

Биоенергетика

Цели

Цели на преподавателя:

1. Да се разгледат биологичното окисление и спрегнатото с него окислително фосфорилиране, чрез които енергията на химични връзки в различни вещества се освобождава и акумулира в макроергични съединения, за да се използва за осигуряване на жизнените процеси;
2. Да се опише свободното окисление, ролята му за топлопродукция, за детоксикация и в метаболизма, както и получаването и обезвреждането на реактивни производни на кислорода;
3. Да се дадат примери за ползата от тези познания за клиничната практика.

След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:

A. Знания

1. Да дефинират понятието макроергични съединения и да дадат примери за различни видове макроергични съединения;
2. Да знаят що е биологично окисление и какви видове има;
3. Да дават примери за субстрати на биологичното окисление и за крайни акцептори на редуциращи еквиваленти;
4. Да дефинират понятията оксидо-редукция, редокс-системи и да изброят редокс-системите с биологично значение;
5. Да дадат определение за окислително фосфорилиране на субстратно ниво и в дихателната верига;
6. Да дадат определение за оксидо-редоксази;
7. Да опишат особеностите на дехидрогенази, оксидази, оксигенази и хидроксипероксидази и дадат пример за реакция, катализирана от тях;
8. Да изброят редокс-системите с биологично значение и да посочат каква е тяхната роля
9. Да дадат примери за процеси на субстратно фосфорилиране;
10. Да опишат структурата и функциите на пируватдехидрогеназния комплекс;
11. Да дадат определение за дихателни вериги;
12. Да посочат компонентите на дихателната верига и принципа на подреждането им между субстрата и кислорода;
13. Да посочат значението и компонентите на електрон-пренасящите вериги в ендоплазмения ретикулум и да дадат примери за такива вериги;
14. Да посочат активните производни на кислород и начините за тяхното обезвреждане;
15. Да посочат значението на цитратния цикъл за катаболизма и анаболизма;

16. Да знаят кои витамини са необходими за протичане на цитратния цикъл;

17. Да посочат кои са анаплеротичните реакции за цитратния цикъл.

Б. Разбирания

1. Да разбират и обяснят особеностите на живите организми като отворени системи;

2. Да обяснят значението на системата АТФ/АДФ за енергийната обмяна в клетките;

3. Да обяснят действието и значението на ензима трансхидрогеназа;

4. Да разбират и обяснят разликата между анаеробни и аеробни дехидрогенази;

5. Да посочат приликите и разликите между НАД и НАДФ и да обяснят биологичната им роля;

6. Да обяснят ролята на окислителното фосфорилиране на глицералдеhid-3-фосфат;

7. Да обяснят ролята на енолазната реакция;

8. Да обяснят ролята на окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселините пируват и α -кетоглутарат;

9. Да обяснят ролята на витамините В₁, В₂, РР и пантотенова киселина за окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселините;

10. Да обяснят механизма на топлопродукцията и ролята на термогенин;

11. Да представят метаболитната и енергийна равностетка при разграждане на една молекула ацетил-КоА в цитратния цикъл;

12. Да обяснят значението на анаплеротичните реакции за цитратния цикъл.

В. Умения

1. Да свържат предишни познания върху нуклеотиди и кофактори с новите познания върху биологични редокс-системи, за да представят с формули как протича редокс-процес между субстрат и редокс-системи като НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КоQ;

2. Да представят с формули молекулния механизъм на окислителното фосфорилиране на глицералдеhid-3-фосфат;

3. Да представят с формули молекулния механизъм на окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселините пируват и α -кетоглутарат;

4. Да демонстрират значението на експериментите с инхибитори на електронния транспорт за установяване подреждането на компонентите на дихателната верига;

5. Да прилагат хемиосмотическата хипотеза за механизма на окислителното фосфорилиране за да обяснят действието на разпрягащи агенти и инхибитори на окислителното фосфорилиране;

6. Да демонстрират ролята на НАДФН за обезвреждане на свободните радикали, производни на кислород;

7. Да представят с формули химизма на цитратния цикъл;
8. Да демонстрират връзките на цитратния цикъл с дихателните вериги;
9. Да демонстрират ролята на витамините за протичане на цитратния цикъл;
10. Да демонстрират регулацията на цитратния цикъл.

