД-Н+Н. Сам же пируватдегидрогеназный комплекс регулируется ионами Са²⁺ и АТФ [50]. Когда содержание АТФ в клетке повышается, пируватдегидрогеназный комплекс ингибируется [51].

1.5.1.2. Окисление ацетата в цикле Кребса

Затем ацетил-КоА поступает в ЦТК (II общий путь катаболизма), и окисление продолжается. Этот цикл называют циклом Кребса, поскольку этот циклический процесс был открыт Хансом Кребсом. За это открытие Ханс Кребс в 1953-м году получил нобелевскую премию по медицине [52]. Двухуглеродный ацетил-КоА включается в циклический процесс, образуя конечные продукты распада, а именно CO_2 и H_2O . Этот цикл состоит из серии реакций, в которых происходит химическая модификация субстрата под названием «оксалоацетат», причем первая реакция состоит из конденсации оксалоацетата с ацетил-КоА. Переносчики энергии, такие как НАД⁺ и ФАД, собирают выделяющуюся в этих реакциях энергию в форме связанных с этими кофермента протонов и переносят ее на цепь переноса электронов (ЦПЭ). Окисленные и восстановленные формы этих переносчиков регулируют активность ферментов, катализирующих реакции ЦТК. Так, восстановленные формы НАД⁺ и ФАД, а именно $\text{НФДН}^+ + \text{H}$ и ФАДН_2 ингибируют ферменты II общего пути катаболизма, тогда как их окисленные формы, т.е. собственно НАД⁺ и ФАД, наоборот, стимулируют их. Этот цикл универсален и присутствует практически во всех содержащих митохондрии живых организмах, начиная от одноклеточных и кончая многоклеточными, как растениями, так и животными [53].

Итак, цикл Кребса является процессом окисления ацетил-КоА – универсального продукта катаболизма углеводов, жиров и белков. Цикл Кребса протекает в митохондриях с участием ферментов, которые локализованы в матриксе в свободном состоянии, или же фиксированы на внутренней поверхности внутренней мембраны. В цикле Кребса, как и в первом общем пути катаболизма, участвуют 5 витаминов: В₁, В₂, РР, пантотеновая кислота и липоевая кислота в виде коферментов тиаминпирофосфата, ФАД, НАД⁺, HS-КоА и липоата.

Основной функцией цикла Кребса является образование водородных эквивалентов, которые обеспечивают синтез макроэргических соединений в цепи окислительного фосфорилирования. Кроме того, цикл Кребса выполняет ведущую роль в процессах глюконеогенеза, переаминирования, дезаминирования АК, липогенеза и синтеза гема [54]. Можно сказать, что этот циклический процесс интегрирует все виды обмена веществ.

ЦТК

Регуляция цикла Кребса осуществляется с участием 4 регуляторных ферментов: цитратсинтазы, изоцитрат дегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы. Цикл Кребса ингибируется в основном НАД-Н₂ и АТФ, которые являются продуктами цикла Кребса и участвуют в цепи окислительного фосфорилирования. Активируют ЦТК в основном НАД⁺ и являющийся сигналом нехватки энергии в клетке АДФ.



Обычно ЦТК делят на 8 этапов, каждый из которых контролируется определенным ферментом. Этот циклический процесс начинается с реакции конденсации оксалоацетата с ацетил-КоА, образованным при окислении пирувата.

1. Таким образом, цикл начинается с реакции соединения двухуглеродного ацетил-КоА с четырех углеродным оксалоацетатом под действием фермента цитрат синтазы. *Цитрат синтаза* локализуется в матриксе митохондрий, является регуляторным ферментом ЦТК, и активность его регулируется содержанием в среде наряду с АТФ, НАДН₂ также сукцинил-КоА. В общей сложности, цитрат синтазу активируют оксалоацетат (щавелево-уксусная кислота), НАД⁺; а ингибируют АТФ, НАД-Н₂, сукцинил-КоА, цитрат: повышение содержания этих компонентов в среде снижает продуктивность фермента цитрат синтазы [55]. Продуктом первой реакции цикла Кребса является шестиуглеродная дикарбоновая кислота, цитрат.

2. Затем *аконитаза* обратимо превращает цитрат в изоцитрат с образованием промежуточного метаболита – цис-аконитата. При этом происходит сначала отщепление молекулы воды, потом – ее присоединение, но уже в другом месте, что ведет к образованию изомера цитрата – изоцитрата. Аконитаза также локализуется в матриксе митохондрий.

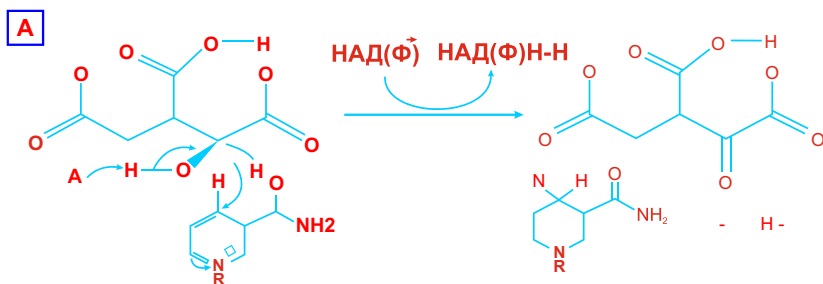
3. Затем изоцитрат подвергается дегидрированию и декарбоксилированию под действием ферментного комплекса – *изоцитратдегидрогеназы* с образованием α-кетоглутарата. Обычно коферментом в этой реакции является НАД⁺. Активность этого фермента, как впрочем и других, регулируется соотношением АТФ/АДФ. Эта окислительно-восстановительная реакция самая медленная в цикле Кребса. Изоцитратдегидрогеназа локализуется в матриксе митохондрий, ее активируют АМФ, Са²⁺, АДФ, НАД⁺; ингибируют АТФ, НАДН₂ [56]. Систематическое название

фермента *изоцитратдегидрогеназы* пишется как изоцитрат: НАД⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая). Ниже представлен механизм распада изоцитрата до α -кетоглутарата (рис. 16).

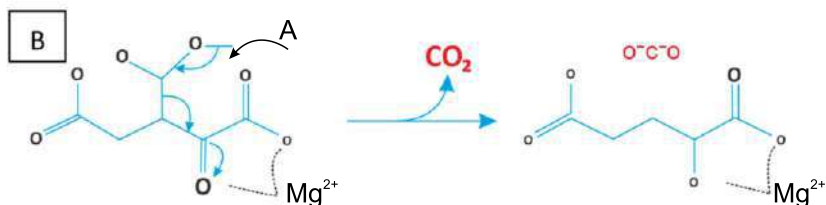


Рис.16.Окисление изоцитрата до α -кетоглутарата. Реакция протекает поэтапно (А, В, С). Н-А- гидрид анион

Сначала образуется оксало-сукцинат, и только после этого α - кетоглутарат. Образование промежуточного соединения всего лишь предполагается, поскольку оно пока еще реально не обнаружено. В реакции изоцитрат $\rightarrow$ α - кетоглутарат, молекулы воды депротонируют изоцитрат по следующей схеме.



1. Этап первый. А. Спиртовая группа альфа-углерода изоцитрата депротонируется образуя кетонную группу.



2. Этап второй. В. Оксалосукцинат декарбоксилируется.



3. Этап третий. С. Ненасыщенная двойная связь (между атомами углерода 2 и 3) насыщается водородом.

4. Следующая окислительно-восстановительная реакция происходит под действием фермента с систематическим названием α -кетоглутарат: НАД⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая). α -кетоглутарат является ключевым метаболитом в клеточном метаболизме. Так, он используется в синтезе глутамата, глутамина, пролина и других аминокислот. Но в ЦТК α -кетоглутарат превращается в сукцинат. Эта реакция протекает в 2 этапа под действием фермента α -кетоглутарат дегидрогеназы. Действие фермента аналогично таковому пируват дегидрогеназного комплекса. Только в конце реакции макроэргическая связь образуется не в составе ацетил-КоА, а в составе сукцинил-КоА. α -кетоглутарат дегидрогеназный комплекс состоит из 3 ферментов и содержит 5 коферментов: тиамин дифосфат, кофермент А, липоевая кислота, НАД⁺, ФАД. α -кетоглутарат дегидрогеназа активируется ионами Ca^{2+} , ингибируется сукцинил-КоА, АТФ, НАДН₂ [57]

5. Высокоэнергетическая связь, появившаяся в составе сукцинил-КоА, используется на преобразование ГДФ в ГТФ в реакции субстратного фосфорилирования, при этом сукцинил-КоА превращается в сукцинат. Реакция катализируется *сукцинил-КоАсинтетазой* (*сукцинат-тиокиназой*), ферментом с систематическим названием сукцинат: HS-КоАлигаза (ГТФ - ГДФ+Рн) [58].

6. В дальнейшем в окислительно-восстановительной реакции под действием ФАД-содержащего фермента, *сукцинат дегидрогеназы* (СДГ), сукцинат превращается в фумарат. Сукцинат дегидрогеназа, флавопротеин содержащий Fe_2S_2 , связана с внутренней мембраной митохондрии. СДГ ингибируется янтарил-уксусной кислотой и сукцинил-КоА [59]. Как можно заметить, в отличие от остальных дегидрогеназ ЦТК, коферментом сукцинат дегидрогеназы является не НАД⁺, а ФАД. Итак, в результате реакции ФАД восстанавливается до ФАДН₂. Заметим, что малонат наряду с оксалоацетатом является конкурентным ингибитором этого фермента. Интересно также заметить, что сукцинат дегидрогеназа всегда отщепляет водороды в транс-положении, так что в результате реакции всегда образуется транс-изомер малеиновой кислоты – фумарат, малеиновая же кислота является цис-изомером фумаровой кислоты.

7. Затем *фумараза*, или *фумарат-гидратаза* присоединяет молекулу воды к фумарату с образованием малата. Фумараза локализуется в матриксе митохондрий, систематическое название этого фермента: фумарат:гидро-лиаза. Надо отметить, что фермент фумараза также обладает стереохимической специфичностью и никогда не действует на малеиновую кислоту, ее субстратом является только ее стереоизомер, фумарат.

8. Затем при помощи последнего фермента этого цикла, *малат дегидрогеназы*, малат вступает в, 8-ю, финальную реакцию ЦТК с тем чтобы вновь образовать оксалоацетат.

Малат дегидрогеназа, катализирующая последнюю окислительно-восстановительную реакцию ЦТК, локализуется в матриксе митохондрий, систематическое название фермента: малат: НАД⁺ оксидо-редуктаза [60]. Образованный оксалоацетат вновь конденсируется с очередной молекулой ацетил-КоА, с тем чтобы вновь повторить весь цикл заново. Малат-дегидрогеназу иногда ошибочно называют малик-энзимом [60, 61], хотя последний катализирует декарбоксилирование оксалоацетата превращая его в пируват, тогда как малат-дегидрогеназа производит исключительно дегидрирование субстрата без декарбоксилирования.

1.5.1.2.1. Энергетический баланс одного оборота ЦТК

В конце цикла Кребса за счет 4 окислительно-восстановительных реакций образуются 3 НАДН₂ и 1 ФАДН₂, которые направляются далее в дыхательную цепь окислительного фосфорилирования. В процессе окислительного фосфорилирования в организме человека, в ЦПЭ из 1 НАДН₂ образуется 2,5 АТФ, из 1 ФАДН₂ - 1,5 АТФ. Из 1 ГТФ, образующейся в цикле Кребса за счет субстратного фосфорилирования, синтезируется 1 АТФ. В итоге сгорание ацетил-КоА в цикле Кребса в живом организме ведет к образованию *10 молекул АТФ*.

1.6. Окислительное фосфорилирование, или дыхательная цепь

1.6.1. Митохондрия: особенности химического состава и строения.

Митохондрии – это самостоятельные органеллы клеток с собственным ДНК, имеющие 2 мембраны: наружную

гладкую и внутреннюю с многочисленными складками – кристами; внутреннее пространство митохондрий заполнено матриксом, полным ферментов участвующих в последних, решающих стадиях разрушении питательных веществ. Наружная мембранасодержит много белкапорина, образующего гидрофильные каналы [61]. Эти каналы пропускают через мембрану неорганические ионы, метаболиты и даже небольшие белки с молекулярной массой меньше 10кДа [62]. Она содержит также следующие ферменты: элонгазы, которые удлиняют молекулы насыщенных жирных кислот, кинуренин-гидроксилазу, моноаминоксидазуи др.

Моноаминоксидаза является маркером присутствия митохондрий в образце [63].

Межмембранное пространство митохондрий содержит ферменты: аденилатциклазу, нуклеозид-дифосфаткиназы [64]. Внутренняя мембрана высоко специфична, на 70% состоит из белков, которые выполняют каталитическую и транспортную функции. Внутренняя мембрана содержит ферменты: а) цепи окислительного фосфорилирования, б) сукцинат-дегидрогеназу, в) β -оксибутират дегидрогеназу; г) карнитин-ацилтрансферазу, д) карнитин-ацилтранслоказу [64, 65]. Цитохромоксидаза является маркером наличия внутренней мембраны в образце [63, 64, 66]. Внутренняя мембрана на 30% состоит из фосфолипидов, из них 20% приходится на кардиолипид [67]. Кардиолипид делает мембрану непроницаемой для всех ионов. Матрикс на 50% состоит из белка, т.к. содержит сотни различных ферментов: а) ферментыцикла Кребса, б) ферменты β -окисления жирных кислот, в) аминотрансферазы аланин-аминотрансфераза (АЛАТ) иаспартат-аминотрансфераза (АСАТ), г) глутамат-дегидрогеназа, д) фосфоенолпируват-карбоксилаза, е) пируват-дегидрогеназа. Матрикс содержит также несколько копий митохондриальной ДНК, митохондриальные рибосомы и тРНК, так что митохондрия – это самостоятельная единица клетки, способная к самопроизвольному делению

в случае повышения ее потребности в источниках энергии. Это объясняет факт адаптации организма и отдельных органов к возрастающим нагрузкам в состоянии стресса, усиленных нагрузок. В клетке содержится от сотни до тысячи митохондрий, размер которых равен 2-3 мкм в длину и 1 мкм в ширину.

1.6.2. Роль митохондрий в метаболизме и гомеостазе клетки

В митохондриях происходит, в первую очередь, синтез АТФ в реакции окислительного фосфорилирования и теплопродукция. Кроме того, в митохондрии происходит β -окисление жирных кислот, реакции цикла Кребса, и через посредство цикла трикарбоновых кислот протекают определенные реакции глюконеогенеза, переаминирования, дезаминирования, липогенеза и синтеза гема, в конечном счете осуществляется интеграция белкового, липидного и углеводного обменов.

1.6. 3. Причины повреждений митохондрий и их последствия

Повреждение внутренней мембраны митохондрий разнообразными химическими и физическими факторами приводит, в первую очередь, к разобщению окислительного фосфорилирования, нарушению синтеза АТФ, что ведет в свою очередь к торможению анаболических реакций, межмембранного транспорта и всех видов обмена веществ. Большая часть энергии, высвобождаемой при окислении субстратов в ЦТК, переносится в виде восстановительных эквивалентов, в форме протонов H^+ и электронов, на НАД⁺ и ФАД. Будет уместно отметить, что НАД принимает гидрид-ион (водород и один электрон), поэтому более

правомочно писать восстановленный НАД⁺ в форме НАДН⁺ + Н, однако для простоты его чаще обозначают как НАДН₂. В общем, в биохимии используются обе формы написания восстановленного НАД⁺. Восстановленные НАД⁺, а именно НАДН + Н, образованные в двух общих путях катаболизма в матриксе митохондрий, переносятся на ЦПЭ, встроенную во внутреннюю мембрану митохондрий. Нагруженные протонами компоненты ЦПЭ в виде НАДН + Н и ФАДН₂ (образованных при окислительном декарбоксилировании пирувата и в ЦТК), переносят свои протоны и электроны во внутреннюю мембрану митохондрий. Здесь эти коферменты ферментов подвергаются ряду окислительно-восстановительных реакций, высвобождающих энергию, содержащуюся в их протонах и электронах. При передвижении по ЦПЭ электроны высвобождают кванты энергии, и именно она трансформируется в энергию АТФ. Эти кванты энергии – не что иное как энергия квантов солнечного излучения, некогда запасенная фототрофами в пластидах хлоропластов. При поглощении квантов солнечного излучения электрон переходит на более высокую орбиталь, сохраняя таким образом в своей структуре солнечную энергию. В митохондриях же идет прямо противоположный процесс – освобождение запасенной в электроне энергии. Электрон при продвижении по ЦПЭ выделяет эти кванты и переходит на самую низкую орбиталь, что означает обеднение его энергетического состояния [13]. Именно такой электрон и протон составляют основу воды, выделяемой из организма, т.е. энергия содержащейся в выделяемой почками моче воде минимальна. Освобождаемая при транспорте электронов в ЦПЭ свободная энергия трансформируется в химическую энергию макроэргических связей и накапливается в виде АТФ. Грубо говоря, весь процесс ЦПЭ сводится к соединению водорода с кислородом – реакции, составляющей основу водородной бомбы [76]. Как видим, энергии, заключенной в водороде, вполне достаточно для производства

взрыва, но у нас в митохондриях никакого взрыва не происходит. Причина в том, что богатая энергия протонов и электронов, заключенная в субстратах, освобождается в цепи переноса электронов постепенно, а не мгновенно [68], т.е. здесь НАДН₂ окисляется, высвобождая имеющуюся в водородах энергию и снабжая организм АТФ, после чего АТФ переносится транслоказой из матрикса митохондрий в цитоплазму.

Непосредственный синтез АТФ протекает во время движения протонов и электронов по ЦПЭ. Для этого митохондрия снабжена рядом ферментов из класса оксидоредуктаз, связанных с кристами митохондрии и составляющими дыхательную цепь. Каждая оксидоредуктаза имеет свою специфическую коферментную группу, непосредственно участвующую в процессе окисления-восстановления. Как правило, эти коферменты являются активными формами витаминов РР, В₂, убихинона или же представлены, как например у цитохромов. Дыхательная цепь переносит электроны и протоны на кислород, поступающий в клетки тканей по принципу разности парциального давления вне митохондрий и внутри их, так что необходимым условием постоянного движения кислорода внутрь митохондрий является его потребление в конечной реакции дыхательной цепи, т.е. соединение протонов и электронов с молекулой кислорода с образованием молекулы воды. Поскольку объем потребляемого легкими кислорода прямо пропорционален количеству кислорода, используемому в окислительном фосфорилировании, то по поступлению кислорода в организм можно определять величину аэробного энергообразования [3, 69]. Усиление частоты дыхания и частоты сердечных сокращений при выполнении физических нагрузок является следствием интенсификации окислительных процессов и ЦПЭ, поскольку этот процесс удовлетворяет возросшую потребность в АТФ.

Нормализация же дыхания и пульса происходит только после удовлетворения потребности организма в кислороде и погашения клетками организма задолженности по АТФ [3].

1.7. Электрохимический потенциал

Компоненты цепи переноса электронов располагаются в мембране в порядке повышения их **редокс-потенциала**. При переходе электрона e^- от комплекса с низким редокс-потенциалом к комплексу с более высоким редокс-потенциалом происходит выделение **свободной энергии**. Например, при окислении 1 НАДН₂ выделяется 220 кДж/моль свободной энергии. I, III и IV комплексы дыхательной цепи используют 65-70% выделенной свободной энергии для переноса H^+ из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, 30-35% выделившейся свободной энергии рассеивается в виде тепла. Протоны и электроны движутся по цепи постепенно высвобождая заключенную в них свободную энергию **G**. В общем, редокс-потенциал можно представить как способность вещества восстанавливать какой-либо компонент. Его можно также охарактеризовать как сравнительную способность восстановителя отдавать водороды, причем как правило, эта способность сопоставляется с таковой водорода (F_0). Редокс-потенциал самого водорода принимается за «нуль». Рассчитывается он при pH 7, 25⁰C, в растворе 1 молярной концентрации (1.0 атом водорода в растворе), потенциал водорода -0.417В. [70]. Вещество, имеющее негативное значение F_0 является лучшим донором, чем водород. И наоборот, вещество, имеющее положительный редокс-потенциал, является худшим чем водород восстановителем — такое вещество будет скорее всего выступать в реакции в роли окислителя. Движение происходит от более электроотрицательных компонентов (восстановителей) к более электропозитивному кислороду (окислителю). При переходе из восстановленного

состояния в окисленное происходит высвобождение энергии с переходом веществ в более стабильное состояние, именно этот фактор и поддерживает поток электронов к электронегативным компонентам [69, 70, 71].

Свободную энергию можно представить в виде энергии, запасаемой в химических связях вещества, которая при разрыве этих связей превращается в свободно конвертируемую форму энергии, отчего этот вид энергии и получил название “свободной энергии» [72, 73].

Когда мы говорим «донор» или «акцептор» водорода, эти термины не выражают количества энергии, передаваемой в реакции. Так, известно что хотя восстановительный компонент и передает свой водород на окислитель, но он сам тоже обладает некоей способностью принимать и удерживать водороды. Просто в данной окислительно-восстановительной паре вещество, более прочно связывающее электроны проявляет свою способность принимать электрон от восстановителя и выступает в роли окислителя. Поскольку способность принимать (или терять) электроны может быть измерена в **вольтах (В)**, эта величина и выражает величину окислительно-восстановительного потенциала. Для удобства потенциал большинства пар измеряется относительно общепринятого стандарта, каковым является водородный электрод. Большинство этих измерений, как и для водорода, производится в стандартных условиях, а именно: в 1.0 М (молярном) растворе окислителя и восстановителя при температуре 25°C и в нейтральной среде (pH=7). Водородный электрод представлен газообразным водородом при давлении в 1 атмосфер и при температуре 25°C, когда концентрация $[H^+]$ равна 1 М. Как мы уже отмечали выше, когда pH доходит до 7.0, т.е. $[H^+] = 10^{-7}$ М, значение водородного электрода равно -0,417 (~ -0. 42) В. Восстановительный потенциал транспортирующих электроны компонентов E'_0 дан в нижеследующей таблице. Чем выше значение E'_0 (в

вольтах), тем сильнее окислитель и тем больше его способность перенимать электроны. Вещество с меньшим E'_0 , чем компонент его пары, в данной паре выступает восстановителем, или донором протонов и электронов.

Табл. 5. Окислительно-восстановительные потенциалы компонентов ЦПЭ (данные приведены касательно двух-электронного транспорта при $pH=7$ и температуре $25-30^\circ C$).

Соединение в реакции в качестве окислителя	Соединение в реакции в качестве восстановителя	E'_0 , В
$2H^+$	H_2	-0.42
НАД ⁺	НАД- H_2	-0.32
НАДФ ⁺	НАДФ- H_2	-0.32
ФАД; ФМН	ФАД- H_2 ; ФМН- H_2	-0.12
Коэнзим Q	Коэнзим QH ₂	+0.04
Цитохром b (Fe^{+3})	Цитохром b (Fe^{+3})	+0.07
Цитохром C ₁ (Fe^{+3})	Цитохром C ₁ (Fe^{+2})	+0.23
Цитохром a (Fe^{+3})	Цитохром a (Fe^{+2})	+0.29
Цитохром a ₃ (Fe^{+3})	Цитохром a ₃ (Fe^{+2})	+0.55
$\frac{1}{2} O_2$	H_2O	+0.82

Как становится ясным из таблицы 5, пара НАД + H^+ / НАД⁺ (редокс-потенциал = -0,32 В) легко отдает свои электроны сравнительно более положительной окислительно-восстановительной паре ФАД/ФАДН₂ (восстановительный потенциал = -0,12 В).