5.1 Особености на живите организми от термодинамична гледна точка

5.1.1 Резюме

Първият закон на термодинамиката (Енергията остава постоянна) и вторият закон (Спонтанните процеси увеличават безпорядъка във вселената) са приложими за биохимичните процеси.

От промяната в свободната енергия ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) може да се определи дали реакцията протича спонтанно.

Ако $\Delta G < 0$, реакцията е спонтанна и екзергонична. Ако $\Delta G \ll 0$, реакцията отива до край и е необратима. Реакции, близко до равновесието, са лесно обратими.

Ако $\Delta G > 0$, реакцията е ендергонична и протича само, ако в системата се внася енергия.

Ако $\Delta G = 0$, системата е в равновесие и не се извършва никаква промяна.

Промяната в стандартната свободна енергия за даден процес (ΔG°) може да се изчисли от неговата експериментално определяна равновесна константа.

За окислително-редукционни процеси ΔG° се изчислява от разликата в нормалните редокс-потенциали на реагиращите вещества ($\Delta G^{\circ} = -nF \Delta E^{\circ}$).

Живите организми са отворени системи. Затова при тях има важни особености:

- 1) Поради непрекъснато извличане на продуктите на реакциите в следващи реакции не се достига до термодинамично равновесие, а се установява стационарно състояние, при което се отделя енергия и може да се извършва работа.
- 2) Като източник на енергия те могат да ползват само химичната енергия, отделяна при окислителни екзергонични катаболитни процеси. Топлинната енергия не може да бъде използвана.
- 3) Ендергонични процеси в организмите протичат за сметка на енергия, отделена при екзергоничните процеси и съхранена в макроергични връзки. Т.е. спрягането между екзергоничните и ендергоничните процеси става чрез макроергични съединения.

Макроергични връзки са тези, при чието хидролитно разграждане ΔG° е най-малко 30 kJ/mol до 70 kJ/mol. При хидролитно разграждане на нормоергични връзки ΔG° е от 8 до 21 kJ/mol.

Адениловата система (АТФ/АДФ) е най-често използваният посредник между екзергоничните и ендергонични процеси. Синтезата на АТФ от АДФ и неорганичен фосфат за сметка на енергия от окислителен процес се означава като окислително фосфорилиране. Разграждането на АТФ до АДФ и Ф или до АМФ и пирофосфат осигурява с енергия различни ендергонични процеси (активиране на субстрати, биосинтези, мускулно съкращение, осмотична работа и пр.)

Макроергичните връзки в АТФ и АДФ са пирофосфатни.

Други видове макроергични съединения, предшественици на АТФ, са метаболити от важни обменни пътища: фосфоенолпируват и 1,3-бисфосфоглицерат от гликолиза, различни ацил-КоА - метаболити от разграждане на мастни киселини, креатин фосфат - резервно

макроергично съединение в мускулите и др.

АТФ не е най-богатото на енергия макроергично съединение. ΔG° при хидролиза на АТФ има междинна стойност спрямо другите макроергични и нормоергични съединения. Тази междинна стойност определя централната роля на адениловата система в енергетичната обмяна. Тя позволява на АДФ да поема енергия от други макроергични съединения, предшественици на АТФ, а полученият АТФ да отдава енергията на различни нормоергични съединения, за да ги активира.

5.1.2 Общи закони на термодинамиката (кратък преговор)

Всеки жизнен процес е съпътстван от енергетични трансформации. Биоенергетиката, или биохимичната термодинамика, е тази част от биохимията, която изучава енергетичните промени, придружаващи биохимичните реакции.

Живите организми се подчиняват на общите закони на термодинамиката, но тъй като са отворени системи, при тях има важни особености.

Първият общ закон за запазване на енергията гласи, че при всяка физична или химична промяна общата енергия на системата и обкръжаващата я среда остава постоянна.

Вторият общ закон гласи, че Вселената се стреми към безпорядък.

От тези закони произтичат важни следствия:

- 1) Химичните процеси се провеждат в посока към равновесието и се преустановяват, когато то е достигнато.
- 2) Всички реални процеси протичат с увеличение на ентропията.

За затворени системи е в сила равенството:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5.2.1)$$

или в условията на биохимичните реакции:

$$\Delta G = \Delta E - T \Delta S \quad (5.2.2)$$

където

ΔG - промяна в свободната енергия, т.е тази част от общата енергетична промяна в системата, която се използва за полезна работа;

ΔH - промяна в енталпията (топлинното съдържание);

ΔE - тотална промяна във вътрешната енергия на реакцията;

ΔS - промяна в ентропията;

Изчисляване на ΔG :

1) За общата реакция

$$aA + bB \rightarrow cC + dD \quad \Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln [C]^c [D]^d / [A]^a [B]^b \quad (5.2.3)$$

В равновесието $\Delta G = 0$ и $\Delta G^{\circ} = - RT \ln K_{eq}$ (5.2.4)

$$\Delta G^{\circ} = - 2.303 RT \log K'_{eq} \quad (5.2.5)$$

2) За окислително-редукционни реакции:

$$\Delta G^{\circ} = - n F \Delta E^{\circ} \quad (5.2.6)$$

където

ΔG° - промяна на стандартната свободна енергия

ΔG° - промяна на стандартна свободна енергия при 25°C и pH 7.0

K_{eq} - равновесна константа; K'_{eq} - равновесна константа при 25°C и pH 7.0

E° - нормален редокс потенциал (при pH 7.0); единици волти

n - брой на пренасяни електрони в редокс процес и

R - универсална газова константа: 1.99 cal/mole.K или 8.31 J/mole.K

F - Фарадеева константа: $F = 96500 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$

Съгласно (5.2.3) ако $\Delta G < 0$, **реакцията е екзергонична** - протича спонтанно с отделяне на енергия. Ако стойността на ΔG е висока, реакцията отива до край и е необратима.

Ако $\Delta G > 0$, **реакцията е ендергонична** - протича само, ако в системата се внесе енергия;

Ако $\Delta G = 0$, **системата е в равновесие** и не се извършва никаква промяна.

5.1.3 Използваема енергия и промени в ентропията

Източник на енергия за човека и животните е само химическата енергия, отделяна при разграждане на химични връзки на различни вещества (горива) в окислителни процеси в хода на катаболизма. Фотосинтезиращите организми ползват директно слънчева енергия. Топлинната енергия не може да се използва от живите организми за полезна работа.

При тях може да се извършва работа и да настъпват промени в свободната енергия, без да се увеличава ентропията. Тя може да остава постоянна или дори да намалява, за сметка на процеси, настъпващи в околната среда. Това не противоречи на втория термодинамичен закон, ако приемем организма и околната му среда за една обща затворена система.

5.1.4 Стационарно състояние, а не термодинамично равновесие

Химичните реакции в отворените системи рядко достигат до равновесно състояние. Те протичат постоянно еднопосочно. Равновесието не може да се достигне, защото продуктите на реакцията се извличат непрекъснато. Ако скоростите, с които протичат реакциите в една метаболитна верига, са еднакви, концентрациите на междинните метаболити остават постоянни за даден период от време - настъпва състояние на привидно равновесие, което се различава от термодинамичното и се означава като стационарно състояние. В това състояние при привидно равновесие, системата може постоянно да отделя свободна енергия, т.е. да извършва работа.

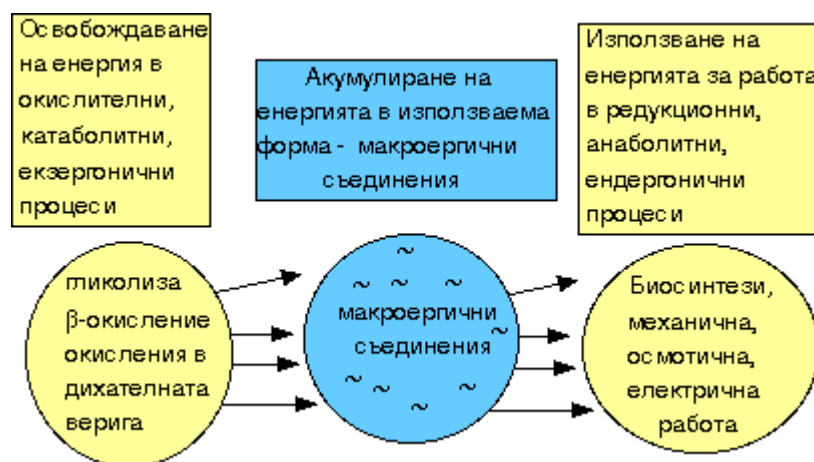
5.1.5 Спрягане на екзергонични и ендергонични реакции в организма

В организма се извършват два типа противоположни, но взаимозависими процеси (фиг. 5-1).