Уравнение Хендерсона-Хазельбаха описывает связь между pH и константой диссоциации компонентов окислительно-восстановительной пары [74, 75]:

$$E_h = E'_0 + \frac{2.3RT}{nT} \log \frac{\text{окислитель}}{\text{восстановитель}}, \text{ где}$$

E'_0 – это стандартный редокс-потенциал (восстановительный потенциал),

E_h - наблюдаемый на электроде потенциал. E_h зависит от рН среды.

R - это Универсальная газовая постоянная, $= 8,314\ 462\ 618\ 153\ 24$ Дж/(моль·К)

T - это абсолютная температура в Кельвинах, n - это количество транспортируемых электронов, F - это число Фарадея $= 9,6485 \cdot 10^7$ Кл Аналогично, уравнение Нернста [73, 74] показывает взаимосвязь между стандартным редокс-потенциалом E'_0 и редокс-потенциалом, наблюдаемым при любой выборочной концентрации для редокс-пары, а также соотношение концентраций окислителя и восстановителя. Изменение энергии, когда передача электронов происходит в отличных от стандартных условиях, вычисляется по формуле Нернста:

$$E_h = E'_0 - \frac{0.06}{n} \log \frac{\text{окислитель}}{\text{восстановитель}}$$

, где n - это количество транспортируемых электронов, E_h – электродный потенциал, E'_0 – стандартный электродный потенциал, измеряется в Вольтах.

1.8. Компоненты цепи переноса электронов

Располагаясь в последовательности НАДН₂ → комплекс I → коэнзим Q → комплекс III → цитохром с → комплекс IV → O₂, компоненты цепи переноса электронов в митохондриях обеспечивают максимально возможное извлечение энергии из передаваемого по цепи водорода [76]. Первые 4 комплекса I - IV расположены линейно в толще внутренней мембраны митохондрий, тогда как V комплекс грибовидно выступает в матрикс, на поверхность внутренней мембраны. Головка V комплекса F₁ направлена в сторону матрикса, базальная же часть комплекса погруже-

на в липидный слой мембраны. Чувствительный к олигомицину конформационный белок является стержнем этого комплекса. Как видно из рисунка 17, помимо упомянутых выше четырех комплексов, в ЦПЭ имеются лабильные, свободно плавающие в толще мембраны компоненты:

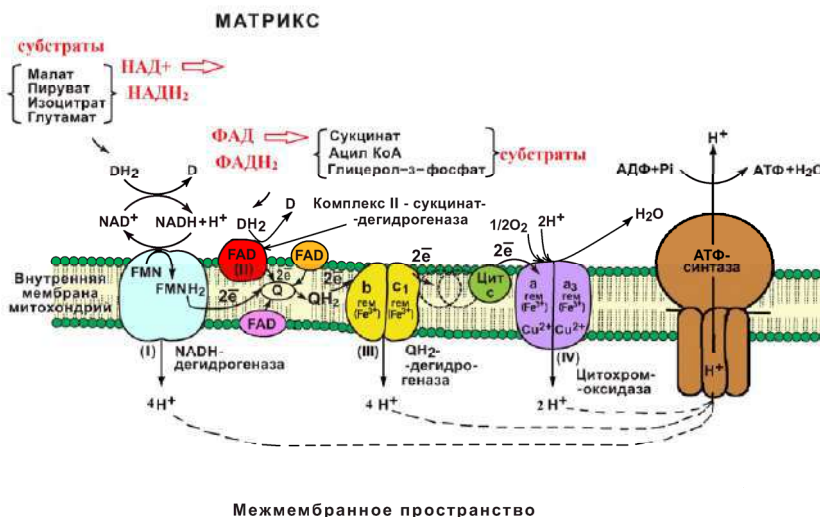


Рис.17. Схема цепи переноса электронов (ЦПЭ) в митохондриях

это коэнзим Q и цитохром С. Коэнзим Q действует как челнок между комплексами I и III, а также между комплексами II и III, кроме того он переносит электроны между некоторыми другими компонентами мембраны, которые тоже достаточно свободно движутся в толще мембраны. Цитохром С же является челноком между комплексами III и IV. НАДН₂ реагирует только с комплексом I, и ни с каким другим компонентом кроме него. Точно так же ФАДН₂ реагирует только с комплексом II.

Компоненты дыхательной цепи находятся во внутренней мембране митохондрий в виде белково-липидных комплексов, которые как бы прошивают мембрану. Лишь коэнзим Q (КоQ) и цитохром С, в отличие от встроенных в

мембрану комплексов ЦПЭ не имеют строго постоянного места в толще мембраны.

Как было отмечено выше, ферменты, называемые дегидрогеназами, катализируют перенос протонов и электронов от окисляемых субстратов в основном на НАД⁺. Восстановленный НАД⁺, т.е. НАДН₂, затем окисляется под действием ФМН-содержащего фермента, НАД⁺-дегидрогеназы. Далее ФМН-содержащий фермент переносит восстановительные эквиваленты, т.е. электроны, на КоQ. После этого электроны передаются через ряд цитохромов на молекулярный кислород. Непосредственно на кислород восстановительные эквиваленты передает терминальный цитохром – цит ааз. В отличие от остальных цитохромов, содержащих железо, как и все остальные оксидазы, цитохром ааз дополнительно содержит ион меди.

Исследование *in vivo* дышащей митохондрии выявило, что когда субстраты окисляются в дыхательной цепи организма через посредство НАД-зависимых дегидрогеназ, в состав АДФ включается самое большое – 2.5 моль неорганического фосфата с тем чтобы образовать 2.5АТФ. Однако *in vitro* в данном процессе может образовываться 3 молекулы АТФ. Когда же окисление в цепи фосфорилирования происходит посредством дегидрогеназ, связанных с флавопротеином, а в частности через сукцинатдегидрогеназу (СДГ), образуется не более 1.5. моль АТФ (*in vitro* может образовываться 2 АТФ). Это означает, что вопреки широко распространенному мнению о том, что при окислении субстратов в ЦПЭ посредством НАД и ФАД образуется соответственно 3 и 2 молекулы АТФ [3, 11, 12, 77, 78] (что действительно происходит, но только в интактных митохондриях, *in vitro*), в реальности в человеческом организме, т.е. *in vivo* мы имеем дело с меньшей производительностью ЦПЭ, при которой максимальный выход АТФ равен 2.5 и 1.5. моль АТФ при окислении посредством НАД и ФАД

соответственно [4, 7, 75, 79]. Оставшаяся свободная энергия, которая не перешла в состав АТФ, высвобождается в виде тепла, поддерживая температуру тела теплокровных организмов.

Совокупность всех реакций ЦПЭ иногда называют также окислительным фосфорилированием на уровне дыхательной цепи. Степень активности дыхания митохондрий может регулироваться концентрацией АДФ. При производстве клеткой работы АТФ активно превращается в АДФ, увеличение же концентрации АДФ ведет к стимулированию тканевого дыхания, и в конечном итоге – к пополнению запасов АТФ. По этой причине за исключением экстремальных ситуаций, концентрация АТФ в клетке в норме поддерживается на постоянном уровне, поскольку как правило количество синтезируемого АТФ соответствует количеству потребленного АТФ. Исключение составляют состояния интенсивной физической нагрузки, когда пул макроэргических соединений истощается за счет миокиназной реакции: в это время 2АДФ образуют АТФ и АМФ, поскольку дезаминируясь АМФ превращается в инозин монофосфат и удаляется из организма, снижая содержание в клетке нуклеозид фосфатов [3].

Как было сказано выше, освобождение содержащейся в протонах и электронах свободной энергии происходит постепенно, и соединяется с кислородом уже настолько обедненный энергией электрон, что он уже не способен вызвать взрыв, как это происходило бы при непосредственном соединении кислорода с водородом [76].

Итак, *медленное* извлечение энергии водорода позволяет защитить митохондрии от повреждения, которое могло бы возникнуть при хаотическом соединении молекул H_2 и O_2 .

1.8.1. Особенности ферментов ЦПЭ

Рассмотрим работу ЦПЭ более подробно. Выше уже было упомянуто, что окислительно-восстановительные ферменты погружены во внутреннюю мембрану митохондрии и организованы в 5 комплексов. Каждый переносчик протонов передает электроны от предыдущего субстрата к последующему переносчику, что на самом деле ассоциируется с передачей свободной энергии, и все переносчики соединены в комплексы. Начиная от I комплекса и до IV, все они расположены линейно и погружены в толщу внутренней мембраны, тогда как комплекс V располагается на внешней поверхности крист и погружен во внутреннюю мембрану лишь слегка: головка комплекса V направлена внутрь матрикса, сам же комплекс является продолжением линии переносчиков электронов (рис. 18).

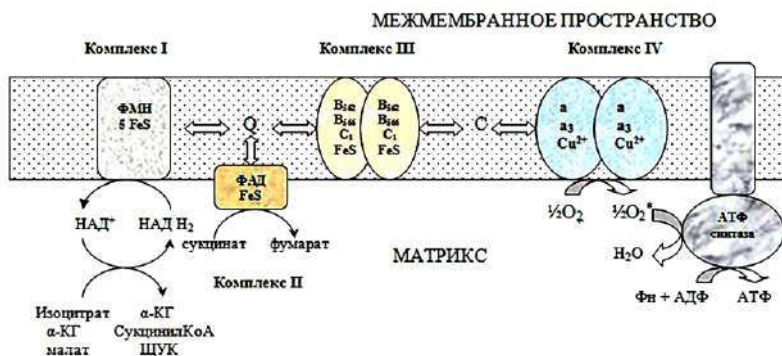


Рис. 18. Слаженная работа комплексов дыхательной цепи.

Комплекс I, НАДН₂ дегидрогеназный комплекс (рис. 19) – это самый большой из дыхательных ферментных комплексов. Он имеет молекулярную массу свыше 800 кДа, состоит из более 22 полипептидных цепей. Комплекс I

состоит не только из НАДН₂- дегидрогеназы с простетической группой ФМН в ней, но и содержит также от 16 до 24 железо-серных Fe-S белков. Согласно данным некоторых источников, НАДН₂ дегидрогеназный комплекс содержит 5 железо-серных (Fe₂S₂ и Fe₄S₄) белков [75, 76]. Около 40 % протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ, создаются комплексом I. При окислении НАДН₂ комплекс I переносит из матрикса в межмембранное пространство четыре протона. НАДН-дегидрогеназный комплекс отбирает у НАДН₂ два электрона и переносит их на убихинон. Все простетические группы комплекса I находятся в периферическом водорастворимом домене, у млекопитающих их восемь. Семь кластеров образуют электрон-транспортную цепь с длиной в ~96 Å от ФМН, которая тянется до места связывания убихинона. Считается, что перенос электронов в этом отрезке

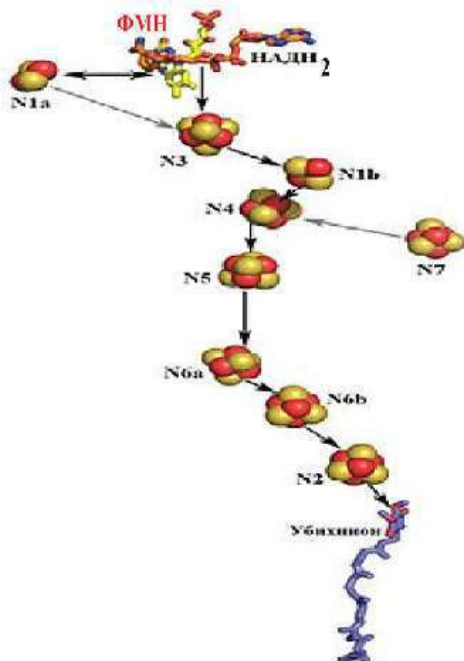


Рис. 19. НАДН₂ дегидрогеназный комплекс ЦПЭ. Рис. 19. НАДН₂ дегидрогеназный комплекс ЦПЭ.

ЦПЭ происходит по пути: $\text{НАДН}_2 \rightarrow \text{ФМН} \rightarrow \text{N}_3 \rightarrow \text{N}_{1b} \rightarrow \text{N}_4 \rightarrow \text{N}_5 \rightarrow \text{N}_{6a} \rightarrow \text{N}_{6b} \rightarrow \text{N}_2 \rightarrow \text{Q}$.

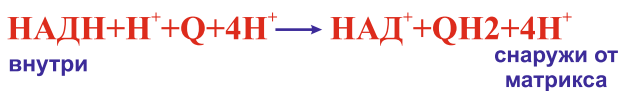
Сначала происходит передача двух электронов на флавин, а затем они по одному передаются через кластеры к месту связывания хинона и восстанавливают убихинон до состояния Q^{-2} .

Кластер N_{1a} располагается недалеко от флавинового кофактора, он стабилен у многих видов; предполагают, что он регулирует контроль скорости транспорта электронов. Существует модель, согласно которой один из электронов от флавина идет по основному пути на хинон, а другой запасается в кластере N_{1a} и позже включается в процесс через флавосемихинон основной цепи. Предполагаемое значение такой поэтапной передачи электрона состоит в том, чтобы снизить образование активных форм кислорода на восстановленном флавине, а возможно и предотвратить слишком быстрое высвобождение энергии из электрона, с тем чтобы можно было производить ЦПЭ с большим коэффициентом полезного действия. К тому же, это позволяет до долей секунды стабилизировать состояние ЦПЭ, когда последний кластер N_2 восстановлен, но второго электрона, чтобы завершить восстановление убихинона пока нет. Часть кластеров, такие как N_3 , N_4 и N_6 а имеют высокий окислительно-восстановительный потенциал на уровне - 0,25 В, в то время как три других - N_{1b} , N_5 и N_{6b} имеют более низкие редокс-потенциалы. В результате такого падения и повышения потенциала оптимизируется скорость транспорта электрона: иногда ускоряется, иногда тормозится, и это позволяет добиться более эффективного переноса энергии [78].

Кластер N_5 характеризуется чуть ли не самым низким потенциалом, из-за чего и лимитирует скорость общего потока электронов по всей цепи. Вместо характерных для железосерных центров лигандов с четырьмя остатками цистеина, он связан с тремя остатками цистеина, одним остатком гистидина и окружен заряженными полярными

остатками, несмотря на то что находится в глубине фермента [78, 80, 81]. Терминальный кластер цепи - N₂ тоже имеет нехарактерные для железо-серных белков лиганды, но имеет самый высокий редокс-потенциал среди всех кластеров: от -0,1 до -0,15 В. Так, он связан с четырьмя остатками цистеина, расположенными в полипептидной цепи последовательно, что помогает ему принять напряженную конформацию и подняться на самый высокий уровень восстановительного потенциала. При его восстановлении одновременно происходят конформационные изменения соседних цепей. Кластер N₇ является частью комплекса I только у некоторых бактерий. Он значительно удален от остальных кластеров, так что не может обмениваться с ними электронами. В некоторых бактериальных комплексах наподобие комплекса I, между N₇ и остальными кластерами находится четыре остатка цистеина. В комплексе I из бактерии *Aquifex aeolicus* имеется соединяющий N₇ с остальными кластерами дополнительный [Fe₄S₄] кластер. Видимо, комплекс I из *Aquifex aeolicus*, наряду с НАДН₂ может использовать иной субстрат для получения электронов, и этот субстрат передает электроны через N₇ [82].

НАДН-дегидрогеназный комплекс работает как протонная помпа: на каждый окисленный НАДН и восстановленный убихинон Q через мембрану в межмембранное пространство перекачиваются четыре протона [79, 80].



Как ни странно, но реакция, катализируемая комплексом I (аэробное сукцинат-индуцированное восстановление НАД⁺), обратима. Так, обычно когда много сукцината, но мало щавелевоуксусной или яблочной кислоты, на мембране устанавливается высокий потенциал, и весь убихинон находится в восстановленном состоянии. Тогда комплекс I может производить обратную реакцию, восстанавливая

НАД⁺, и тогда протоны заталкиваются обратно в матрикс. Поставщиками электронов для убихинона являются ферменты: Митохондриальная дигидрооротат-дегидрогеназа, сукцинат дегидрогеназа и т.д. Сродство комплекса I к убихинону повышается в условиях высокого протонного градиента, когда снижается редокс-потенциал убихинона, что и становится стимулом транспорта электронов обратно к НАД [81]. Этот феномен можно наблюдать в лаборатории, но наличие его в живой клетке не доказано.

В клетке в норме процесс передачи электронов протекает по нижеописанной схеме. Когда простетическая группа комплекса I связывается с простетической группой флавин-содержащего фермента, ФМН тут же восстанавливается до ФМН-Н₂, а НАДН₂ окисляется до НАД⁺. Постоянное восстановление и окисление НАД⁺ позволяет ему играть роль энергетического челнока. Когда НАДН₂ передает свои электроны на флавопротеид, ФМН принимает их от НАДН₂: от НАДН₂ ФМН принимает 2 электрона и один водород, а второй протон он берет из матрикса. Будучи восстановленным до состояния ФМН-Н₂, комплекс I передает электроны на серосодержащие белки, которые также являются частью комплекса I, протоны же при этом выталкиваются в межмембранное пространство. В конечном итоге электроны передаются от серосодержащих белков на КоQ. От КоQ электроны передаются на комплекс III, ассоциированный с другой протон-транслоказной системой.

Широко известный ингибитор комплекса I ротенон применяется на практике в качестве пестицида. Это изофлавоноид из корней тропических растений рода *Антония* (*Loganiaceae*), *Derris* и *Lonchocarpus* (*Fabaceae*). Ротенон издавна используется как инсектицид и рыбный яд: индейцы Южной Америки использовали ротенон-содержащие растения для ловли рыб еще в XVII веке [83]. Ротенон взаимодействует с участком связывания убихинона и конкурирует с субстратом. Интересен факт, что подавление

комплекса I ротеноном может спровоцировать селективное отмирание именно дофаминергических нейронов [83, 84]. Схожим образом действует и другой схожий с убихиноном-мощный ингибитор комплекса I, пиерицидин А (рис. 20).



Рис. 20. Пиерицидин А.

К этой же группе ингибиторов относится и производное барбитуровой кислоты -амитал натрия [83]. Гидрофобные ингибиторы ротенон и пиерицидин препятствуют переносу электрона с терминального кластера N_2 комплекса I на убихинон [82, 83]. Еще одно блокирующее комплекс I вещество, аденозиндифосфат-рибоза, является конкурентным ингибитором в реакции окисления НАДН₂. Она связывается с ферментом в месте связывания нуклеотида ФАД [85]. Антидиабетический препарат метформин является умеренным ингибитором комплекса I [86], а одними из самых сильных ингибиторов комплекса I являются вещества из семейства ацетогенинов (рис. 21), поскольку они образуют химические сшивки с субъединицей ND₂.

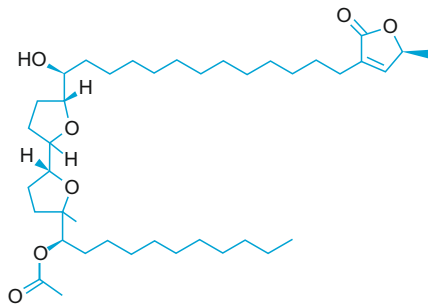
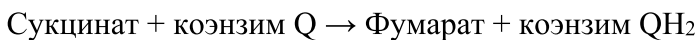


Рис.21. Ацетогенин уварицин

Этот обнаруженный учеными факт указывает на то, что ND_2 необходим для связывания убихинона [87]. Ингибитор комплекса I ацетогенин роллиниастатин-2 связывается в ЦПЭ в месте, отличном от ротенона [88].

Комплекс II, сукцинат дегидрогеназа, является отдельной стартовой точкой в ЦПЭ, и при передаче электронов посредством цепи, берущей начало от сукцинат дегидрогеназы, энергии образуется несколько меньше, чем при передаче их посредством НАД-дегидрогеназной системы. Комплекс II представлен ФАД- H_2 -содержащей сукцинат дегидрогеназой с коэнзимом ФАД в ней и 6-8 железо-серными Fe-S белками. Комплекс II окисляет сукцинат до фумарата и восстанавливает убихинон по следующей схеме:



Электроны от сукцината сначала переносятся на ФАД (рис. 22), затем через железо-серные Fe-S кластеры – коэнзим Q. Электронный транспорт в комплексе не сопровождается возникновением дополнительного протонного градиента, потому что образовавшиеся при окислении сукцината два протона остаются на той же стороне мембраны, где и происходила реакция, то есть в матриксе. Эти два протона переходят на хинон при его восстановлении [89, 90]. Точный механизм окисления сукцината неизвестен. Известно только, что теоретически, присутствующие в субъединице A ФАД, глутамат-255, аргинин-286, и гистидин-242 могут производить реакции отщепления протона. Существует два предполагаемых пути этой реакции: E_2 и E1cb . В случае E_2 аминокислотные остатки с основными свойствами (аргинин-286 и гистидин-242) или же кофактор отщепляют протон у α – углерода, и ФАД принимает гидрид-анион от β – углерода, что ведет к окислению сукцината в фумарат. Если же электроны движутся по пути E1cb , то сначала ФАД присоединяет гидрид-анион, после чего образуется энольная форма сукцината.

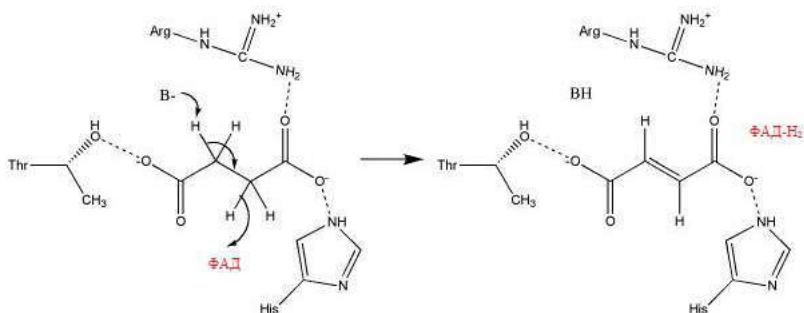


Рис. 22. Окисление сукцината

Во время реакции цитозольный субстрат-связывающий домен сукцинат-дегидрогеназы претерпевает следующие конформационные изменения: связавшись с субстратом, фермент переходит в закрытое состояние, плотно смыкаясь вокруг субстрата, но после освобождения фумарата фермент в открытом виде «поджидает новый субстрат» [91].

Одни из ингибиторов комплекса II блокируют центр связывания сукцината, а другие – участок связывания убихинона. К вытесняющим убихинон ингибиторам относятся карбоксин и теноилтрифторацетон. Одним из самых сильных ингибиторов комплекса II является щавелевоуксусная кислота. К ингибиторам, имитирующим сукцинат относятся также яблочная и малоновая кислоты [92]. Начиная с 1960-х годов вытесняющие убихинон из его связи с комплексом II ингибиторы стали использоваться в качестве фунгицидов. Например, для лечения заболеваний, вызванных базидиомицетамистеблевой ржавчины, *Rhizoctonia* использовался карбоксин. Сейчас больше пользуются фунгицидами пентиопирадом (рис. 23) и флуопирамом [92, 93, 94].

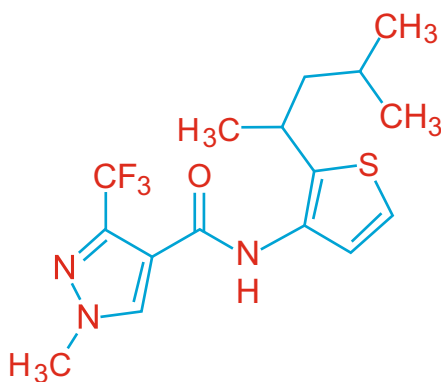
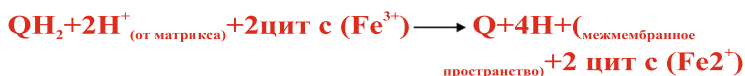


Рис. 23. Фунгицид пентиопирад.

Поступив от коэнзима QH_2 в комплекс III, электроны передаются дальше. Коэнзим QH_2 передает один электрон на серосодержащий белок (Fe-S), расположенный после него.

Потеря коэнзимом QH_2 электрона ведет к образованию радикала семихинона, обозначаемого как $\text{Q}^\cdot$. Семихинон может удерживать при себе протон, образуя форму $\text{QH}^\cdot$. Передавая полученный от коэнзима QH_2 электрон на цитохром C_1 , Fe-S в свою очередь окисляется, а цитохром C_1 при этом восстанавливается. Восстановленный цитохром C_1 передает электрон на цитохром C. Второй электрон с коэнзима QH_2 семихинона передается на цитохром b_L (гем b_L), который пересекая мембрану, в свою очередь передает его через цитохром b_H (гем b_H) на другую молекулу коэнзима Q, связанного с мембраной со стороны матрикса. Коэнзим Q полностью окисляется только после передачи второго электрона на цитохром b. Затем коэнзим Q может диссоциируя, отщепляться от места своего присоединения, примыкающего к межмембранному пространству. Когда отдавая 2 электрона, коэнзим QH_2 окисляется, 2H^+ выводятся в межмембранное пространство.

Существует также альтернативный путь передачи электронов от коэнзима QH₂, когда они передаются на Fe-S, а затем – на цитохром b_L. Это требует совершения коэнзимом Q двух оборотов. При этом сначала коэнзим Q, связанный с внутренней мембраной на стороне, близлежащей к матриксу, получает 2 электрона от ФАДН₂ и восстанавливается до коэнзима QH₂. Затем коэнзим QH₂ передает электроны на гемцитохрома b и выводит 2 H⁺ из матрикса в межмембранное пространство. В осуществлении этого цикла участвуют 2 QH₂, но в последующем окисляется только один из них. В общей сложности реакции, катализируемые комплексом III, включая все передаваемые коэнзимом Q электроны и протоны, можно представить в виде следующей формулы:



Комплекс III – это комплекс b-C₁, иначе называемый ферментом убихинон: цитохром C-оксидоредуктазой, а также QH₂ дегидрогеназой. Этот мультибелковый трансмембранный комплекс кодируется митохондриальным и ядерным геномами и является важнейшим генератором протонного градиента на мембране митохондрий. Он находится на внутренней мембране большинства эу-бактерий, в митохондриях всех растений и животных, аэробных эукариот.

В структуре комплекса III Этот комплекс образует в целом 13 пересекающих мембрану белковых цепей [91], имеет молекулярную массу 500 кДа, существует в виде димера. Каждый мономер содержит 3 гема, связанных с цитохромами b₅₆₂, b₅₆₆, c₁, и негемовое железо, т.е. 2 железосерных Fe-S белка. Есть два центра, в которых могут связываться хиноны. Один из них, Q_{внеш-} это центр, расположенный между железосерным кластером 2Fe-2S и гемом b_L

вблизи внешней стороны мембраны, так что $Q_{\text{внеш}}$ - это центр, обращенный в сторону межмембранного пространства и сюда присоединяется восстановленный убихинон QH_2 . Другой, $Q_{\text{внутр}}$ - центр, связывает окисленный убихинон Q ; он расположен вблизи внутренней стороны мембраны, обращенной к матриксу.

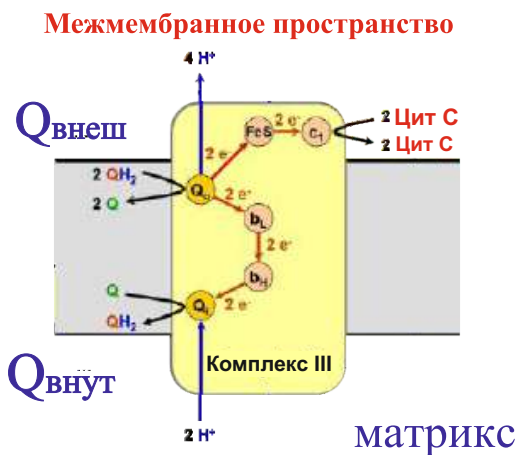


Рис.24. Q-цикл, производимый комплексом III.

Q-цикл постулировали Питером Митчеллом (1976); он состоит из двух фаз (рис. 24). Первая фаза цикла убихинона состоит из следующих этапов:

1. QH_2 связывается в $Q_{\text{внеш}}$ -участке комплекса III и окисляется железосерным центром белка Rieske до семихинона ($Q^\bullet$), при этом убихинон переправляет два протона в межмембранное пространство.

2. Восстановленный железосерный центр белка Rieske передает через цитохром С один электрон на пластоцианин.

3. Убихинон Q связывается в $Q_{\text{внутр}}$ -участке.

4. Семихинон передает электроны к гему b_L цитохрома b , а гем b_L передаёт электрон на b_H , и только после этого гем b_H восстанавливает убихинон Q до семихинона.

Вторая фаза цикла убихинона с комплексом III:

1. Второй QH_2 связывается с $Q_{\text{внеш}}$ - участком комплекса

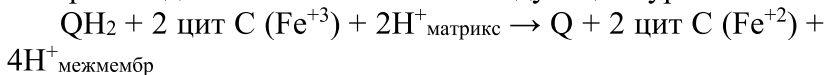
III.

2. Еще один электрон восстанавливает следующий пластоцианин. Еще два протона переправляются в межмембранное пространство.

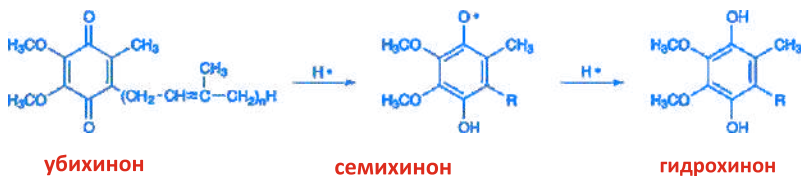
3. От b_L электрон передается на семихинон $\text{Q}^\bullet$, и полностью восстановленный Q^{2-} связывает два протона из матрикса, превращаясь в QH_2 .

4. Окисленный Q и восстановленный QH_2 диффундируют в мембрану [95].

Комплекс III окисляет восстановленный убихинон и восстанавливает цитохром C, E_o' этого процесса равно +0,25 V. Происходит это согласно нижеследующего уравнения:



Транспорт электронов в комплексе сопряжен с переносом протонов из матрикса в межмембранное пространство, в результате чего на внутренней мембране митохондрий возникает градиент концентрации протона. На каждые два электрона, передвигающиеся по ЦПЭ от убихинона до цитохрома C, из матрикса поглощаются два протона (образуется QH_2), и четыре протона высвобождаются в межмембранное пространство. КоэнзимQ может производить окисление-восстановление в направлении убихинон $\leftrightarrow$ семихинон $\leftrightarrow$ гидрохинон:



Некоторые ингибиторы комплекса III используются как фунгициды. К ним относятся производные стробилюрина, например азоксистробин, являющийся ингибитором участка $\text{Q}_{\text{внеш}}$, и противомаларийные препараты наподобие атовакуона (рис. 25) [96].

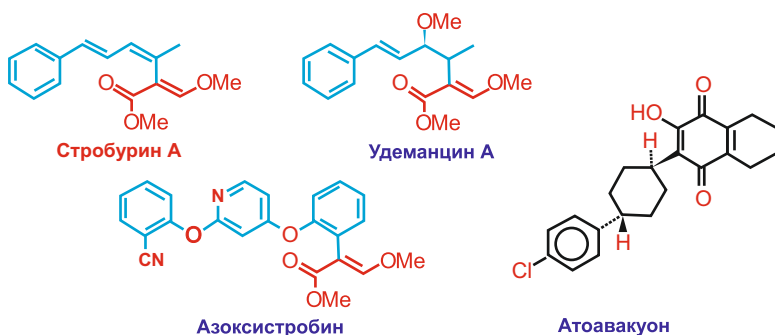


Рис 25. Красным помечены наиболее активные участки пестицидов группы стробилирурина, представленные токсофором азоксистробина и β -меток시아крилатовой группой.

Антимицин А связывается с $Q_{\text{внут}}$ -участком и блокирует транспорт электронов от гема b_H к окисленному убихинону Q, так что он является ингибитором $Q_{\text{внут}}$ -участка. Миксотиазол и стигмателлин связываются с $Q_{\text{внеш}}$ -участком и блокируют перенос электрона с восстановленного убихинона QH_2 на железосерный кластер белка Rieske. Оба ингибитора связываются с $Q_{\text{внеш}}$ -участком, но в разных местах. Поскольку миксотиазол связывается в участке, прилежащем к гему b_L , он называется проксимальным ингибитором. Стигмателлин связывается в участке, расположенном вдали от гема b_L , поближе к белку Rieske, с которым он вступает во взаимодействие.

Цитохром С, следующий компонент ЦПЭ, является периферическим водорастворимым мембранным белком с молекулярной массой 12,5 кДа. Он содержит 1 полипептидную цепь из 100 аминокислот, гем и 2 железо-серных Fe-S белка; является подвижным компонентом ЦПЭ; может встречаться также в перимитохондриальном пространстве. Высвобождение этого компонента в цитоплазму может индуцировать апоптоз.

Табл. 6. Субъединицы и изоформы цитохром-оксидазы, их функции

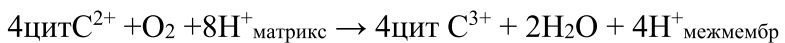
<i>Субъединица цитохром-оксидазы</i>	<i>Изоформа</i>	<i>Функции</i>
<i>I</i>		<i>Связывает гем а, гем аз, центр $Cu(b)$, имеет протонные каналы</i>
<i>II</i>		<i>Связывает центр $Cu(a)$, взаимодействует с цитохромом С</i>
<i>III</i>		<i>Стабилизирует транспорт протонов</i>
<i>IV</i>	<i>N1</i>	<i>Обеспечивает аллостерическое ингибирование АТФ</i>
	<i>N2</i>	<i>Синтезируется в основном в легких, мозге, плаценте. Индуцируется гипоксией. Возможно O_2-зависимое ингибирование АТФ</i>
<i>Va</i>		<i>Связывая диiod-тиронин, снимает ингибирование АТФ</i>
<i>Vb</i>		<i>Связывает Zn (II)</i>
<i>VIa</i>	<i>VIa-L</i>	<i>Печеночная изоформа, синтезируется везде кроме миокарда и скелетных мышц. В присутствии пальмитата снижает стехиометрию H^+/e^- с 1 до 0.5.</i>
	<i>VIa-H</i>	<i>Сердечная изоформа. Синтезируется в миокарде и скелетных</i>

<i>Vib</i>		<i>мышцах. При высоком соотношении АТФ/АДФ снижает стехиометрию H^+/e^- с 1 до 0.5.</i>
	<i>Vib-1</i>	<i>Синтезируется во всех тканях. Обеспечивает димеризацию комплекса</i>
<i>Vib</i>	<i>Vib-2</i>	<i>Предположительно увеличивает интенсивность дыхания</i>
		<i>Синтезируется во всех тканях.</i>
<i>VIIa</i>	<i>VIIa-L</i>	<i>Синтезируется во всех тканях, кроме миокарда и скелетных мышц.</i>
	<i>VIIa-H</i>	<i>Синтезируется в миокарде и скелетных мышцах.</i>
	<i>VIIa-R</i>	
<i>VIIb</i>	<i>SIG 81</i>	
	<i>VIIb-1</i>	<i>Синтезируется во всех тканях</i>
<i>VIIb</i>	<i>VIIb-2</i>	<i>Предположительно увеличивает интенсивность дыхания</i>
		<i>Синтезируется во всех тканях</i>
<i>VIII</i>	<i>VIII-L</i>	<i>Синтезируется во всех тканях</i>
	<i>VIII-H</i>	<i>Синтезируется в скелетных мышцах и буром жире</i>
	<i>VIII-3</i>	

Восстановленный цитохром С движется в водной фазе вдоль мембраны: он переносит один электрон к следующему дыхательному комплексу IV – цитохромоксидазе.

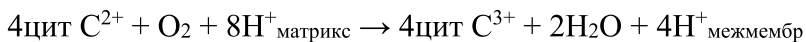
Комплекс IV – это цитохром-оксидазный комплекс, имеющий молекулярную массу 300 кДа. Этот комплекс состоит из 8 полипептидных цепей (табл. 6), существует в виде димера. Каждый мономер содержит 2 цитохрома (а и аз) и 2 атома меди. Цитохром С: кислород-оксидоредуктаза – это терминальная оксидаза ЦПЭ, которая катализирует перенос электронов с цитохрома С на кислород с образованием воды [96]. Цитохромоксидаза присутствует во внутренней мембране митохондрий всех эукариот, а также в клеточной мембране многих аэробных бактерий [97].

Поступающий из крови в митохондрии кислород связывается с атомом железа в геме цитохрома аз (в виде O_2). Каждый атом кислорода присоединяет по два электрона от комплекса IV и два протона из матрикса и превращается в молекулу воды. Катализируемая комплексом реакция описывается уравнением:



Этот комплекс поочередно окисляет четыре молекулы цитохрома С; приняв от них четыре электрона, комплекс IV восстанавливает O_2 до H_2O .

Комплекса IV и два протона из матрикса и превращается в молекулу воды. Катализируемая комплексом реакция описывается уравнением:



Этот комплекс поочередно окисляет четыре молекулы цитохрома С; приняв от них четыре электрона, комплекс IV восстанавливает O_2 до H_2O . При восстановлении кислорода 4 протона H^+ захватываются из матрикса для образования

двух молекул H_2O , но еще четыре протона активно перекачиваются в межмембранное пространство [98, 99]. Механизм передачи восстановительных эквивалентов заключается в следующем. Цитохром С связывается на субъединице II при посредничестве субъединиц I, III и VI b и восстанавливает Cu_A -центр, расположенный вблизи от поверхности мембраны. Затем электроны переходят от Cu_A -центра на гем *a* и далее на двухъядерный центр аз-Сув; здесь и происходит связывание O_2 с восстановлением до H_2O [98]. Кислород обладает высоким сродством к электронам, поэтому при восстановлении до воды он высвобождает большое количество свободной энергии.

Цикл цитохромоксидазы состоит из шести стадий, отличающихся друг от друга по состоянию двухъядерного центра [100]:

1. **A** (*Adduct*) [101],
2. **P** (*Peroxy intermediate*),
3. **F** (*Ferryl-oxo intermediate*) [101],
4. **O_H** (*Fully-Oxidized High-Energy state*),
5. **E** (*One-electron reduced state*)
6. **R** (*Reduced state*)

На сегодня известно, что на стадии **P** кислород находится в оксоферрильном состоянии, где связь между атомами кислорода уже разорвана, так что уже неправомерно говорить о перокси-производном, как это было принято 30 лет назад [101]. Согласно современным представлениям, восстановление кислорода в комплексе IV происходит путем попарного переноса электронов, так что активные формы кислорода здесь не образуются [99, 100, 101]. На рисунке 26 представлена схема современных представлений о последовательности стадий при восстановлении кислорода

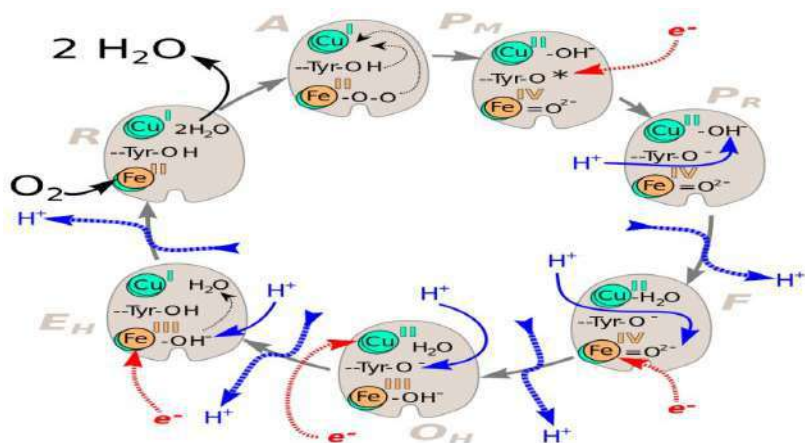


Рис.26. Восстановление кислорода комплексом aa₃.

комплексом IV. Как видно из рисунка 26, на стадии **A** полностью восстановленный двухъядерный центр связывает кислород: образуется кислородный аддукт. Черные-пунктирные стрелки указывают на конформационные перестройки в ядре. На стадии **P_M** на кислород переносятся четыре электрона: два электрона берутся от железа гема аз, при этом железо окисляется от Fe^{II} до Fe^{IV}, один электрон – от C_{ув} с переходом Cu^I в Cu^{II}, и последний электрон берется от остатка тирозина 244, Тирозин отдает на кислород также протон для разрыва двойной связи O₂. Образовавшийся нейтральный тирозиновый радикал восстанавливается до аниона (за счет электрона цитохрома C). На стадии **P_R** Cu(II)-OH⁻ принимает протон и образует молекулу воды. На стадии **F** эта молекула воды связывается с C_{ув}. Кислород, связанный с железом в форме Fe(IV)=O²⁻ принимает протон, железо при этом восстанавливается до Fe^{III}, из комплекса IV высвобождается первая молекула воды. На стадии **O_H**, принимая электрон от цитохрома C, C_{ув} восстанавливается до Cu^I, а анион тирозина протонируется. На стадии **E_H** железо комплекса переходит в

восстановленное состояние Fe^{II} , после чего связанная с ним OH^- группа принимая протон, превращается в молекулу воды и тоже высвобождается в среду. На стадии **R** двухъядерный центр полностью переходит в восстановленную форму, и комплекс готовится связать следующую молекулу кислорода. Перенос протонов в межмембранное пространство комплексом IV представлен на рис.27.

1. Получив от цитохрома С электрон, цитохром-оксидаза эукариот перевыталкивает в межмембранное пространство один протон. 2. Для образования воды комплекс IV перетаскивает через мембрану один взятый от субстрата протон через канал К. 3. Еще один протон протаскивается через канал D. В ходе одного цикла комплекс IV последовательно проходит через стадии P_M , F, O_H и E_H [102, 103].

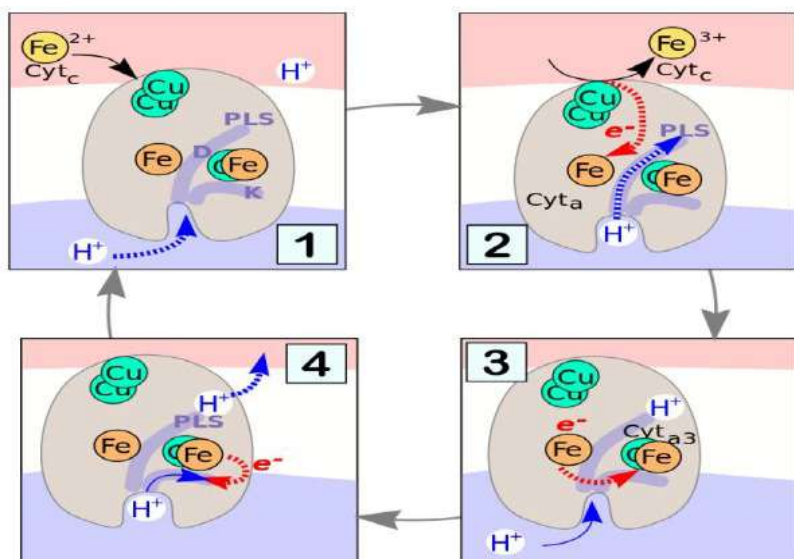


Рис.27. Комплекс IV переносит протоны в межмембранное пространство.

Механизм передачи протонов представляется следующим образом [100]:

1. Сначала протонные каналы комплекса закрыты. Цитохром С передает один электрон на Cu_A -центр.

2. Электрон передается с Cu_A -центра на гем цитохрома a , в итоге меняется окислительно-восстановительный потенциал цитохромного центра и, как следствие этого молекулы воды в канале D располагаются таким образом, что канал открывается для перемещения протонов PLS-участок комплекса IV (*участок погружения протона proton loading site*).

3. В двухъядерном центре электрон переходит от гема-цитохрома a к гему цитохрома a_3 , в результате чего через канал К входит один протон от субстрата. При входе протона в PLS кислотность центра повышается от $\text{pK}=11$ до $\text{pK}=5$.

4. На последней стадии цикла протон из PLS высвобождается наружу. Происходит это, по всей видимости, из-за электростатического отталкивания от субстратного протона, участвующего в восстановлении кислорода в двухъядерном центре.

Такие ингибиторы цитохромоксидазы как цианиды, сульфиды, азиды, монооксид углерода и монооксид азота [104] могут связываться с окисленным или восстановленным двухъядерным центром комплекса IV. Они конкурируют с кислородом за место связывания в ферменте. Комплекс может ингибироваться также метанолом, который превращается в организме в муравьиную кислоту, являющуюся ингибитором цитохромоксидазы [105].

Комплекс V собран из называемого АТФ-синтазой F_1 -белка и белка F_0 , пропускающего через себя внутрь матрикса протоны, который содержит также чувствительный к олигомицину конформационный белок. Когда этот комплекс находится в свободном, отделенном от мембраны состоянии, он служит как гидролизующая АТФ АТФ-аза, которая активируется, пропуская через себя протоны. Но когда

комплекс V ассоциирован с мембраной, т.е. с чувствительным к олигомицину конформационным белком, он функционирует уже как АТФ-синтетаза или АТФ-синтаза. Ингибиторы могут полностью блокировать транспорт электронов, необратимо соединяясь с определенными участками ЦПЭ. Выше уже было сказано, что цианиды связываются с цитохром-оксидазой, препятствуя соединению протонов с кислородом. От воздействия цианидов транспорт электронов снижается до нуля. Однако ротенон соединяется с ЦПЭ обратимо, так что после его воздействия поток электронов тормозится, но не прекращается, при этом снижается градиент протонов на внутренней мембране митохондрий.

I.8.2. Подсчет высвобождаемой в ЦПЭ энергии

При движении электрона по дыхательной цепи электрон поэтапно теряет заключенную в нем энергию (рис. 28).

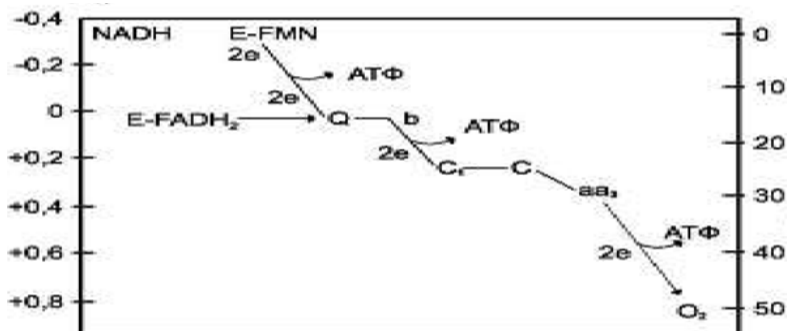


Рис. 28. Снижение энергии электрона при движении по ЦПЭ.

На рис. 29 представлено количество выделяемой электроном энергии в связи АТФ. Когда НАДН₂ взаимодействует с комплексом I, он окисляется до НАД⁺ за счет того что ФМН комплекса I восстанавливается до ФМН-Н₂.

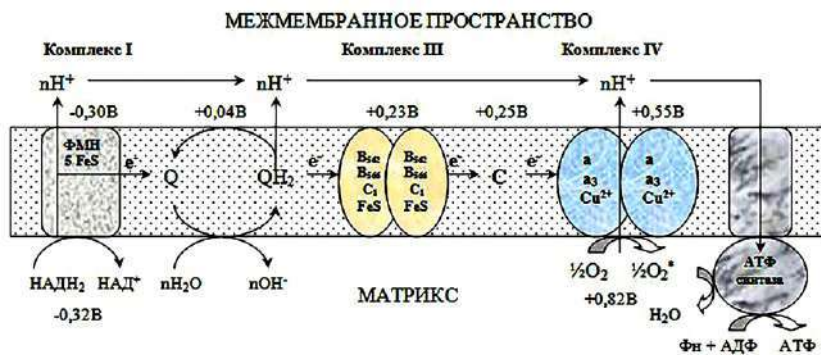


Рис. 29. Высвобождение энергии из электрона при его движении по ЦПЭ выражено в Вольтах (В).

Из-за наличия окислительно-восстановительного потенциала между окислителем и восстановителем, при этом освобождается 2.2 ккал/моль энергии. Эта энергия затем используется для образования АТФ в реакции окислительного фосфорилирования. В комплексе же II коферментом является ФАД, и этот кофермент восстанавливается до ФАД-Н₂. Поскольку восстановительный потенциал в этой реакции восстановления у обеих составляющих приблизительно одинаков, то и высвобождаемая энергия практически равна нулю.

На следующем этапе коэнзим Q, играющий роль челнока между комплексами I и III, а также II и III комплексами (рис. 30), восстанавливается до коэнзима QH₂. У людей в этой цепи присутствует обычно 10 изопреноидных остатков [4].

Энергия, выделяемая во время этой реакции восстановления, ничтожно мала для того чтобы можно было синтезировать какую бы то ни было макроэргическую связь. В отличие от НАД⁺, убухинон (КоQ) не связан с белком, он просто растворен в липидном слое внутренней мембраны. Коэнзим Q может принимать электроны и протоны не только от ФМН, но и от ФАД. КоQ является производным бензохинона с боковой изопреноидной цепью.

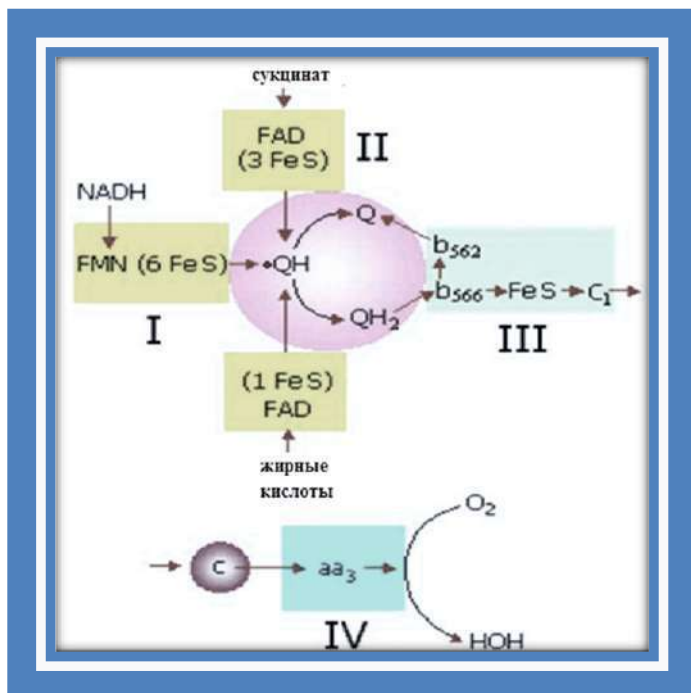


Рис.30. Передача электронов между комплексами I и III, II и III и III - IV комплексами.

Наибольший интерес представляет этап, на котором электроны движутся от восстановленного QH₂ до комплекса III. От коэнзима QH₂ на цитохром b комплекса III передаются только электроны, а протоны при этом выталкиваются в межмембранное пространство. Как только электрон достигает цитохрома b, атом железа Fe³⁺ тотчас восстанавливается до Fe²⁺. В этой восстановительной реакции также высвобождается определенное количество энергии, однако высвобождаемой энергии недостаточно для продукции АТФ.

После восстановления железа в цитохроме b, атомом железа Fe²⁺ реагирует с атомом железа Fe³⁺ цитохрома c₁. В этой реакции железо Fe³⁺ цитохрома c₁ восстанавливается до

Fe^{2+} , а атом железа в цитохроме *b* вновь окисляется до Fe^{3+} . Высвобождаемая в этой реакции окисления-восстановления энергия достаточно велика – 9.9 ккал/моль. Эта энергия используется впоследствии на добавление остатка неорганического фосфата к молекуле АДФ с образованием АТФ.

Далее атом железа цитохрома *C*, Fe^{2+} реагирует с атомом железа цитохрома *C* Fe^{3+} . Fe^{2+} передает свой электрон на Fe^{3+} , образуя восстановленную форму цитохрома *C*. Высвобождаемая в этой реакции свободная энергия не может погасить потребностей в синтезе макроэргической связи АТФ, так что этот этап не составляет необходимой для образования АТФ энергии.

Затем электроны движутся от Fe^{3+} цитохрома *C* к Fe^{3+} цитохрома *a* и аз. Fe^{3+} реагирует с атомом железа цитохрома *C* Fe^{2+} . При передаче электронов с цитохрома *a* на цитохром аз высвобождается 23.8 ккал/моль энергии, и эта энергия используется на присоединение неорганического фосфата к молекуле АДФ. На конечном этапе ЦПЭ электроны от Fe^{2+} цитохрома аз передаются на O_2 . Присоединив электроны, кислород переходит в возбужденное состояние, и в этой активной форме присоединяет 2 протона из матрикса [13]. Образование воды при присоединении водорода к кислороду возможно в том случае, если на молекулу кислорода одновременно, или почти одновременно передаются все 4 электрона. Когда же по какой-либо причине происходит двухэлектронное восстановление молекулы кислорода, тогда приняв два электрона, кислород присоединяет к ним два протона и образуется H_2O_2 . Когда же к молекуле кислорода поступает всего один электрон, образуется супероксидный радикал O_2^- . Оба эти продукта неполного восстановления кислорода повреждают мембранные структуры, поскольку вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот в них. Сначала митохондриальная супероксид

дисмутаза (СОД), содержащая ионы Mg^{2+} детоксицирует супероксидный анион в реакции:



Затем образованная в дисмутазной реакции перекись водорода детоксицируется каталазой в реакции:



Важным моментом в ЦПЭ является также то, что одномоментно между окислительно-восстановительными парами ЦПЭ может двигаться только один электрон, однако их движение столь скоростное, что разницей во времени можно пренебречь и считать, что по ЦПЭ в отдельно взятый промежуток времени движется не один, а 2 электрона. Поэтому и выработку АТФ в ЦПЭ рассчитывают на пару электронов, движущихся по ЦПЭ.

Наличие в ЦПЭ 3-х участков, способных генерировать энергию достаточную для синтеза АТФ, было установлено при помощи лекарств, таких как ротенон, антимицин и цианиды. Использование этих препаратов помогло установить факт присоединения ротенона к комплексу I, антимицина – к комплексу III, и цианидов - к цитохромоксидазному комплексу. Суммируя вышесказанное скажем, что энергия для образования АТФ генерируется на участках между НАД-Н₂ и ФМН комплекса I, цитохромами b и c₁ комплекса III, и цитохромами a и аз комплекса IV.

1.8.3. Механизм образования АТФ в митохондриях

Три наиболее признанные теории помогают понять механизм образования АТФ в митохондриях. Наиболее общепринятой из них является хемиосмотическая теория Митчела, который получил за предоставление ее науке в 1978 году Нобелевскую Премию. Согласно представленной им модели, протоны выталкиваются сквозь внутреннюю мембрану митохондрий в межмембранное пространство. До того времени считалось, что протоны не могут проникать сквозь внутреннюю мембрану митохондрий, тогда как ОН-ионы могут высвобождаться на внешней стороне внутренней мембраны [106]. Предполагалось, что в этой реакции водорода, в отличие от ОН-ионов движутся в направлении к внутренней поверхности внутренней мембраны. Было также установлено, что АТФ-синтаза, известная также как АТФ-аза, имеет 2 близко соседствующих сайта для неорганического фосфата и АДФ [107].

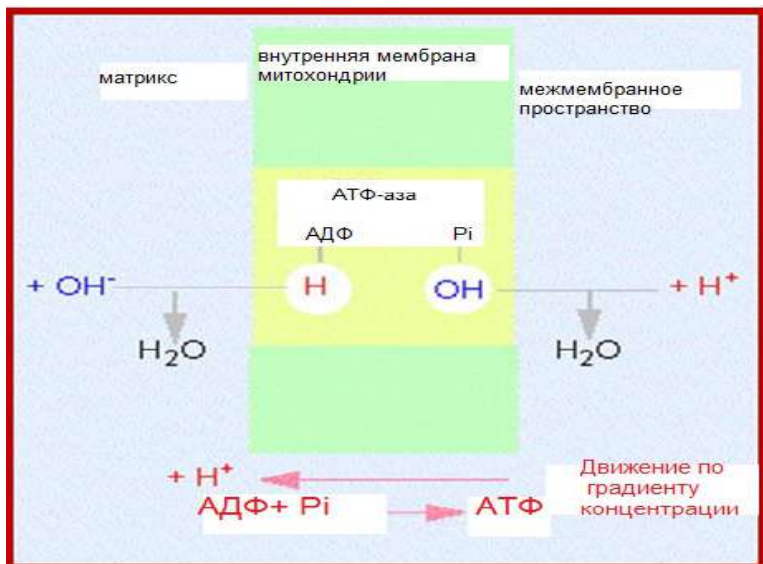


Рис. 31. Движение ионов при генерации АТФ по Митчелу.

Соединение кислорода с протоном ведет к образованию НОН, причем *ОН освобождается на внешней стороне внутренней мембраны (в межмембранном пространстве), а Н – на внутренней (в матриксе).*

В 1961 году П. Митчелл постулировал, что не только ОН-ионы, но также и *протоны* могут проникать сквозь внутреннюю мембрану митохондрий. Это направленное движение протонов приводит к образованию градиента рН. Возвращение же протонов, естественно возникающее после образования градиента рН, происходит посредством специфического протонного канала, находящегося в АТФ-азе. Этот процесс сопровождается синтезом АТФ, в котором потенциальная энергия протонного градиента используется для образования третьей фосфатной связи в АТФ. Относительно механизма образования АТФ в митохондриях существует несколько теорий. Приведем лишь некоторые, основные из них.

1. Хемиосмотическая теория Митчела.

Для объяснения механизма окислительного фосфорилирования в 1961 году Митчеллом была предложена хемиосмотическая теория. Эта теория включала в себя четыре независимых постулата, касающихся функции митохондрий:

1. Для всех ионов внутренняя мембрана митохондрий является непроницаемой.

2. Внутренняя мембрана митохондрий содержит ряд белков-переносчиков, осуществляющих транспорт необходимых метаболитов и неорганических ионов.

3. При прохождении электронов по дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий происходит перемещение протона H^+ из матрикса в межмембранное пространство.

4. При достаточно большом протонном градиенте концентрации, протоны начинают проходить обратно через АТФ-синтазу из межмембранного пространства в матрикс, что сопровождается синтезом АТФ. На сегодня уже

известно, что окисление 1 НАДН₂ в интактной митохондрии может дать 3 АТФ, а 1 ФАДН₂ – 2 АТФ. Каждая макроэргическая связь АТФ содержит 7.3 ккал/моль энергии (более 30,6 кДж/моль), так что в ЦПЭ в составе АТФ кумулируется около 22 ккал/моль энергии, остальные же 59.4% энергии высвобождаются в виде тепла [108]. В этом есть глубокий физиологический смысл, поскольку теплокровные организмы без подогрева митохондрий не смогли бы поддерживать свою температуру тела, и малейшее снижение температуры окружающей среды вело бы к гибели организма.

Согласно хемиосмотической теории Митчела по ЦПЭ вдоль внутренней мембраны митохондрий движутся только электроны, и начинается это движение от НАДН₂ или ФАДН₂. Протоны (Н⁺) оказываются скопленными на внешней поверхности внутренней мембраны, в периплазмическом пространстве. Это ведет к накоплению позитивного заряда на внешней стороне внутренней мембраны и негативного заряда – на внутренней ее поверхности. Эта разница зарядов нейтрализуется во время синтеза АТФ, когда протоны проходят сквозь протонный канал АТФ-азы и генерируют АТФ за счет соединения неорганического фосфата с АДФ. Соединение кислорода с протоном ведет к образованию НОН, причем ион ОН⁻освобождается на внешней стороне внутренней мембраны, а Н - на внутренней (рис. 31) [109].

Оспаривавшие хемиосмотическую теорию ученые разработали микроэлектроды для измерения малейших изменений в рН в самые кратчайшие промежутки времени. При помощи столь новейших технических приспособлений они измеряли время, необходимое для возникновения движущей силы, способствующей движению протонов сквозь мембрану митохондрий, а также время, требуемое для синтеза АТФ. Эти исследования продемонстрировали что время, требуемое для возникновения движущей силы протонов и синтеза АТФ, равно нескольким миллисекундам.

Однако в действительности синтез АТФ происходит в течение нескольких наносекунд, почти мгновенно после транспорта электронов. Это время лаг-фазы между образованием движущей силы, достаточной для прохождения протонов сквозь мембрану и временем реального синтеза АТФ и является фактическим временем образования АТФ. Данное открытие сильно расшатывало устои хемиосмотической теории. В аналогичных экспериментах было также доказано, что блокирование транспорта протонов не препятствует синтезу АТФ во внутренней мембране митохондрий [110]. Более того, в клетках растений присутствует гормон ауксин, который ведет к секреции ионов водорода на внешнюю поверхность внутренней мембраны, так что рН здесь падает с 6.8 до 4.0. И хотя и Р_i и АДФ у них присутствуют, однако синтеза АТФ во время воздействия ауксина не происходит [111]. Это однозначно указывает на присутствие какого-то дополнительного фактора помимо протонного градиента, ведущего к синтезу АТФ. Такого рода возражения против хемиосмотической теории довольно серьезны, и теория Митчела не имеет ответа на них. Кстати, ауксины (от др.-греч. αὔξω – *увеличиваться, расти*) – это группа растительных гормонов, производных индола. На рис. 32 приводятся структуры некоторых ауксинов.

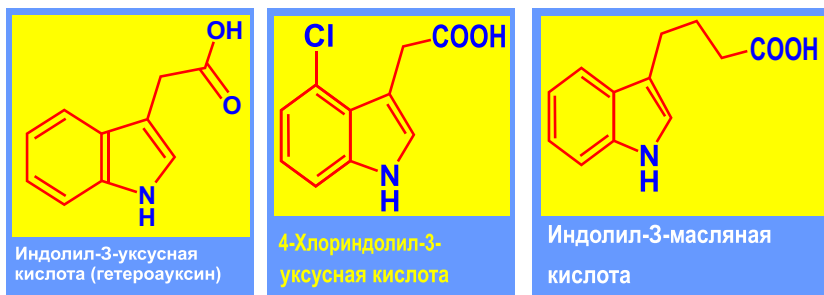


Рис. 32. Природные ауксины растений.

С химической точки зрения это 3-(3-индолил) пропионовая, индолил-3-масляная, 4-хлориндолил-3-уксусная и

3-индолилуксусная кислоты. Наиболее распространенным и широко применяющимся в растениеводстве ауксином является гетероауксин, индолил-3-уксусная кислота. Ауксины – это физиологически активные вещества, стимулирующие рост плодов и побегов растений. Они ускоряют пролиферацию и дифференцировку клеток. Уменьшение ауксина в растении приводит к увяданию его листьев. Видимо ауксины каким-то образом помогают кумуляции энергии в клетке.

2. Теория высокоэнергетических промежуточных веществ.

Авторы этой теории Слатер и Бритн считают, что высвобождаемая на определенных участках ЦПЭ энергия фиксируется в виде макроэнергетических связей неизвестного компонента, названного X [112]. Затем эта макроэнергетическая связь переносится на неорганический фосфат, который зарядившись, впоследствии приводит к образованию АТФ из АДФ. Эта концепция была выдвинута в связи с тем, что формирование макроэнергетической связи может ингибироваться добавлением в среду такого разобщителя тканевого дыхания как динитрофенол, и тогда вся высвобождаемая при транспорте электронов рассеивается в виде тепла. Интересен тот факт, что сам процесс движения электронов при этом не ингибируется, тогда как синтез АТФ полностью подавляется. Это указывает на присутствие в цепи некоего промежуточного вещества, которое действует как ловушка энергии для дальнейшей передачи ее в процессе синтеза АТФ. Однако поскольку само вещество не найдено, присутствие в ЦПЭ вещества такого рода все еще считается недоказанным. По этой причине эта теория многими учеными мира не воспринимается как достойная внимания.

3. Теория конформационно-химического соответствия.

Фактически эта теория была представлена Дэвидом Грином и др. Но позже Бойер развил эту теорию новыми гипотезами, что позволило по-новому взглянуть на нее [113].

В покоящейся митохондрии внутренняя мембрана находится в расслабленном состоянии, и сама митохондрия заполнена АТФ (митохондрию можно представить как резервуар АТФ). В этом состоянии кристы максимально сокращены, и комплекс АТФ-синтазы с его головкой и стержнем претерпевает серьезные морфологические изменения. Анализ белковых компонентов внутренней мембраны митохондрий позволил установить, что в ней имеются некие сократительные белки типа актина. Более того, было установлено, что они играют роль полупроводников при проведении энергии электронов. Согласно этой теории, при движении электронов вдоль ЦПЭ, заключенная в них энергия снижается с высшего порядка на низший, что реализуется благодаря наличию разницы в восстановительных потенциалах окислителей и восстановителей различных комплексов ЦПЭ, причем на разных участках ЦПЭ освобождается неодинаковое количество энергии. Эта освобождаемая энергия передается на сократительные белки, ассоциированные с синтезом АТФ. Благодаря энергетическим изменениям, происходящим в этих белках, связанная с ними АТФ-аза тоже подвергается конформационным изменениям. Поскольку неорганический фосфат P_i и АДФ постоянно присутствуют в специфических участках на поверхности АТФ-синтазы, эти конформационные изменения АТФ-азы ведут к сближению P_i и АДФ, после чего энергия сократительных белков используется для формирования макроэргической связи АТФ. После того как энергия уже использовалась на синтез АТФ, сократительные белки и АТФ-аза расслабляются и возвращаются в свое исходное конформационное состояние, что ведет к высвобождению

АТФ с поверхности АТФ-азы. И этот процесс повторяется каждый раз при синтезе АТФ. Процесс протекает очень быстро. По-видимому, эта теория объясняет, причем очень просто, все имеющиеся в наличии факты относительно синтеза АТФ.

1.8.4. Современные представления о механизме окислительного фосфорилирования

В настоящее время открыты все главные компоненты окислительного фосфорилирования, изучено также их строение, свойства. Учеными открыты основные принципы окислительного фосфорилирования, регуляция и особенности некоторых его стадий. Механизм окислительного фосфорилирования сегодня объясняется исходя из следующих основных постулатов:

➤ 2 электрона e^- , проходят от НАДН₂ на КоQ через комплекс I (ФМН→Fe-S белок). Высвобождаемая энергия обеспечивает перекачку H^+ в межмембранное пространство, механизм переноса H^+ неизвестен.

➤ Приняв два электрона от комплекса I, КоQ забирает $2H^+$ из матрикса (у воды), превращаясь при этом в КоQ-Н₂. Восстановление КоQ может проходить также с участием комплекса II.

➤ КоQ-Н₂ переносит $2e^-$ на комплекс III, но $2H^+$ при этом выкачиваются в межмембранное пространство.

➤ Цитохром C переносит электрон e^- с комплекса III на комплекс IV.

➤ комплекс IV передает электрон e^- на O₂. Высвобождаемая при этом энергия обеспечивает перекачку H^+ в межмембранное пространство, механизм переноса H^+ неизвестен.

При переносе протона H^+ из матрикса в межмембранное пространство, на внутренней мембране митохондрий создается осмотический градиент протонов ΔpH . $\Delta pH = 60$ мВ, это означает, что pH в матриксе выше, чем в цитозоле. Так

как каждый протон H^+ несет положительный заряд, на внутренней мембране митохондрий также появляется разность потенциалов ΔV . Разность потенциалов на внутренней мембране $\Delta V = 160 \text{ мВ}$, т.е. внутренняя сторона мембраны заряжается отрицательно, внешняя – положительно [114]. В сумме осмотический градиент протонов и разность потенциалов образуют электрохимический потенциал. Электрохимический потенциал внутренней мембраны митохондрий типичной клетки равняется приблизительно $60 + 160 = 220 \text{ мВ}$. Механизм переноса H^+ через мембрану еще до конца не изучен. Можно предположить, что у разных компонентов дыхательной цепи существуют разные механизмы сопряжения транспорта электронов с перемещением H^+ . Образовавшийся на внутренней мембране митохондрий электрохимический потенциал используется для следующих целей:

- ✓ образования макроэргов методом фосфорилирования АДФ в АТФ;
- ✓ транспорта веществ через мембрану митохондрий внутрь и наружу;
- ✓ теплопродукции. Эта функция особенно развита у теплокровных новорожденных.

1.8.4.1. Сопряжение окисления и фосфорилирования. Основные домены АТФ-азы

Процесс движения электронов по дыхательной цепи получил название «*окислительное фосфорилирование*» потому, что он состоит из процессов *окисления* и *фосфорилирования*, тесно сопряженных между собой. Раньше считалось, что движущая сила протонов весьма важна для синтеза АТФ. Одновременно считалось, что присоединение протона к АТФ-синтазе играет решающую роль в синтезе АТФ и регулирует скорость образования макроэргов в

митохондрии, и что АТФ-синтаза, называемая также V комплексом окислительного фосфорилирования, ответственна за градиент протонов (H^+), возникающий поперек внутренней мембраны митохондрий [115]. Согласно же теории Петера Митчела, движущая сила протона и есть та самая сила, которая ведет к синтезу АТФ при движении электронов поперек мембраны. АТФ-синтетаза же обеспечивает обратимое взаимопревращение энергии электрохимического потенциала и энергии химических связей. Так, процесс окисления субстратов создает на мембране митохондрий электрохимический потенциал, а процесс фосфорилирования его использует («гасит»). Таким образом, электрохимический потенциал обеспечивает *сопряжение*, иначе говоря, связывание процессов окисления и фосфорилирования. Так как необходимый для сопряжения электрохимический потенциал создают I, III и IV комплексы цепи переноса электронов, их называют *пунктами сопряжения* окисления и фосфорилирования.

Сегодня уже известно, что электрохимический потенциал внутренней мембраны заставляет протоны H^+ двигаться из межмембранного пространства по каналу АТФ-синтазы в матрикс митохондрий. При каждом переносе протонов через канал F_0 энергия электрохимического потенциала расходуется на поворот стержня АТФ-азы. В результате этого поворота конформация α - и β -субъединиц циклически изменяется и каждый из 3-х активных центров, образованных парами α - и β -субъединиц, катализирует очередную фазу цикла. Цикл состоит из следующих основных фаз: 1) связывание АДФ и неорганического фосфата; 2) образование третьей фосфоангидридной связи в составе АТФ; 3) освобождение конечного продукта, АТФ, из фермента [116]. Выше уже было сказано, что цепь переноса электронов состоит из 4 белковых комплексов, обеспечивающих процесс окисления, и одной АТФ-азы, ответственной за фосфорилирование АДФ в АТФ. АТФ-синтетаза, или H^+ -

АТФ-аза потребляет 40-45% свободной энергии, выделившейся при окислении. H^+ -АТФ-аза – это интегральный белок внутренней мембраны митохондрий, который состоит из 2 белковых комплексов F_0 и F_1 (рис. 33).

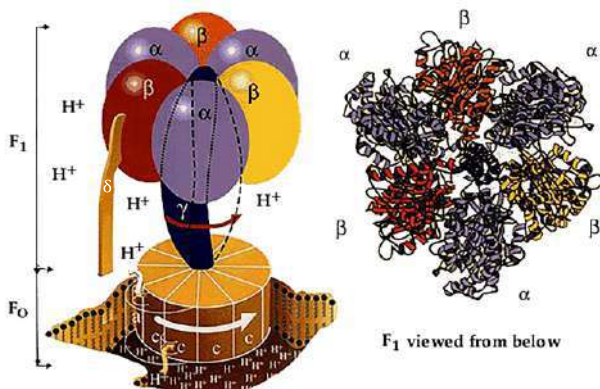
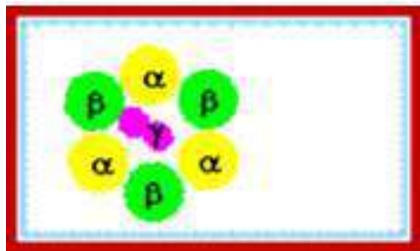


Рис. 33. F_1 - и F_0 -субъединицы АТФ-азы.

Гидрофобный комплекс F_0 погружен в толщу мембраны и служит основанием, которое фиксирует АТФ-синтазу во внутренней мембране. Комплекс F_0 состоит из нескольких субъединиц, образующих канал, по которому протоны переносятся из межмембранного пространства в матрикс. Комплекс F_1 грибовидно выступает в полость митохондриального матрикса. Комплекс F_1 состоит из 9 субъединиц : 3α , 3β , а также γ , δ , ϵ . Субъединицы α и β уложены попарно, образуя «головку» АТФ-азы. Между α - и β -субъединицами располагаются 3 активных каталитических центра, в которых циклично происходит синтез АТФ. Субъединицы γ , δ , ϵ связывают комплекс F_1 , с F_0 .

В природе существует 4 типа АТФ-синтаз, из них обнаруживаемая в митохондриях АТФ-синтаза содержит помпу F_0 , пропускающую протоны только в одном направлении – из межмембранного пространства в матрикс. Полный набор белков помпы АТФ-азы содержит не менее 12 различных полипептидных цепей, некоторые из которых представлены в виде нескольких копий. АТФ-синтаза в

общей сложности состоит из более 20 белковых субъединиц. F_1 домен содержит 9 субъединиц пяти различных видов. Чередуюсь друг с другом, 3 α - и 3 β -субъединицы образуют центральный вал домена F_1 :



Грибовидная часть домена F_1 имеет сплюснутую форму размером 8 нм на 10 нм. Каждая α - β пара содержит в расщелине между этими субъединицами один каталитический

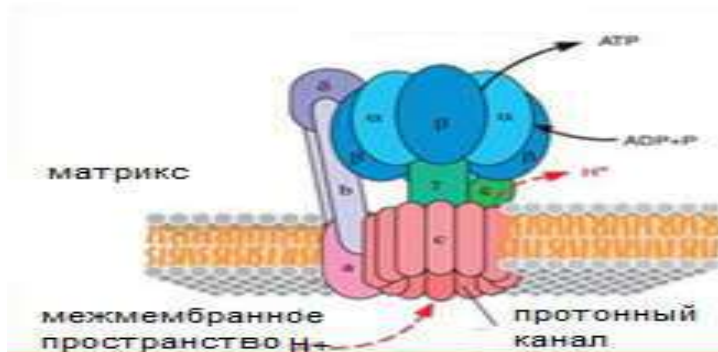


Рис. 34. Пространственное расположение АТФ-азы в митохондрии. Сферическая часть F_1 -АТФ-азы связана через ножку с внутренней мембраной митохондрии

центр и один погруженный внутрь некаталитический нуклеотид (АТФ- или АДФ-) – связывающий центр, и только одна из этих пар ассоциирована с δ -субъединицей, которая является частью «второго стержня» (рис. 34). [117]. δ и ϵ субъединицы связывают γ -субъединицу и помогают

соединению F₁ домена с F₀. Центральный стержень вращается со скоростью 50-100 оборотов в секунду.

Аминокислотная последовательность β -субъединиц идентична, однако они имеют конформационные различия, в основном потому что только одна из них ассоциирована с γ субъединицей. АТФ-АДФ связывающий участок каждой из трех β -субъединиц различен и обозначается как β -АДФ, β -АТФ, пустая β -субъединица. Эта разница чрезвычайно важна для механизма действия этих белков. В связи с тем, что обороты АТФ-азы зависят от γ субъединицы, на каждые 3 протона, пропускаемые сквозь АТФ-синтазу, субъединица поворачивается, и комплекс делает один оборот, в итоге образуется 1 АТФ. β -субъединицы контактируют таким образом, что когда одна субъединица высвобождает АТФ и превращается в пустую β -субъединицу, соседняя к ней β -субъединица принимает β -АДФ конформацию, другая же соседствующая с ней β -субъединица должна принять форму β -АТФ конформацию (рис. 35). Таким образом, после каждого полного оборота в интактной митохондрии синтезируются и высвобождаются 3 АТФ.

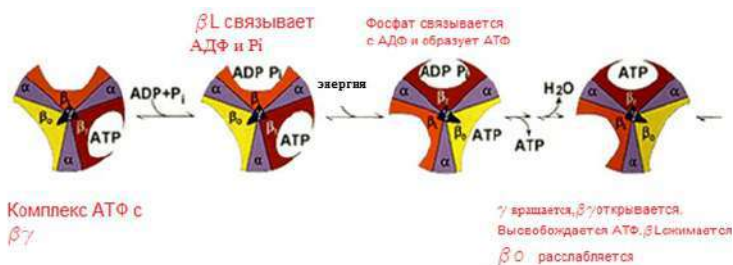


Рис.35. Четыре сменяющие друг друга во время синтеза АТФ конформационные состояния АТФ-азы.

Как было отмечено выше, существует 4 типа АТФ-аз и АТФ-синтаз: F-типы и V-типы. F-типы мало отличаются друг от друга. Более того, F- и V-типы АТФ-аз состоят из одних и тех же структурных компонентов. Как и АТФ-синтаза, V-тип

АТФ-аз содержит периферический домен (V_1) и интегральный мембранный компонент (V_0). V_1 содержит 7 различных субъединиц, из них 3 α и 3 β располагаются вокруг центрального стержня δ . V_0 также имеет 3 субъединицы и несколько копий субъединицы C . Совершенно очевидно, что эта структура очень напоминает структуру АТФ-аз F-типа, с той лишь разницей, что V-тип АТФ-аз локализуется не столько на внутренней мембране митохондрий, сколько на васкулярной мембране высших растений и грибов, а также секреторных, лизосомальных и эндосомальных везикул.

1.8.4.2. Структура и работа «мотора» АТФ-синтазы

Схематично АТФ-азу можно представить в виде моторчика, в котором имеются движущий «ротор», стабилизирующий «статор» и связывающий «головку» АТФ-азы со «статором» рычаг (рис.36).

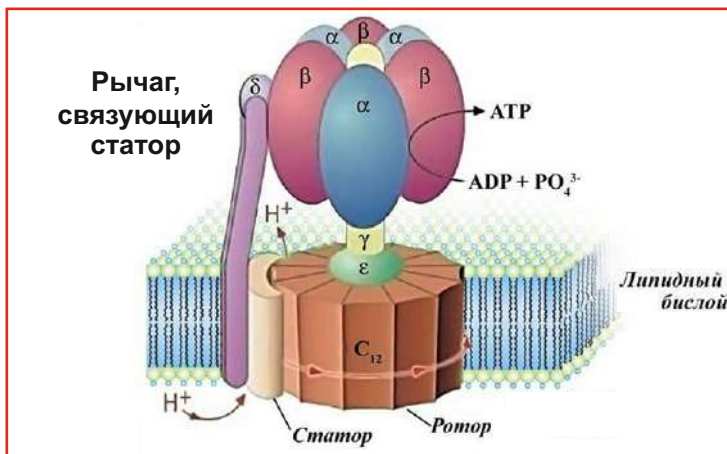


Рис. 36. Схематичное расположение мотора АТФ-азы: «ротора», «статора» и связывающего «головку» АТФ-азы со «статором» рычага.

На рисунке 37 представлено направление движения обеспечивающих синтез АТФ компонентов.

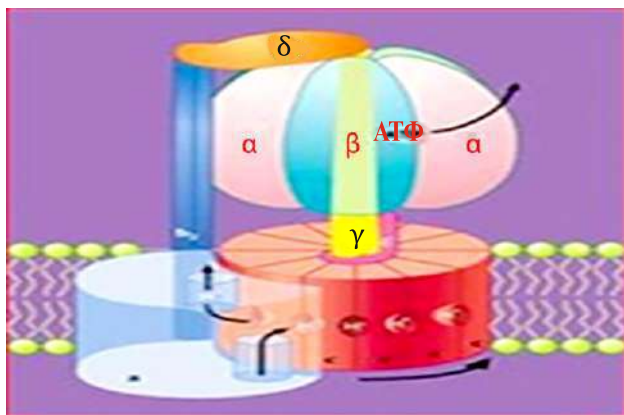


Рис. 37. Направление вращения «головки» и «ножки» «мотора» АТФ-азы.

Выше уже было сказано, что головка АТФ синтазы содержит 3 идентичных друг другу комплекса α / β , находящихся в различных конформационных состояниях (рис. 38).

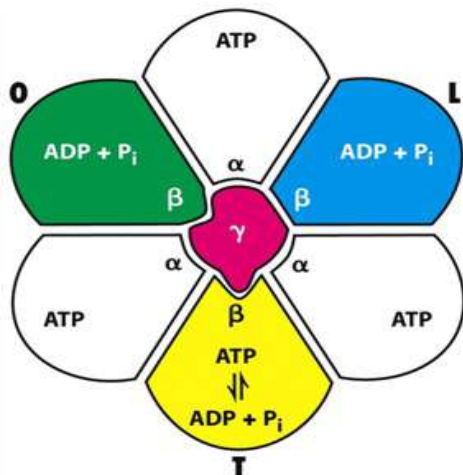


Рис.38. Три конформационных состояния АТФ-азы: «O», «L» и «T».

1. Конформация «О» («Открытая» конформация) имеет низкую аффинность к АДФ, АТФ и неорганическому фосфату и не проявляет каталитической активности.

2. Конформация «L» («Легко отсоединяющаяся» конформация) слабо присоединяет АДФ, АТФ и неорганический фосфат, не имеет каталитической активности.

3. Конформация «Т» («прочно связанная» конформация) хорошо связывает АДФ, АТФ и неорганический фосфат, проявляет выраженную каталитическую активность.

Конформационные состояния трех α/β гетеродимеров (рис. 39) находятся под воздействием асимметрических взаимодействий «ротора». Они циклически меняют свое состояние, один за другим проходя через все эти три конформационные состояния, как показано на рис.39.

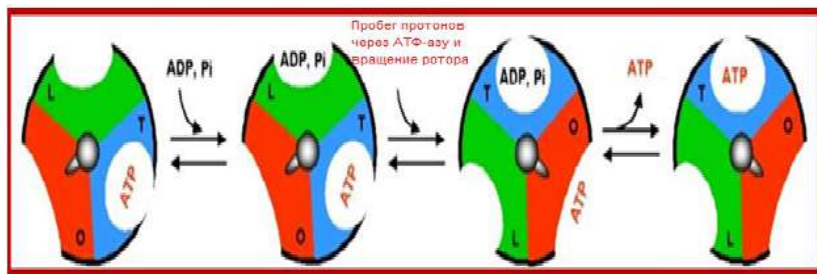


Рис. 39. Изменение положения «ротора» во время синтеза АТФ. При прохождении протонов через «ротор» конформация АТФ-азы меняется в последовательности, указанной на рисунке.

Каталитическая головка АТФ-азы ножкой, т.е. олигомицин-чувствительным стержнем [118], связана с протонной помпой, встроенной вовнутреннюю мембрану митохондрии (рис. 40) [119]. Считается, что для синтеза каждого АТФ требуется прохождение 3 протонов сквозь мембрану комплекса из межмембранного пространства в матрикс.



Рис. 40. Чувствительный к олигомицину конформационный белок (OSCP- oligomycin sensitive conformational protein) является связующим звеном между F_0 - и F_1 -частями АТФ-азы.

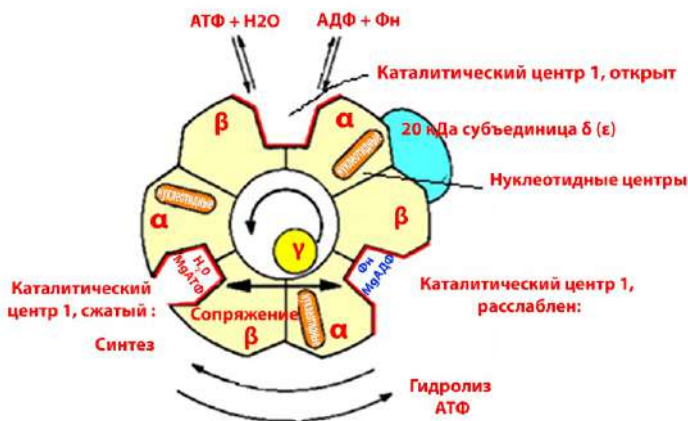


Рис. 41. Схема структуры АТФ-азы.

Разрез полой головки АТФ-азы через три пары субъединиц (α – и β -гетеродимеры); вращающая γ – субъединица находится в центре. Каждая α/β пара содержит в расщелине по одному каталитическому центру и одному находяще-

муса в глубине дополнительному нуклеотидному некаталитическому центру (на рисунке он коричневый). Только одна пара субъединиц связана с γ -субъединицей (в *Micrococcus luteus* - это не δ -, а ε -субъединица). Эта пара субъединиц является частью «второй ножки».

Головка F_1 содержит три нуклеотид-связывающих сайта. Вероятнее всего, фермент проходит через все три вышеуказанные фазы каталитического цикла. На первой стадии к активному центру, обеспечивающему образование ангидридной связи в составе АТФ, присоединяются АДФ и неорганический фосфат. Энергетически эта стадия обеспечивается за счет прочно присоединенного к активному центру АТФ, гидролиз которого дает необходимое количество энергии. Энергия для запуска всего этого процесса берется от энергии движения протона.

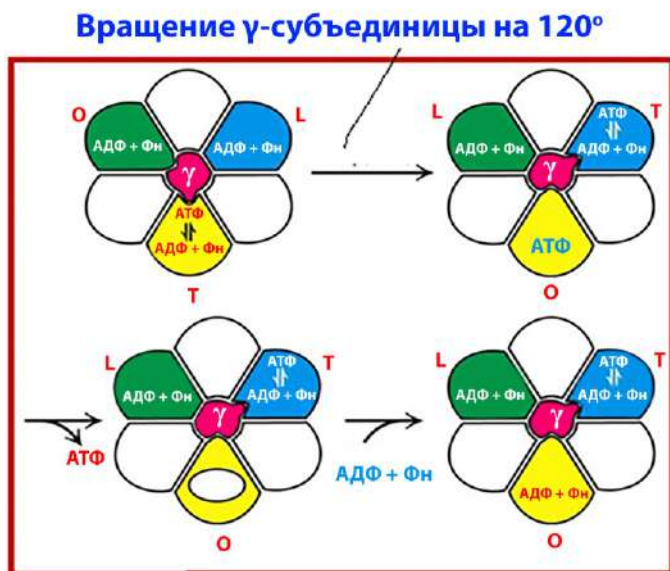


Рис. 42. Изменение конформации АТФ-азы O, L и T.

Вращение γ -субъединицы обеспечивается движением электронов через отверстие субъединицы F_o , «ножки» (рис.

42). Образование прочной связи между γ - и β -субъединицами заставляет их вращаться вместе. Каждый поворот на 360° завершается образованием 3-х АТФ. Ножка F_0 погружена в толщу внутренней мембраны и является молекулярной турбиной, движимой транс-мембранным протонным градиентом (рис. 43).

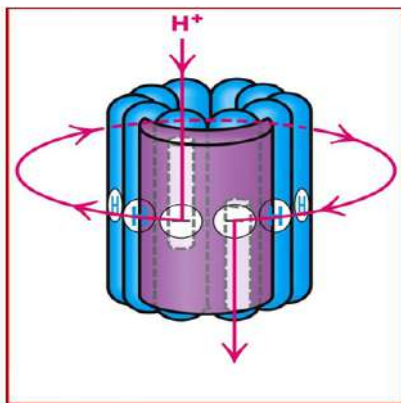


Рис. 43. Структура F_0 – «молекулярной турбины», движимой трансмембранным градиентом концентрации протонов.

Вхождение в ножку F_0 протона вызывает вращение распределительного вала внутри базовой пластины F_0 и группы белков головки F_1 , в частности γ -субъединицы, вызывая конформационные изменения единиц. Вторая, находящаяся вне центра белковая связка связывает головку АТФ-азы с ножкой, предотвращая таким образом бесполезное вращение головки в то время, когда центральный вал вращается. Энергия вращения передается каталитическим субъединицам головной части F_1 АТФ-синтазы. Так называемый «кулачок» разъединяет белковые субъединицы, не позволяя им соединяться с АТФ и гидролизовать его. Получаемая же от вращения энергия на этой стадии

используется на высвобождение АТФ от комплекса, а не на образование АТФ.

Движение γ -субъединицы в центре АТФ-азы запускается движением протонов через кольцо С ножки F_0 . Прочная связь между С кольцом и γ -, ϵ -субъединицами заставляет их тоже вращаться с γ -субъединицей (рис. 44).

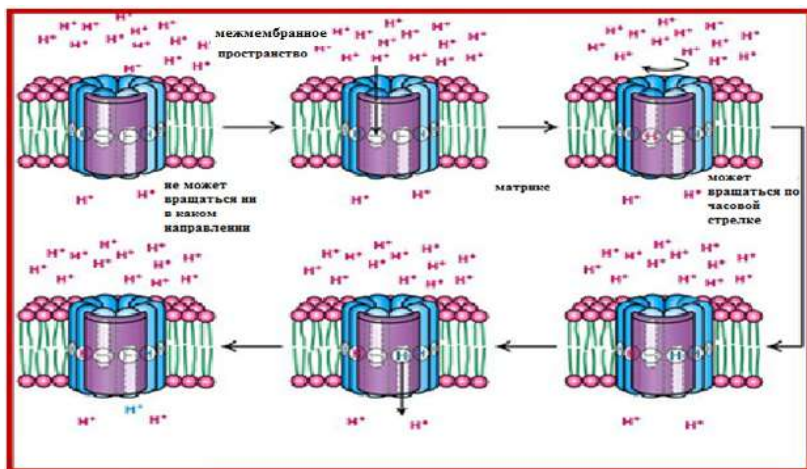


Рис. 44. Транспорт протонов стимулируется базальным F_0 С-комплексом и вращением центрального стержневого γ -ротора.

Каждое вращение кольца С вокруг своей оси на 360° ведет к синтезу трех АТФ. Транспорт протонов стимулируется их контактом с ножкой F_0 и комплексом, а также вращением центрального стержня γ -ротора. Помпа содержит аминокислоту аргинин, которая передает ионы водорода на аспартат ротора (рис.45). Аспартат - типичная отрицательно заряженная аминокислота ротора, окруженная мембранными липидами, и это его качество здесь используется в передаче ионов водорода через АТФ-азный канал и, соответственно, для вращения ротора.

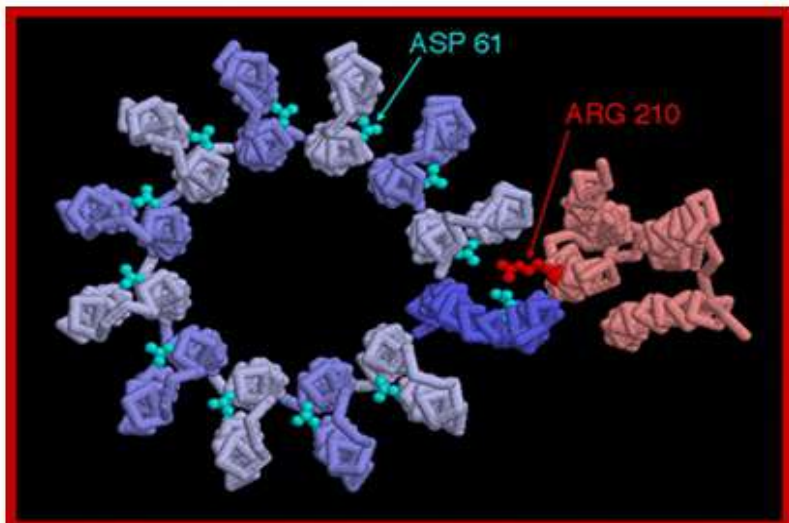


Рис.45. Остатки аспарагиновой кислоты и аргинина в составе протонной помпы.

Итак, ротор поворачивается только тогда, когда аспартаты присоединяют водород и становятся электронейтральными. Ионы водорода проходят через извилистый путь мотора F_0 , вызывая вращение ротора. Они собираются цепью из аминокислот помпы и затем передаются на аргинин. Аргинин передает водороды ротору, который все это время вращается и поворачивает все вместе с собой. Затем водороды захватываются другими аминокислотами помпы и в конце концов передаются на противоположную часть внутренней мембраны [120]. Сегодня процесс прохождения ионов водорода через водородную помпу АТФ-азы все еще интенсивно изучается. Предметами изучения в этом процессе на сегодня являются:

1. Вращение центрального вала внутри F_1 для координации действий трех кооперативных, чередующихся друг с другом каталитических нуклеотид-связывающих центров,

2. Вращение субъединиц внутри F_0 во время высвобождения энергии при транспорте. Примечательно, что сопряжение энергии с АТФ-синтазой весьма эффективно и обратимо. Так, движение протонов через F_0 при сопряжении фосфорилирования с дыханием однозначно ведет к синтезу АТФ. Однако теоретически АТФ-азой может производиться также и гидролиз АТФ, и тогда энергия гидролиза будет использоваться для переноса протонов через ионный канал в обратном направлении и создавать таким образом трансмембранный, электрохимический протонный градиент (как это происходит, например, в Na^+/K^+ АТФ-азе, Ca^{2+} -АТФ-азе).

Еще раз отметим, что у АТФ нет какой-либо запасной формы. Поэтому весь формируемый АТФ немедленно используется на нужды клетки, так что концентрация АТФ в клетке, вне зависимости от состояния покоя или же физической активности практически держится на постоянном уровне. Малейшее изменение концентрации АТФ воздействует на метаболический статус клетки. Так, в состоянии энергетического голода клетка характеризуется относительно низким АТФ, но высоким АДФ, тогда как в состоянии сытости в клетке преобладает трифосфатная форма этого нуклеотида.

1.8.5. Разобщение фосфорилирования и окисления в митохондриях

Повреждение внутренней мембраны митохондрий, увеличение ее проницаемости, например под действием *разобщителей* сопряжения, вызывает исчезновение электрохимического потенциала, разобщение процессов окисления и фосфорилирования, а следовательно, прекращение процесса синтеза АТФ. Разобщением дыхания и фосфорилирова-

ния называют явление исчезновения на мембране электрохимического потенциала под действием разобщителей и прекращение синтеза АТФ. Разобщителями являются вещества, которые могут переносить протоны или другие ионы через внутреннюю мембрану митохондрий, минуя каналы АТФ-синтетазы. Разобщители, создающие каналы для перехода протонов в матрикс, называются *протонофорами*, вещества же переносящие электроны из межмембранного пространства в матрикс, называются *ионофорами* [119]. В результате разобщения количество АТФ в клетке снижается, одновременно увеличивается АДФ, возрастает скорость потребления O_2 , окисления НАДН₂, ФАДН₂, однако освобождающаяся из них свободная энергия рассеивается в виде теплоты. Как правило, разобщители – это липофильные вещества, легко проходящие через мембраны. Например, вещество 2,4-динитрофенол транспортирует H^+ . Среди лекарств такими свойствами обладает дикумарол, из эндогенных конечных метаболитов обмена – билирубин. Гормон щитовидной железы тироксин и антибиотики валиномицин и грамицидин также являются разобщителями тканевого дыхания. Разобщающие тканевое дыхание белки образуют во внутренней мембране митохондрий протонный канал. Повышение проницаемости внутренней мембраны для протонов ведет к тому, что сквозь нее протоны H^+ из межмембранного пространства проникают внутрь митохондрий, минуя фазу прохождения через комплекс V. Уничтожение электрохимического градиента не позволяет АТФ-азе активизироваться, в результате чего энергия движущихся по цепи переноса электронов и протонов рассеивается в виде тепла, вместо того чтобы кумулироваться в ангидридных связях АТФ и завершаться производством АТФ. В физиологических условиях в бурой жировой ткани новорожденных млекопитающих, в том числе и у человека синтезируется белок термогенин. Он также переносит H^+ из

межмембранного пространства внутрь матрикса митохондрий, сводя к нулю электрохимический H^+ градиент со всеми вытекающими отсюда последствиями. Тироидные гормоны являются разобщителями только в повышенных дозах; так например, при тиротоксикозе они ведут к снижению протонного градиента на внутренней и внешней поверхностях внутренней мембраны. Интересен тот факт, что в физиологических дозах те же самые тироидные гормоны способствуют сопряжению окисления и фосфорилирования, стимулируя таким образом выработку АТФ митохондриями [120]. Ацетилсалициловая кислота (аспирин) в высоких дозах и тяжелый металл мышьяк также действуют как разобщители фосфорилирования. После их воздействия на организм температура тела поднимается, что является результатом рассеивания энергии электронов в виде тепла, и возникает ощущение жара, одновременно наблюдается снижение веса тела, что вполне естественно в условиях снижения выработки АТФ, требуемого для всех синтетических процессов [121]. Механизм действия использовавшегося до сравнительно недавнего времени против целлюлита препарата динитрофенола аналогичен выше указанному. Этот препарат, действующий в качестве транспортирующего протоны внутрь матрикса челнока, использовался в медицине для снижения веса тела. Однако его побочные эффекты, такие как повышение температуры тела, в ряде случаев вели к летальному исходу, поскольку рассеивавшаяся в виде тепла энергия вела к перегреву людей, находившихся под активным солнцем.

Кроме упоминавшихся прежде ротенона, препятствующего работе комплекса I, ингибирующего комплекс III антимицина и блокирующих цитохромоксидазный комплекс цианидов, существуют и другие разобщители дыхания, которые тоже препятствуют передаче электронов по ЦПЭ. Атрактилозид блокирует реакцию транслокации АТФ/ АДФ (рис. 46) [121].

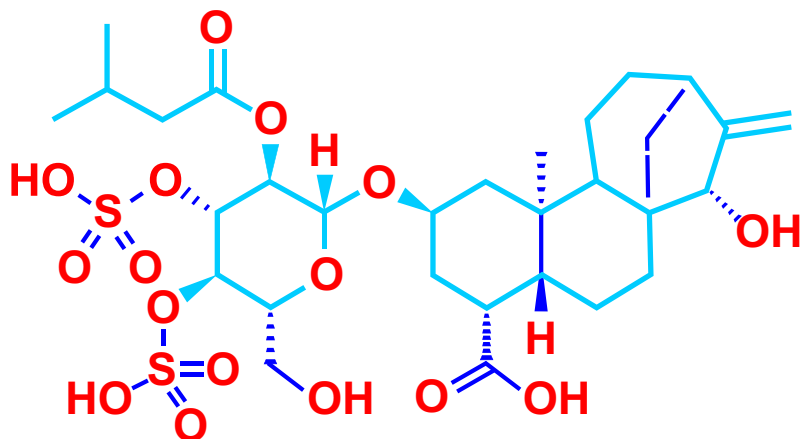
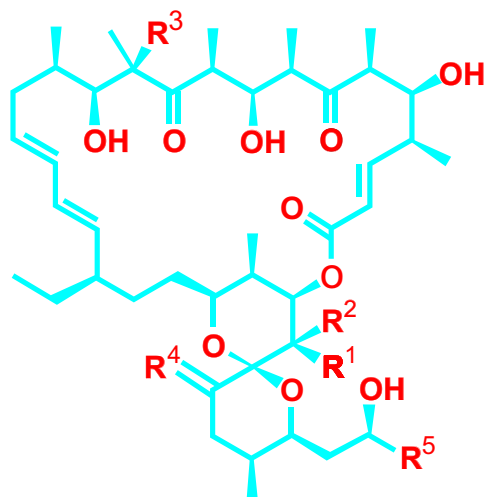


Рис. 46. Атрактилозид - гликозид, обладающий высокой токсичностью вследствие ингибирования транслоказы АТФ/ АДФ.

Митохондрии становятся неспособными поглощать из цитоплазмы АДФ и транспортировать в цитозоль синтезированный АТФ, что ведет к накоплению АТФ в матриксе митохондрий и автоматическому ингибированию I и II общего путей катаболизма, переноса электронов по ЦПЭ, поскольку все эти процессы являются АДФ-зависимыми и тормозятся при повышении концентрации АТФ.



Олигомицины, общая структура которых приводится ниже, связываясь с чувствительным к олигомицину конформационным белком OSCP, препятствуют синтезу АТФ на уровне V комплекса. В табл. 7 приведены радикалы различных антибиотиков, объединенных общим названием «олигомицины».

Табл. 7. Радикалы R антибиотиков из группы олигомицина

Название антибиотика	R1	R2	R3	R4	R5
Олигомицин А	-CH ₃	-H	-OH	=H,H	-CH ₃
Олигомицин В	-CH ₃	-H	-OH	=O	-CH ₃
Олигомицин С	-CH ₃	-H	-H	=H,H	-CH ₃
Рутамицин А (ОлигомицинD)	-H	-H	-OH	=H,H	-CH ₃
Олигомицин Е	-CH ₃	-OH	-OH	=O	-CH ₃
Олигомицин	-CH ₃	-H	-OH	=H,H	-CH ₂
Олигомицин F					CH ₃
Рутамицин В	-H	-H	-H	=H,H	-CH ₃
44-гомолигомицин А	-CH ₂ CH ₃	-H	-OH	=H,H	-CH ₃
44-гомоолигомицин В	-CH ₂ CH ₃	-H	-OH	=O	-CH ₃

Однако следует отметить, что существуют также препараты, такие как CaCl₂, стимулирующие окислительное фосфорилирование и повышающие выработку АТФ.

1.8.6. Расчет коэффициента окислительного фосфорилирования

Коэффициент окислительного фосфорилирования – это количество синтезируемого АТФ в пересчете на атом поглощенной молекулы кислорода или пару электронов, перенесенных к одному атому молекулярного кислорода. Для оценки эффективности окислительного фосфорилирования используется величина «коэффициент окислительно-

го фосфорилирования», выражаемая P/O - отношение количества фосфорной кислоты P_n , использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода O , поглощенного в процессе дыхания.

При окислении молекулы НАДН₂ в межмембранное пространство выкачивается 10 протонов. Если учесть, что на синтез одной молекулы АТФ в матриксе митохондрий и выход его из матрикса в цитозоль затрачивается 4 протона (3 протона – на синтез и 1 протон – на выход из матрикса), то становится ясным, что 10 протонов могут обеспечить $10/4 = 2.5$ АТФ. И хотя электроны e^- проходят три пункта сопряжения, в которых выделившаяся энергия могла бы обеспечить синтез трех АТФ, однако из-за большого количества рассеиваемой на поддержание температуры тела энергии, реально в организме коэффициент фосфорилирования P/O для НАДН₂ равен не более 2.5.

При окислении молекулы ФАДН₂, электроны e^- проходят только два пункта сопряжения по дыхательной цепи, что ведет в выходу в межмембранное пространство 6 протонов, а это могло бы обеспечить синтез 2 молекул АТФ. Однако учитывая тот факт, что на синтез АТФ затрачивается три протона H^+ , плюс один протон - для выхода АТФ в матрикс (что составляет в общей сложности 4 протона), соответственно для ФАДН₂ $P/O = 6/4 = 1.5$ [122]. Итак, как видим теоретический максимум синтеза АТФ (3 и 2) не отражает реальной величины P/O в организме человека и фактически эта величина всегда меньше из-за затрат на транспорт и рассеивание энергии в виде тепла [123].

1.8.7. Транспорт веществ через мембрану митохондрий

Известно, что внутренняя мембрана митохондрии свободно проницаема для простых незаряженных молекул, таких как кислород O_2 , вода H_2O , углекислый газ CO_2 ,

аммиак NH_3 , а также для монокарбоновых кислот. Эти вещества проходят мембрану по градиенту концентрации. Однако для заряженных ионов мембрана непроницаема, и их переносят через мембрану специальные трансмембранные насосы, происходит это за счет энергии электрохимического потенциала. Обмен этими веществами между матриксом митохондрий и цитоплазмой происходит за счет транспортных систем, локализованных во внутренней мембране митохондрий; они переносят такие вещества как пируват, фосфат, АТФ, АДФ, глутамат, аспартат, малат, 2-оксоглутарат, цитрат, жирные кислоты) по механизму *антипорта* (обменная диффузия, А) *симпорта* (сопряженный транспорт, S) или *унипорта* (облегченная диффузия, U) Укажем, что только на транспорт АТФ и АДФ расходуется около четверти всей энергии всего электрохимического потенциала внутренней мембраны [123,124]. Осмотическое равновесие поддерживается за счет обменных механизмов антипорта. Пировиноградная кислота и Ca^{2+} перемещаются в матрикс путем с импорта с H^+ . Этот переносчик ионов Ca^{2+} вместе с эндоплазматическим ретикулом регулирует концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме. Переносчик пирувата переносит через внутреннюю мембрану в матрикс пируват и протоны, и протонный градиент является движущей силой импорта фосфата и пирувата в матрикс. Антипортом (обменная диффузия, А) перемещаются: АТФ/АДФ, $\text{OH}^-/\text{P}_\text{н}$ (неорганический фосфат), H^+/Na^+ , малат/цитрат, малат/ α – кетоглутарат . Большая часть продуцируемого митохондриями АТФ доставляется в цитоплазму с помощью *АДФ/АТФ-транслоказы* в обмен на АДФ: это тоже обменная диффузия, А. Обмен АТФ/АДФ и выброс ионов Ca^{2+} зависят от трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий. Фосфат же поступает в митохондрии путем импорта с протонами (сопряженный транспорт, S), этот процесс не зависит от транспорта АДФ/АТФ.

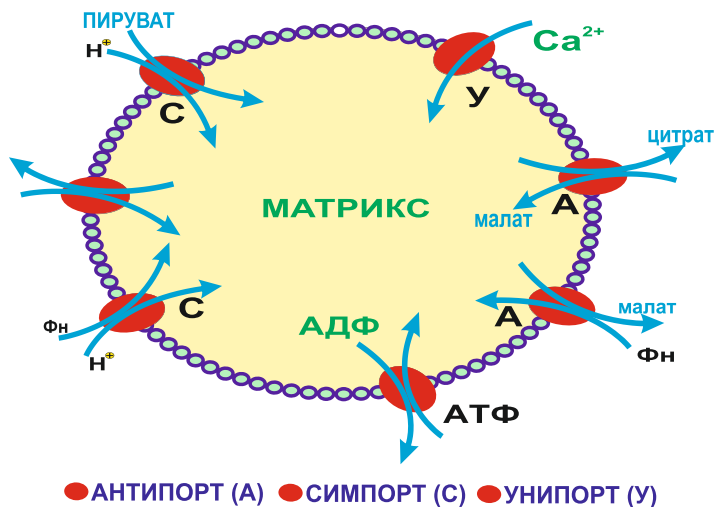


Рис. 47. Транспортные каналы внутренней мембраны митохондрий для протонов, кальция, фосфатов, АТФ, АДФ, пирувата, мала́та, цитрата.

Жирные кислоты для окисления в митохондриях поставляет в матрикс карнитин (рис. 48).

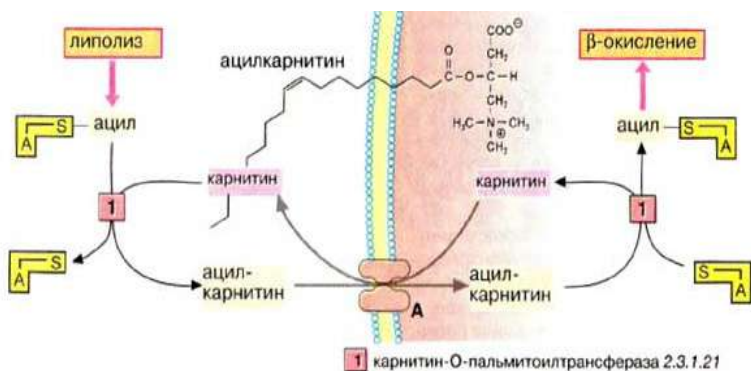


Рис. 48. Перенос жирных кислот в митохондрии при помощи карнитина.

На рис. 49 представлено перемещение малат/аспартат, малат/ α – кетоглутарат методом обменной диффузии, А.

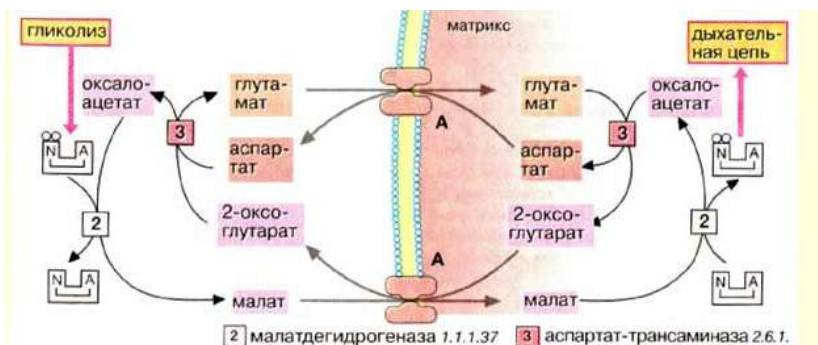


Рис. 49. Перенос малата и аспартата через стенку митохондрий (малат-аспартатный шунт).

Митохондрии являются главными потребителями кислорода в организме. Кислородная недостаточность, возникающая в частности в результате гипоксии, ведет к повреждению митохондрий, иногда необратимому, вплоть до некроза. Поэтому первым признаком гипоксии в тканях является набухание митохондрий.

I.8.8. Теплопродукция

30-35% свободной энергии, образующейся в организме, рассеивается в виде теплоты, что используется теплокровными животными на поддержание температуры тела. Разобщение окислительного фосфорилирования в бурой жировой ткани позволяет генерировать тепло. Это необходимо для поддержания температуры тела у новорожденных, животных во время зимней спячки и у всех млекопитающих при адаптации к холоду. У взрослых людей важную роль в термогенезе при переохлаждении играют ненасыщенные жирные кислоты. Охлаждение стимулирует выделение в кровь норадреналина, который активирует в жировой ткани

липазу, что ведет к гидролизу триглицеридов. Образующиеся при распаде триглицеридов свободные жирные кислоты могут не только быть топливом дыхательной цепи, но и переносить протоны через мембрану в матрикс митохондрий, разобщая при этом дыхание и фосфорилирование для генерации тепла. Жирные кислоты возвращаются обратно в ионизированной форме с помощью переносчиков.

1.8.9. Дыхательный контроль

В норме субстраты тканевого дыхания и кислород находятся в митохондрии в достаточном количестве и не лимитируют окислительное фосфорилирование. Активность окислительного фосфорилирования ограничивает только концентрация АДФ, которая всегда обратно пропорциональна концентрации АТФ. При физической нагрузке концентрация АТФ снижается, а АДФ увеличивается, что ускоряет дыхание и соответственно, фосфорилирование, ав состоянии покоя, наоборот, количество АТФ увеличивается, а АДФ снижается, что влияет тормозящее на дыхание и фосфорилирование. Эту зависимость интенсивности дыхания митохондрий от концентрации АДФ и называют *дыхательным контролем*. Из-за существования дыхательного контроля скорость синтеза АТФ соответствует потребностям клетки в энергии. Общее содержание АТФ в организме 30-50 г, но каждая молекула АТФ в клетке «живет» меньше минуты. В сутки у человека синтезируется 40-60 кг АТФ и столько же распадается [3], а при интенсивной физической нагрузке этот показатель может повышаться до 1 т. Сопоставляя количество требуемого для нормальной физической активности АТФ с таковым в составе ампул для инъекций, можно понять что назначение инъекций АТФ для лечения физической слабости, конечно же неоправданно.

II. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛЕНИЯ-ВОССТАНОВЛЕНИЯ

В последние десятилетия некоторые ферменты, представляющие особый интерес для промышленности, подвергаются белковой инженерии с целью получения высокопродуктивных ферментов, отличающихся от природных по пространственной конфигурации и некоторым характеристикам активного центра [125]. В связи с этим в литературе накопился огромный научный материал, описывающий структуру активного центра ферментов, его работу, элементы активного центра, ответственные за выполнение направленного переноса частиц и обеспечивающие снижение энергии активации процесса. С этой точки зрения небезынтересно будет рассмотреть особенности доменов некоторых ферментов, выполняющих окислительно-восстановительные реакции в живых системах и роль определенных отдельно взятых групп активного центра в протекании реакции.

II.1. Особенности строения доменов каталитического центра алкоголь дегидрогеназ (ЕС 1.1.1)

Алкоголь-дегидрогеназы являются ферментами окисления-восстановления, катализирующими окисление спиртов до соответствующих кетонов и альдегидов, во время которых происходит восстановление НАД(Ф)⁺ до НАД(Ф)Н₂, а также обратный процесс: восстановление альдегидов и кетонов до спиртов с соответствующим переходом восста-

новленного никотинамида в окисленный. Алкоголь дегидрогеназы составляют одну из самых крупных и разнообразных групп ферментов класса НАД(Ф)⁺-зависимых оксидо-редуктаз. Они могут быть разделены на несколько субсемейств на основе самых различных критериев.

Многие представители семейства алкоголь-дегидрогеназ/редуктаз с короткой цепью, такие как дигидроптерин-дегидрогеназа или дегидрогеназа 17 β -кетостероидов [126], содержат ключевой остаток Туг, гидроксильная группа которого может отдавать или присоединять протоны от субстрата. Примыкающий к нему остаток лизина и кольцо никотинамида НАД(Ф)⁺ снижают рК гидроксильной группы тирозина, усиливая способность алкоголь дегидрогеназ/редуктазы редуцировать или же окислять субстрат (рис.55)

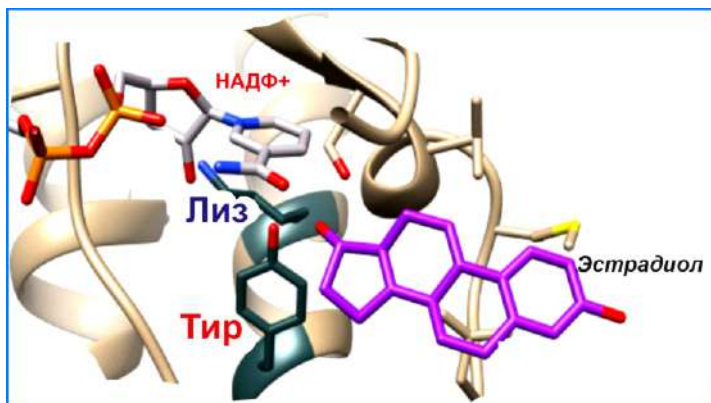


Рис. 55. Активный участок человеческой 17 β -гидростероиддегидрогеназы.

17 β -гидростероид дегидрогеназа относится к группе короткоцепочечных дегидрогеназ. Субстрат выделен фиолетовым цветом, НАДФ⁺ окрашен серым цветом, а цвет его гетероатомов дан отличным цветом; аминокислотные остатки, ответственные за проявление каталитической активности, окрашены в темно-серый цвет.

Когда остаток тирозина отщепляет протон от субстрата, гидрид переносится от субстрата к находящемуся в окисленном состоянии кофактору. Однако существует ряд короткоцепочечных алкоголь дегидрогеназ/редуктаз, способных катализировать восстановление эноил-тиоэфиров, тирозиновый остаток которых хоть и присутствует в активном центре фермента, однако не участвует в переносе протонов ни в качестве донора, ни в качестве акцептора; у некоторых же короткоцепочечных алкоголь дегидрогеназ/редуктаз тирозиновый остаток вообще отсутствует, как например у человеческой эноил-КоА редуктазы перокси-сом. Вместо этого протоны переносятся непосредственно из раствора или же в раствор [127].

Алкоголь-дегидрогеназам со средней длиной цепи требуется кофактор цинк (рис. 56.). Эти дегидрогеназы действуют на основе Туг – опосредованного механизма окисления-восстановления субстратов, подобного алкоголь дегидрогеназам с короткой длиной цепи или же используют в качестве кофактора Zn , непосредственно участвующий в процессе катализа. При действии на основе Zn -опосредованного механизма и в отсутствие субстрата, расположение иона Zn^{2+} диктуется окружающими фермент молекулами воды и тремя остатками аминокислот, две из которых представлены цистеином, а одна – гистидином. Цинк с тремя аминокислотами принимает геометрическую форму тетраэдра [128]. После того как субстрат присоединяется к ферменту, он вытесняет молекулу воды из связи с цинком (рис.56). После этого субстрат (спирт) передает свой протон в раствор, образуя промежуточный продукт - оксид спирта. Продукт реакции, в свою очередь стабилизируется цинком каталитического центра. Затем оксид спирта передает гидрид на окисленный кофактор, превращаясь в конечный продукт – альдегид или же кетон [128].

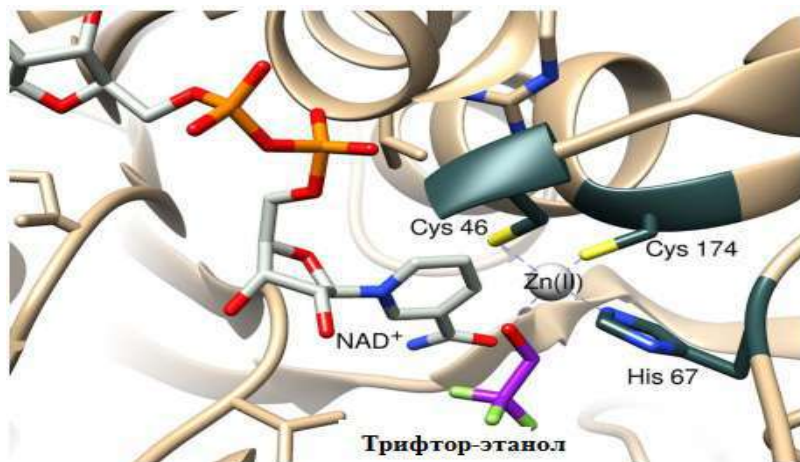
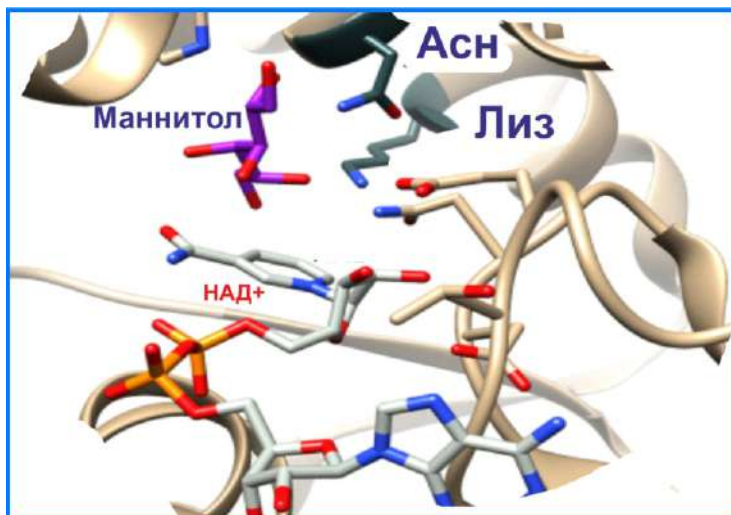


Рис.56. Активный центр дегидрогеназы лошадиной печени. Дегидрогеназа лошадиной печени относится к семейству средне-цепочечных дегидрогеназ. Субстрат выделен фиолетовым цветом, НАДФ⁺ окрашен серым цветом, а цвет его гетероатоов дан отличным цветом; аминокислотные остатки, являющиеся частью координационных связей иона цинка, отдельно выделены и окрашены в темно-серый цвет.

Существует также третий тип алкоголь дегидрогеназ, состоящий из длинно-цепочечного белка. Это гетерогенная группа ферментов, отличающихся друг от друга по механизму каталитического действия и присутствию в них дополнительного кофактора, такого как например Fe. Железо и цинк могут присутствовать в активном центре фермента одновременно или же совершенно отсутствовать [129, 130]. Представителем этого вида алкоголь дегидрогеназ является маннитол -2-дегидрогеназа из *Pseudomonas fluorescens*. Многие из этих ферментов используют третий механизм действия, отличный от такового коротко-цепочечных и средне-цепочечных алкоголь-дегидрогеназ. Согласно этого механизма действия лизиновый остаток активного центра принимает протон от субстрата, затем

передает его молекуле раствора. Способность лизина участвовать в процессе катализа как аминокислоты с основными свойствами усиливается за счет образования водородной связи с аспарагином (рис.57). После этого гидрид передается от субстрата к находящемуся в окисленном состоянии кофактору [131].



*Рис. 57. Активный центр маннитол-дегидрогеназы из *Pseudomonas fluorescens*. Маннитол-дегидрогеназа относится к семейству длинноцепочечных дегидрогеназ, не требующих металлического кофактора для проявления активности...*

Субстрат выделен фиолетовым цветом, НАДФ⁺ окрашен серым цветом, а цвет его гетероатоов дан отличным цветом.

Аминокислотные остатки, ответственные за проявление каталитической активности, выделены в темно-серый цвет.

Железосодержащие алкоголь-дегидрогеназы изучены меньше, чем их аналоги, цинк-содержащие алкоголь-дегидрогеназы [132]. Эти ферменты содержат двухвалентный ион Fe^{2+} , обычно связанный с одним остатком аспарагиновой кислоты и тремя гистидиновыми остатками. Как и ион цинка со связанными аминокислотами, ион железа образует

с аспарагиновой кислотой и гистидином форму тетраэдра. Механизм действия железосодержащих алкоголь дегидрогеназ основан на снижении рКа гидроксильной группы субстрата в момент соединения субстрата с ферментом, поскольку в этот момент происходит его взаимодействие с ионом Fe^{2+} , который обеспечивает перенос гидридной группы на НАД⁺ [133, 134]. Выявлено, что в отличие от цинк-содержащих алкоголь дегидрогеназ, железо-содержащие алкоголь дегидрогеназы могут легко инактивироваться кислородом. Связан этот феномен с тем, что в присутствие кислорода железо вступает в реакции железо-опосредованных реакций катализа с кислородом и стабильно окисляется [135, 136], в результате чего реакции восстановления замедляются.

II.2. Структурные особенности активного центра альдегид дегидрогеназ (ЕС 1.2.1)

Альдегид-дегидрогеназы катализируют окисление альдегидов до кислот, образуя из альдегидной группы субстрата карбоксильную. В некоторых случаях альдегид-дегидрогеназы окисляют КоА-эфиры или же тио-эфиры альдегидов с ацил-переносящим белком (АПБ), причем процесс сопровождается одновременным восстановлением НАД(Ф)⁺ до НАД(Ф)Н₂; реакции эти могут протекать также в обратном направлении. Ферменты этой группы обычно называются редуктазами, например, *редуктаза органических кислот*, и это название отражает специфичность фермента к субстрату и/или физиологическое направление реакции.

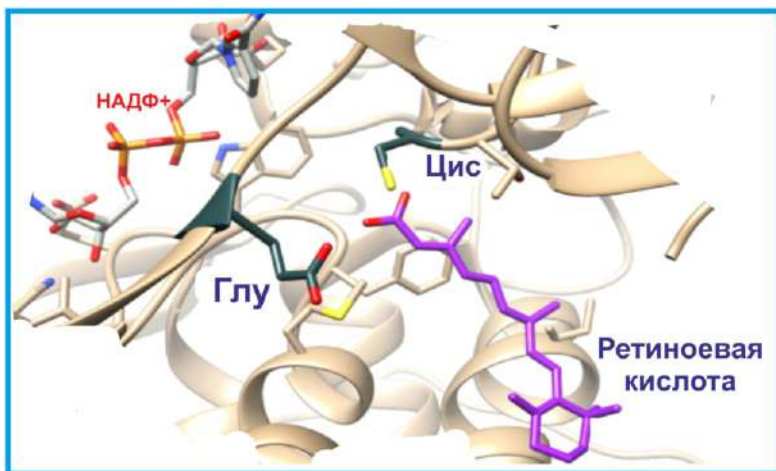


Рис.58. Активный центр человеческой альдегид дегидрогеназы. Субстрат выделен фиолетовым цветом, НАДФ+ окрашен серым цветом, а цвет его гетероатомов дан отличным цветом. Аминокислотные остатки, ответственные за проявление каталитической активности, выделены в темно-серый цвет.

Ключевым каталитическим аминокислотным остатком альдегид дегидрогеназ является цистеин, сульфгидрильная группа которого и проявляет свойства восстановителя. Протон сульфгидрильной группы обычно отталкивается остатком глутаминовой кислоты, или же, в исключительных случаях – остатком гистидина, как в случае с альдегид дегидрогеназой из *Vibrio harveyi* [137].

Тиольная группа может проявлять также нуклеофильные свойства, что и создает ферменту условия для воздействия на углерод карбонильной группы. Такая нуклеофильная атака ведет к образованию тио-хемиацетального промежуточного метаболита. Этот тио-хемиацеталь содержит отрицательно заряженный атом кислорода, который хоть и частично, но стабилизируется остатком аспарагина, который также является неотъемлемым фактором катализа. Затем тио-хемиацетальный анион кислорода спонтанно

передает гидридную группу на НАД(Ф)⁺. Во время этой реакции образуется тиоэфирная связь между альдегидом и цистеином каталитического центра. После этого тиоэфирная связь гидролизуется молекулой воды, которая активируется остатком глутаминовой кислоты. Так что в этом гидролизе глутаминовая кислота выступает в качестве активатора, способствуя также освобождению кислоты от фермента. В результате всех этих превращений из центра фермента освобождается продукт реакции – органическая кислота [138, 139].

Некоторые альдегид дегидрогеназы, такие как метилмалонил-семиальдегиддегидрогеназа, выделяют в среду в качестве продукта реакции не органическую кислоту, а ее КоА-эфир. Примечательно, что КоА-зависимые альдегид дегидрогеназы активно используются в природном брожении и брожении, используемом в белковой инженерии. Катализируемые этими ферментами реакции несколько напоминают процесс, обратный бета-окислению жирных кислот. Механизм действия альдегид дегидрогеназ наиболее изучен на примере физиологического образования спиртов у *E. coli* и бутанола – у *Clostridium*. Однако в результате этих реакций могут образовываться и более длинноцепочечные спирты. Этот последний тип реакций является предметом особого интереса ученых, занимающихся вопросами белковой инженерии. КоА-зависимые альдегид дегидрогеназы могут располагаться в клетке свободно и выполнять самостоятельную роль, или же быть в составе бифункционального фермента альдегид-алкоголь дегидрогеназы. Этот последний фермент присутствует в клетках подавляющего большинства бактерий. Бифункциональная альдегид-алкоголь дегидрогеназа способна катализировать последовательные реакции восстановления КоА эфиров в альдегиды с последующим превращением их в спирты. Субстратом реакции обычно выступает ацетил-КоА, продуктом же реакции обычно является ацетальдегид,

образующий впоследствии этанол. Обычно эти ферменты содержат два главных домена, N-терминальный альдегид-дегидрогеназный домен и железо-содержащий алкоголь-дегидрогеназный С-терминальный домен. Эти два домена связаны друг с другом коротким связующим звеном [140, 141].

Редуктазы органических кислот способны восстанавливать длинноцепочечные жирные кислоты до соответствующих альдегидов. Эта их способность представляет особый интерес с точки зрения синтеза спиртов и алканов из органических кислот, присутствующих в жирах и маслах. В *Mycobacterium marinum* обнаружены НАДФ⁺-зависимые оксидоредуктазы, способные катализировать восстановление широкого спектра жирных кислот с длиной цепи от 6 до 18 углеродов. Они обладают некоторой особенностью отличной от альдегид дегидрогеназ, заключающейся в том что в качестве активатора реакции поимо НАДФН₂ требуется также АТФ.

Ферменты *E. Coli*, полученные методом белковой инженерии, могут превращать жирные кислоты в длинноцепочечные спирты и алканы, которые применяются в качестве топлива, детергентов, пищевых добавок и т.д. Пептидные цепи этих ферментов были получены путем добавления в *E. Coli* гена редуктазы жирных кислот из *M. marinum* и альдегид редуктазы, т.е. алкоголь редуктазы, что позволило использовать эти ферменты с целью получения спиртов. Использование в инженерии недавно открытого фермента, альдегид декарбонилазы дало толчок для превращения длинноцепочечных альдегидов в алканы и формиат.

Другим типом альдегид дегидрогеназы, известной как редуктазаацил-КоА (редуктаза ацил – АПБ), пользуются для превращения жирных кислот в длинноцепочечные альдегиды и спирты путем их восстановления. Эти ферменты способны образовывать длинноцепочечные альдегиды путем восстановления жирных кислот, соединенных с ацил-

переносящим белком (АПБ) или же с HS-KoA. Редуктаза-ацил-KoA схожа с KoA-зависимыми альдегид дегидрогеназами, описанными выше, разница заключается лишь в том что они действуют на длинноцепочечные субстраты. Часть ферментов этой группы предпочтительно катализируют реакции с участием ацил-KoA в качестве субстрата, тогда как другие действуют в основном на ацил-АПБ. Первая группа ферментов образует продукты бета-окисления в реакциях с участием ацил KoA, а вторая участвует в реакциях синтеза жирных кислот, и оба эти фермента используются в белковой инженерии. Интересен тот факт, что некоторые из этих ферментов способны восстанавливать жирную кислоту в составе АПБ и KoA непосредственно в длинноцепочечные спирты, однако для этого требуется окисление двух молекул НАД(Ф)Н₂ вместо одной [142].

II. 3. Эноил-редуктазы (ЕС 1.3.1): флаavin-содержащие ферменты.

Механизм перемещения водорода на субстрат

Эноилредуктазы катализируют гидрирование активированных алкенов до соответствующих алканов. В роли субстратов для этих ферментов могут выступать только активированные алкены. В случае с эноилредуктазами один из углеродов, участвующих в образовании двойной связи, должен быть связан с функциональной группой, могущей отщеплять электрон. Такая функциональная группа перемещает плотность электронов двойной связи на себя, делая ее более электрофильной. Углерод, связанный с такой функциональной группой, обозначается C_α , а сопряженный с ним углерод - C_β . Реакция начинается с перемещения гидридной группы от восстановленного флавиного кофактора на C_β ,

после чего на С α перемещается протон тирозина, сопряженного с С α . Переданный с Тут на С α протон снова восполняется на остатке тирозина за счет молекулы воды. В конце реакции восстановленный НАД(Ф)Н $_2$ восстанавливает окисленный в ходе реакции флавиновый кофактор [143].

Одну из наиболее широких групп эноил-редуктаз составляют давно известные флавиновые ферменты. Их физиологическая функция еще до конца не выяснена, хотя было высказано предположение относительно их участия в детоксикации электрофильных компонентов [144]. Большинство реакций, катализируемых флавин-содержащими ферментами, интересны с точки зрения перспективы их дальнейшего использования в производстве. Например, флавин-содержащие ферменты могут восстанавливать нитроалкены до нитроалканов с образованием промежуточного азотсодержащего вещества – производного нитроната. Было показано, что флавин-содержащий фермент 1 с мутацией Y196F из *Saccharomyces carlsbergensis* катализирует накопление нитропроизводных, которые могут в последующем быть алкилированы с образованием нитроалканов с двумя хиральными центрами [144, 145]. Другим потенциальным аспектом приложения этих ферментов является их использование для малых модификаций в структуре лекарственных веществ, таких как алкалоиды морфина с целью изменения их фармакологических свойств. Одновременное включение методом генной инженерии в *E. Coli* флавин-содержащего фермента, морфин-редуктазы и морфин-дегидрогеназы ведет к образованию нового штамма, способного эффективно превращать морфин и кодеин в гидроморфин и гидрокодеин – лекарственные препараты, проявляющие выраженные анальгетические свойства [145].

II.4. Механизм переноса аминокислоты дегидрогеназы аминокислот. Глутамат-дегидрогеназа и фенилаланин-дегидрогеназа (ЕС 1.4.1)

Общей реакцией, катализируемой дегидрогеназами аминокислот, является перемещение гидрид-иона от Са-атома аминокислоты на НАД(Ф)⁺ с образованием соответствующей кетокислоты и аммиака. Наиболее изучена активность двух ферментов этой группы – глутамат дегидрогеназы и фенилаланин дегидрогеназы. Механизм действия этих двух дегидрогеназ в принципе одинаков. Сначала остаток аспарагиновой кислоты вступает в реакцию как основная кислота, отщепляя протон от α-аминогруппы субстрата - аминокислоты. Затем гидрид-ион перемещается от Са на НАД(Ф)⁺, образуя при этом промежуточное фешество, α-иминокислоту [146, 147]. В конце реакции α-иминокислота гидролизуется до α-кетокислоты и аммиака [146].

Поскольку дегидрогеназы аминокислот отщепляют аминокислотную группу от аминокислоты, запуская реакцию ее распада с последующим включением в другие метаболические пути, они играют ключевую роль в катаболизме аминокислот. Образованные кето-производные аминокислот легко включаются в ЦТК и другие реакции распада. В процессе отщепления от аминокислоты аминокислотной группы генерируется молекула АТФ, которая затем используется практически во всех процессах идущих с затратой энергии. Аминокислотная же высвобождается от аминокислоты в виде свободного аммиака, могущего использоваться в клетках как источник образования азотсодержащих компонентов. Некоторые организмы могут катализировать эту реакцию в *обратном направлении* с участием тех же дегидрогеназ аминокислот. Когда концентрация аммиака поднимается на необходимого уровня, эти ферменты катализировать включение свободного аммиака в углеводородные скелеты аминокислот, что ведет к образованию новых аминокислот [149].

Несмотря на максимально полное представление в данной работе механизмов окисления-восстановления, остается все еще много интересного в работе I класса ферментов, в молекулярных механизмах работы активного центра оксидо-редуктаз и в их регулировании. В заключение хочется сказать только, что сколько бы человек ни старался постичь великолепие и разнообразие созданного Творцом мира, человеческий разум не в силах постичь всей глубины процесса, а только лишь старается понять его целесообразность. По этой причине ученые всегда будут стараться глубже постичь процессы окисления-восстановления в живых системах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дворецкий И. Х. Древнегреческо-русский словарь //М.: Государственное издательство иностранных и национальных словарей. - 1958. – 1043 с.
2. Nealsen K., Conrad P. Life: past, present and future //Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1999. – V. 354. – №. 1392. – P. 1923—1939.
3. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия мышечной деятельности // Олимпийская литература. – 2000. – 504 с.
4. İslamzade F. İ., İslamzade F. Q., Efendiyev A.M. İnsan biokimyasının esasları // Mülîm. – 2015. – 600 S.
5. Фишман Р. Обнаружены эукариоты без митохондрий //Наука, 2016. – №. 2. – <https://nplus1.ru/news/2016/05/13/nomytochon>.
6. Даниэльс Ф., Олберти Р. Физическая химия, под ред. К. В. Топчиевой // М.: Мир. - 1978. – 646 с.
7. Azizova G.I., Dadasheva A.R., Amirova M.F., Vahabova G. X. Biochemical laboratory classes //Tebib/- 2019. – XXp
8. Robert J.O., Rawn J.Organic Chemistry: Structure, Mechanism, Synthesis //Elsevier. - 2014.- 1240p.
9. Wang G., Zhou M., Goettel J.T., Schrobilgen G.J., Su J., Li J., Schlöder T., Riedel S. Identification of an iridium-containing compound with a formal oxidation state of IX //Nature. – 2014. – V. 514. – P. 475–477.
10. Таганович А.Д. Биологическая химия / Минск: Вышэйшая школа, 2013. - 672 с.
11. Кузьмичева Л.В., Борченко Р.В. и др. Биологическая химия // Саранск, 2010. – 154 с.
12. Тихонов Г. П. Основы биохимии //Москва: Альтаир|МГАВТ. - 2014. – 184 С.
13. Строев Е.А. Биологическая химия; Учебник для фармац. ин-тов и фармац. фак. мед. ин-тов // М.: Высш. шк. - 1986. – 479 с.

14. Королев А.П., Гридина С.Б., Скворцова Р.И. Основы биохимии // Кемерово. - 2002 – 118 с.
15. Нельсон, Дэвид Л. Основы биохимии Ленинджера; пер. с англ. Т. П. Мосоловой, Е. М. Молочкиной, В. В. Белова; под ред. А. А. Богданова, С. Н. Кочеткова // Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. - 2012. - 694 с.
16. Porter R. K., Brand M. D. Mitochondrial proton conductance and H⁺/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes //The Biochemical journal. – 1995. – V. 31. – №. 2. – P. 379—382.
17. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. пер. с англ. В. В. Борисова, Е. В. Дайниченко под ред. Гиномана //Москва: Мир.– 2004. – 381 с.
18. Плакунов В. К., Николаев Ю.А. Основы динамической биохимии // Москва: Логос. – 2010. – 216 С.
19. Goldstein Sara, Meyerstein Dan, and Czapski Gido №. The Fenton reagents //Free Radical Biology and Medicine – 1993. – V.15. – №. 4. – P. 435–445.
20. Fenton H. J. Oxidation of tartaric acid in presence of iron // Journal of the Chemical Society. - 1894. – V. 65. - №. 65. – P. 899-911.
21. Sen Ch. K. The general case for redox control of wound repair //Wound Repair Rege№. – 2003. – V. 11. – №. 6. – P. 431-438.
22. Guzik T.J., Korbout R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation //Journal of Physiology and Pharmacology. – 2003. - V. 54. – №. 4. – P. 469—487.
23. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло //Природа. – 1997. - №. 11. – С. 26-35.
24. Skulachev V. P. Anion Carriers in Fatty Acid-Mediated Physiological Uncoupling //Journal of Bioenergetics and Biomembranes. - 1999. – V. 31. – P.431–445.
25. В Н Bielski, R L Arudi, M W Sutherland A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids //J. Biol. Chem. – 1983. – V. 258. - №. 8. – P. 4759-4761.

26. Liskow D.H., Schaefer H.F., Bender Ch.F. Geometry and electronic structure of the hydroperoxyl Radical // *Journal of the American Chemical Society*. - 1971. - V. 93. - №. 25. - P. 6734–6737.
27. De G., Aubrey D.N. $\text{HO}_2\cdot$: The Forgotten Radical // *DNA and Cell Biology*. - 2002. - V. 21. - № 4. - P. 251–257.
28. Bielski B.H., Cabelli D.E., Arudi R.L., Ross A.B. Reactivity of HO_2/O_2^- Radicals in Aqueous Solution // *Journal of Physical and Chemical Reference*. - 1985. - V. 14. - № 4. - P. 1041–1100.
29. Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T., Zahler S., Riexinger T., Schiele T.M., Becker B.F., Theisen K., Klauss V., Pohl U. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment // *Blood*. - 2000. - V.100. - №.3. - P. 917–924.
30. Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview // *Current pharmaceutical design*. - 2004. - V.10. - №. 14. - P. 1677– 1694.
31. Блюхтерова Н.В., Жижина Г.П. Антиоксиданты и прооксиданты: взаимосвязь эндогенных процессов окисления и неферментативного метилирования ДНК // *Клиническая геронтология*. - 1999. - №. 3. - С.30–35.
32. Muller F. L., Song W., Liu Y., Chaudhuri A., Pieke-Dahl S., Strong R., Huang T. T., Epstein C. J., Roberts L. J., Csete M., Faulkner J. A., Van Remmen H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy // *Free Radic. Biol. Med.* - 2006. - V. 40. - №.11. - P.1993–2004.
33. Elchuri S., Oberley T. D., Qi W., Eisenstein R. S., Jackson Roberts L., Van Remmen H., Epstein C. J., Huang T. T. Cu Zn SOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life // *Oncogene*. - 2005. - V. 24. - №. 3. - P. 367–380.
34. Campana F. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. - 2004. - V.8. - №. 1. - P. 109– 116.

35. Бабак О. Я. Глутатион в норме и при патологии: биологическая роль и возможности клинического применения //Здоров'я України. - 2015. - № 1. - С. 22-23.
36. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация //Киев: Наукова думка. - 1991. – 256 с.
37. Сорокина И.В., Крысин А.П., Хлебникова Т.Б., Кобрин В.С., Попова Л.Н. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению: Аналит. обзор //Новосиб. ин-т орган. химии. - 1997. - 68 с.
38. Brigelius-Flohe R., Traber, M. G. Vitamin E: function and metabolism // FASEB J. – 1999. – V. 13. – P. 1145–1155.
39. Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях //Социальная и клиническая психиатрия. - 2016. – Т. 26. - № 3. – С. 91-96.
40. Чупахина Г.Н. Система аскорбиновой кислоты растений: Монография // Калининград. ун-т. - 1997. - 120 с.
41. Aruoma O.I., Laughton M.J., Halliwell B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? // The Biochemical Journal. – 1989. – V. 264. – №. 3. – P. 863– 869.
42. Lambert L. A., Perri H., Halbrooks P. J., Mason A. B. Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding //Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. – 2005. – V. 142. – №.2. – P. 129– 141.
43. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии; пер. с англ. Т. П. Мосоловой и Е. Ю. Бозелек-Решетняк ; под ред. А. В. Левашова, В. И. Тишкова //Москва: Бином. Лаборатория знаний. - 2013. - 848 с.
44. Кишкун А. А., Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований //М. Медицина. – 2006. – 544 С.
45. Beeley J. A. Glucose and sugar //British Dental Journal 2011. - V. 211. – P. 446–447.

46. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions //Physiol Rev. – 1983. - V. 63. – №. 4. – P. 1420-1480.
47. Olson S., Song B. J., Huh T. L., Chi Y. T., Veech R. L., McBride O. W. Three genes for enzymes of the pyruvate dehydrogenase complex map to human chromosomes 3, 7, and X //American journal of human genetics. – 1990. – V. 46. – №. 2. – P. 340–349.
48. Gray L. R., Tompkins S. C., Taylor E. B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease //Cell Mol Life Sci. – 2014. – V. 71. – №. 14. – P. 2577–2604.
49. David E. M. Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. – 2nd edition // Academic Press. - 2003. – V. 2. – 1973p.
50. Нерусов А. И., Котова И. Б. Микробиология//М.: Академия. - 2012. – 384 с.
51. Barnerias C., Saudubray J.-M., Touati G., De Lonlay P., Dulac O., Ponsot G., Marsac C., Brivet M., Desguerre I. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: four neurological phenotypes with differing pathogenesis //Dev. Med. Child Neurol. – 2010. – V. 52. - №. 2. - P. e1-9.
52. Leroy F. A Century of Nobel Prize Recipients: Chemistry, Physics, and Medicine. 1st Edition//CRC Press. - 2003. – 300 p.
53. Zhang X. V., Scot T., Driving M. Parts of Krebs Cycle in Reverse through Mineral Photochemistry //J. Am. Chem. Soc. – 2006. – V. 128. – №. 50. - P. 16032–16033.
54. Evans M.C., Buchanan B.B., Arnon D.I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1966. - V. 55. – №. 4 – P. 928–934.
55. Siebers B., Tjaden B., Michalke K., Dörr C., Ahmed H., Zaparty M., Gordon P., Sensen C. W., Zibat A., Klenk H. P., Schuster S. C., Hensel R. Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data. //Journal of bacteriology. – 2004. – V. 186. – №.. 7. – P. 2179–2194.

56. Buchanan B. B., Arnon D. I. A reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last. // Photosynthesis research. – 1990. – V. 24. – P. 47– 53.
57. Ефетов К.А., Паршкова Е. В. Цикл Кребса и мнемоническое правило для запоминания последовательности его реакций //Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15. - № 1.– С. 338-340.
58. Rustin P., Bourgeron T., Parfait B., Chretien D., Munnich A., Rotig A. Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human // Biochimica et Biophysica Acta.- Molecular Basis of Disease. – 1997. – V. 1361. - № 2. – P. 185– 197.
59. Башарина О. В., Артюхов В. Г., Коробкина И. А., Спахова Я. Г Исследование активности митохондриальных ферментов лимфоцитов здоровых доноров и больных острым панкреатитом в условиях уфоблучения //Вестник ВГУ. -2018. - № 2. – С. 75-80.
60. KaufmanS., KorkesS., Del Campillo A. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. V Further studies of the "malic" enzyme of *Lactobacillus arabinosus* //J. Biol. Chem. – 1951. – V. 192. – P. 301– 312.
61. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. Пер. с англ. //М.: Мир. - 1997. – 624 с.
62. Н. Л. Векшин. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров //Пушино: Фотон-век. - 2008. - 168 с.
63. Кареева А. В. Генерация перекиси водорода митохондриями: роль дигидролипоилдегидрогеназы. дис. на соиск.уч.ст. канд. биол. н.// М. Медицина. - 2017. – 129с.
64. Уиллет Э. Генетика без тайн //М.: Эксмо. - 2008г. - 224 с.
65. von der Malsburg K., Müller J.M., Bohnert M., Oeljeklaus S., Kwiatkowska P., Becker T., Loniewska-Lwowska A., Wiese S., Rao S., Milenkovic D., Hutu D.P., Zerbes R.M., Schulze-Specking A., Meyer H.E., Martinou J.C., Rospert S., Rehling P., Meisinger C., Veenhuis M., Warscheid B., van der Klei I.J., Pfanner N., Chacinska A., van der Laan M. Dual role of mitofilin in

- mitochondrial membrane organization and protein biogenesis //Developmental cell – 2011. – V. 21. – №. 4. – P. 694– 707.
66. Nijman V., Aliabadian M. DNA barcoding as a tool for elucidating species delineation in wide-ranging species as illustrated by owls (Tytonidae and Strigidae) //Zoological science. – 2013. – V. 30. – №. 11. – P. 1005– 1009.
67. Ortiz A., Killian J.A., Verkleij A.J., Wilschut J. Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations //Biophys J. - 1999. – V. 77. – №. 4. – P. 2003–2014.
68. Boyer P. D., Cross R. L., Momsen W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1973. – V.70. – №. 10. – P. 2837– 2839.
69. Селезнева И. С., Иванцова М. Н. Биохимические изменения при занятиях физкультурой и спортом. Учебное пособие // Екатеринбург: издательство уральского университета. - 2019. – 162с.
70. Шульц М.М., Писаревский А.М., Полозова И.П. Окислительный потенциал. Теория и практика // Л.: Химия. - 1984. – 160 с.
71. Бацанов С. С. Структурная химия. Факты и зависимости // М: Диалог-МГУ. - 2000. – 292 С.
72. Квасников. И. А. Термодинамика и статистическая физика. Теория равновесных систем, том. 1. (2-е изд., испр. и доп.). //М.: МГУ. - 2002. - 240 с.
73. Osara J.; Bryant M.A Thermodynamic Model for Lithium-Ion Battery Degradation: Application of the Degradation-Entropy Generation Theorem //Inventions.- 2019. – V. 4. - № 2. -p. 23.
74. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.Ф. Электрохимия //Лань. – 2015. – 672с.
75. Огурцов А.Н. Молекулярная биоэнергетика клетки // Харьков: ХПИ. – 2009. – 112 с.

76. Гельфанд Б. Е., Попов О. Е., Чайванов Б. Б. Водород: параметры горения и взрыва //М.: Физматлит. - 2008. – 288 С.
77. VoetD., Voet J. G. Biochemistry //Wiley. - 2010. - 1520 p.
- 78.Sazanov L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2015. – V. 16. - №. 6. – С. 375– 388.
79. Efremov R. G., Sazanov L.A. The coupling mechanism of respiratory complex I – A structural and evolutionary perspective //Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics. – 2012. – V. 1817. - №. 10. – P. 1785– 1795.
80. Brandt U. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I) // Annual Review of Biochemistry. – 2006. – V. 75. - №. 1. – P. 69– 92.
81. Grivennikova V. G., Kotlyar A.B., Karliner J.S., Cecchini G., Vinogradov A.D. Redox-dependent change of nucleotide affinity to the active site of the mammalian complex I //Biochemistry. – 2007. – V. 46. - №. 38. – P. 10971– 10978.
82. Moretti C., Grenand P. The "nivrées", or ichthyotoxic plants of French Guyana //J. Ethnopharmacol.. – 1988. – T. 6, № 2. – С. 139– 160.
83. Watabe M., Nakaki T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells // Molecular Pharmacology. – 2008. – V. 74. – №. 4. – P. 933– 940.
- 84.Гетше П. Смертельно опасные лекарства и организованная преступность: Как большая фарма коррумпировала здравоохранение [Пер. с англ. Л. Е. Зиганшиной] // Москва: «Э». - 2016. – 464 С.
85. Zharova T.V., Vinogradov A.D. A competitive inhibition of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by ADP-ribose // Biochimica et Biophysica Acta . – 1997. – V. 1320. – №. 3. – P. 256– 264.
86. Viollet B., Guigas B., Sanz G.N., Leclerc J., Foretz M., Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an

- overview //Clinical Science (London) . – 2012. – V. 122. – №. 6. – P. 253– 270.
87. Nakamaru-Ogiso E., Han H., Matsuno-Yagi A., Keinan E., Sinha S.C., Yagi T., Ohnishi T. The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor. // FEBS Letters. – 2010. – V. 584. – №. 5. – P. 883– 888.
88. Degli Esposti M., Ghelli A., Ratta M., Cortes D., Estornell E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I) //The Biochemical Journal. – 1994. – V. 301. – №. 1. - P. 161– 167.
89. Dubos T., Pasquali M., Pogoda F., Casanova A., Hoffmann L. Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive *Zymoseptoria tritici* and insensitive *Fusarium graminearum* strains //Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2013. - V. 105. – №. 1. – P. 28– 35.
90. Ермаков И. П. Физиология растений //М.: Академия. - 2005. – 634 с.
91. Iverson T.M. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective //Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. – 2013. - V. 1827. - №. 5. – P. 648– 657.
92. Muller F. L., Liu Y., Abdul-Ghani M. A., Lustgarten M. S., Bhattacharya A. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates //The Biochemical Journal. – 2008. – V. 409. – №. 2. – P. 491– 499.
93. Avenot H. F., Michailides T.J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi //Crop Protection. – 2010. - V. 29. - №. 7. – P. 643– 651.
94. Ohkawa H., Miyagawa H., Lee P.W. Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety //Wiley. - 2007. - 538 P.
95. Nicholls D.G., Ferguson S.J. Bioenergetics // Academic Press. – 2002. – 288p.

96. Holmes J. H., Sapeika N., Zwarenstein H. Inhibitory effect of anti-obesity drugs on NADH dehydrogenase of mouse heart homogenates //Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology. – 1975. – V. 11. – №. 4. – P. 645– 646.
97. Gorbikova E. A., Belevich I., Wikström M., Verkhovsky M.I. The proton donor for O O bond scission by cytochrome c oxidase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – V.105. – №. 31. – P. 10733– 10737.
98. Maréchal A., Meunier B., Lee D., Orengo Ch., Richa P.R. Yeast cytochrome c oxidase: A model system to study mitochondrial forms of the haem-copper oxidase superfamily //Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics . – 2012. – V. 1817. – №. 4. – P. 620– 628.
99. Soto I. C., Fontanesib F., Liua J., Barrientosa A. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core //Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics – 2012. – V. 1817. – №. 6. – P. 883– 897.
100. Konstantinov A.A. Cytochrome c oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion //FEBS letters. - 2012. – V. 586. - №. 5. – P. 630– 639.
101. Pecina P., Houstková H., Hansíková H., Zeman J., Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly //Physiol. Res. – 2004. – V. 53 – №. 1. – P. S213– 223.
102. Sharma V., Enkavi G., Vattulainen I., Róg T., Wikström M. Proton-coupled electron transfer and the role of water molecules in proton pumping by cytochrome c oxidase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – V.112. – №. 7. – P. 2040– 2045.
103. Fadda E., Yu Ch.-H., Pomès R. Electrostatic control of proton pumping in cytochrome c oxidase // Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. – V. 177. – №. 3. – P. 277– 284.
104. Alonso J.-R., Cardellach F., López S., Casademont J., Miró O. Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain //Pharmacology and Toxicology. – 2003. – T. 93. – №. 3. – C. 142– 146.

105. Cooper Ch. E., Brown G. C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2008. – V. 40. – №. 5. – P. 533 – 539.
106. Mitchell P., Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation // *Nature*. – 1967. – V. 213. – №. 5072. – P. 137– 139.
107. KinositaK., YasudaJr. R., NojiH., AdachiK. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 2000. – V. 355. – №.1396. – P. 473– 489.
108. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики // *Соросовский образовательный журнал*. – 1997. - №. 1. – С. 9-14.
109. Mitchell P. Aspects of the chemiosmotic hypothesis // *Biochem J.* - 1970. – V. 116. – №. 4. – P. 5P–6P.
110. Sharma V., Enkavi G., Vattulainen I., Róg T., Wikström M. Proton-coupled electron transfer and the role of water molecules in proton pumping by cytochrome c oxidase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2015-02-17. – V.112. - №. 7. – P. 2040– 2045.
111. Князева Т.В. Регуляторы роста растений в Краснодарском крае: монография // Краснодар: ЭДВИ. - 2013.- 128 с.
112. Griffiths E.J., Rutter G. A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1787. – №. 11. – P. 1324-1333.
113. Green D.R. Early work on the role of mitochondria, an interview with Doug Green // *Cell Death & Differentiation*. – 2004. – V. 11. – S119–S121.
114. АлбертсБ. Молекулярная биология клетки // Москва: Мир. – 1994. – 521 с.
115. Александр В.П. Функциональнаябиоэнергетика // Новосибирск: ин-т Молекулярной Биологии и Биофизики. - 2017. – 323 С.

116. Gresser M.J., Myers J.A., Boyer P.D. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model //J. Biol. Chem. – 1982. – V. 257. – №. 20. – P. 12030– 12038.
117. Nelson J.R. et al. Evidence for a second function for *Saccharomyces cerevisiae* // Mol Microbiol. – 2000. – V. 37. – №. 3. – P.549-554.
118. JoshiS., Javed A.A., Gibbs L.C.Oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) of mitochondrial ATP synthase. The carboxyl-terminal region of OSCP is essential for the reconstitution of oligomycin-sensitive H(+)-ATPase //J Biol Chem. - 1992. – V. 267. – №. 18. – P. 12860-12867.
119. Trumpower B. L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex //The Journal of biological chemistry. – 1990. – V. 265. – №.. 20. – P. 11409– 11412.
120. Efendiyev A.M., Eyyubova A.E., Qarayev A.N.Patoloji ve klinik biokimya // Muellim. – 2007. – 382c.
121. VidalL.S., Kelly C.L., Mordaka P.M., Heap J.T. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application// Biochimica et Biophysica Acta. – 2018. – V.1866, - № 2, - P. 327-347.
122. Iverson T.M. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective //Biochimica et Biophysica Acta. - Bioenergetics. – 2013. - V. 1827. – №. 5. – P. 648– 657.
123. Коневалова Н.Ю. Биохимия : пособие // Витебск: ВГМУ. - 2012. - 690 с.
124. Кольман Я., РемК. Наглядная биохимия //М.:Бином. – 2004. – 473 с.
125. Корнелюк А.И.Белковая инженерия // Биополимеры и клетина. – 2001. – Т. 17. – № 6. – с.459-466.
126. Frey P.A., Hegeman A.D.Enzymatic Reaction Mechanisms // Oxford University Press. – 2007. – 848 p.

127. Luccio E.D., Elling R.A., Wilson D.K. Identification of a novel NADH-specific aldo-keto reductase using sequence and structural homologies // Biochemical Journal. – 2006. – V. 400. – №.1. – P.105-114.
128. Baker P.J., Britton K.L, Fisher M., Esclapez J., Pire C., Bonete M.J., Ferrer J., Rice D.W. Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – V. 106. – №. 3. – P. 779-784.
129. Ma K., Adams M.W. An unusual oxygen-sensitive, iron-and zinc-containing alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // Journal of bacteriology. – 1999. - V.181. –№.4. - P.1163-1170.
130. Liu X., Dong Y., Zhang J., Zhang A. Two novel metal-independent long-chain alkyl alcohol dehydrogenases from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 // Microbiology. - 2009. – V. 155. – №.6. – P. 2078-2085.
131. Kavanagh K.L., Klimacek M., Nidetzky B., Wilson D.K. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes - Specificity and catalytic mechanism // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V.277. – №.45. – P.43433-43442.
132. Jensen Ch.N., Cartwright J., Ward J., Hart S., Turkenburg J.P., Ali S. T., Allen M.J., Grogan G. A Flavoprotein Monooxygenase that Catalyses a Baeyer–Villiger Reaction and Thioether Oxidation Using NADH as the Nicotinamide Cofactor // ChemBioChem2012. –V.13. – №.6. – P. 872-878.
133. Montella C., Bellolell L., Pérez-Luque R., Badia J. Crystal Structure of an Iron-Dependent Group III Dehydrogenase That Interconverts L-Lactaldehyde and L-1,2-Propanediol in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 2005. –V. 187. – №. 14. - P.4957-4966.
134. Moon J., Lee H., Park S., Song J., Park M., Park H., Sun J., Park J., Kim B.Y., Kim J-S. Structures of iron-dependent alcohol dehydrogenase 2 from *Zymomonas mobilis* ZM4 with

- and without NAD⁺ cofactor //J Mol Biol. 2011. – V.407. – №.3. –P.413-424.
135. Cabiscol E., Aguilar J., Ros J. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*//J Biol Chem. – 1994. – V.269. - №.9. – P.6592-6597.
136. Tamarit J., Cabiscol E., Aguilar J., Ros J. Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen //J Bacteriol. 1997. – V.179. – №.4. – P.1102 – 1104.
137. Zhang L, Ahvazi B., Szittner R., Vrielink A., Meighen E. A histidine residue in the catalytic mechanism distinguishes *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase from other members of the aldehyde dehydrogenase superfamily //Biochemistry. – 2000. – V.39. –№.47. – P.14409-14418.
138. Hempel J., Kuo I., Perozich J., Wang B.C., Lindahl R., Nicholas H. Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme //Eur. J. Biochem. – 2001. V.268. №.3. –P.722-726.
139. Marchitti S.A., Brocker Ch., Stagos D., Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily //Expert Opin Drug Metabolism Toxicology. -2008. – V.4. №.6. – P.697-720.
140. Membrillo-Hernandez J, Echave P., Cabiscol E., Tamarit J., Ros J., Lin E.C. Evolution of the adhE gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins //J. Biol. Chemistry. – 2000. – V.275. – №.43. - P.33869-33875.
141. Lo J., Zheng T., Hon S., Olson D.G., Lynd L.R. The Bifunctional Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Gene, adhE, Is Necessary for Ethanol Production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*//Journal of Bacteriology. – 2015. – V.15. – №.7. – P. 1386- 1393.
142. Liu R., Zhu F., Lu L., Fu A., Lu J., Deng Z., Liu T. Metabolic engineering of fatty acyl-ACP reductase-dependent pathway to

- improve fatty alcohol production in *Escherichia coli* //Metabolic engineering. - 2014. - V.22. – P.10-21.
143. Winkler C.K., Tasnádi G., Clay D., Hall M., Faber K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds //Journal of Biotechnology. – 2012. - V. 162. – №.4. – P. 381-389.
144. Williams R.E., Bruce N.C. "New uses for an Old Enzyme" - the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes //Microbiology. – 2002. -V.148. - №. 6. – P.1607-1614.
145. Boonstra B., Rathbone D.A., Bruce N.C. Engineering novel biocatalytic routes for production of semisynthetic opiate drugs //Biomolecular Engineering. – 2001. – V.18. №.2. – P.41-47.
146. Stillman T.J., Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W. Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis //Journal of Molecular Biology. -1993. . – V.234. –№.4. - P.1131-1139.
147. Baker P.J., Waugh M.L., Wang X. G., Stillman T.J., Turnbull A.P., Paul C. Engel, David W. Rice Determinants of Substrate Specificity in the Superfamily of Amino Acid Dehydrogenases // Biochemistry. – 1997. – V. 36. - №.51. - P.16109–16115.
148. Queener S.F., Cody V., Pace J., Torkelson P., Gangjee A. Trimethoprim resistance of dihydrofolate reductase variants from clinical isolates of *Pneumocystis jirovecii* // Antimicrobial Agents in Chemotherapy. – 2013. –V.57. №.10. – P. 4990-4998.
149. Brunhuber N.M., Blanchard J.S. The biochemistry and enzymology of amino acid dehydrogenases//Crit Rev Biochem Mol Biol. – 1994. – V. 29. – №.6. - P.415-467.

М.Ф. Амирова

**ВСЕ О БИОЛОГИЧЕСКОМ
ОКИСЛЕНИИ:
ОТ «а» ДО «я»**

Учебное пособие

Подписанно к печати: 19.08.2021.

Формат: 60x84 1/16. Физ.печ.лист:10.

Заказ: 094/21. Тираж: 500.

Отпечатано с предоставленных диапозитивов в
типографии «Шафа Полиграф».