1) процеси, които доставят енергия - те са окислителни, катаболитни и екзергонични. Такива процеси са напр. гликолиза, β -окисление на мастни киселини и пр., окислението в дихателната верига и др. Усилват се при гладуване и стрес.

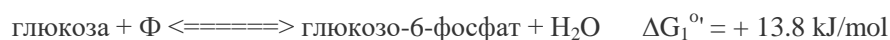
2) процеси, които се нуждаят от енергия - те са редукионни, анаболитни и ендергонични. Такива процеси са биосинтезите, мускулното съкращение, нервното възбуждение, осмотична работа, клетъчно деление и др. Усилват се, когато има акумулирана енергия, излишъци от субстрати и в периоди на растеж и регенерация на тъкани.

Обединяването или спрягането на тези два противоположни типа процеси става чрез макроергични (богати на енергия) вещества. В тях освободената при екзергоничните процеси енергия се акумулира в биологично използваема форма - в особени макроергични връзки (виж т. 5.1.6), чрез чиято енергия се осигуряват ендергоничните жизнени процеси.

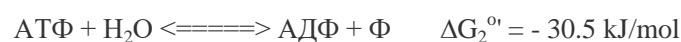


Фиг. 5-1. Спрягане на процесите, доставящи и консумиращи енергия чрез макроергични съединения (по Николов [1] с разрешение).

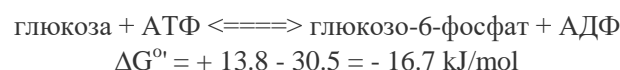
В живите организми едновременно или последователно протичане на ендергонична и екзергонична реакция с общ метаболит осигурява протичането на ендергоничната реакция. Например в реакцията



Тази реакция е ендергонична и не може да протече. Ако едновременно с нея се извърши екзергоничната реакция



то цялостната спрегната реакция ще бъде екзергонична:

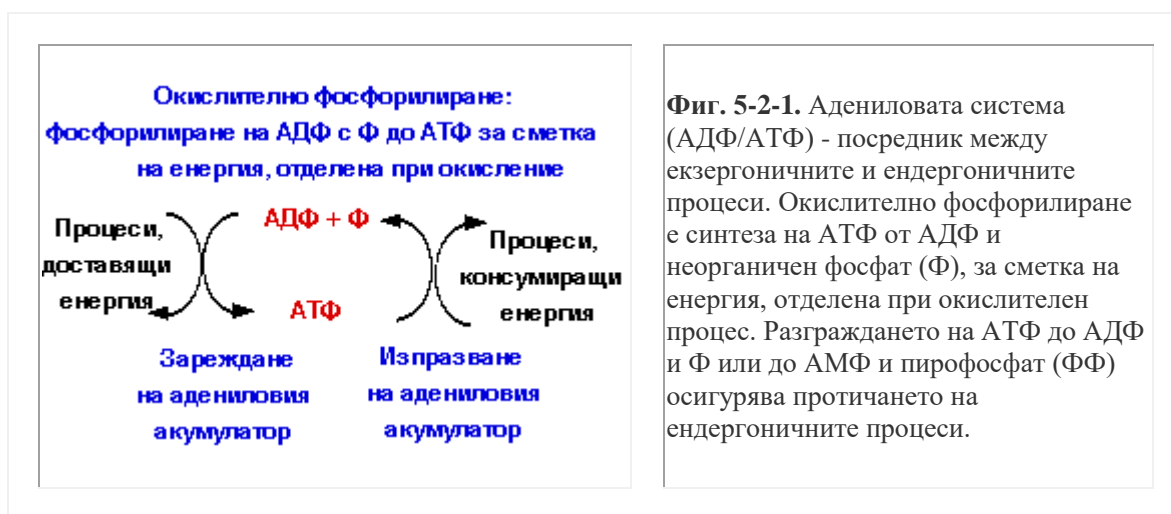


В отворени системи една ендергонична реакция може да протече, и ако продуктът се изтегля в следваща силно екзергонична реакция (виж напр. т. 5.3.4).

5.1.6 Макроергични съединения - определение, значение и видове

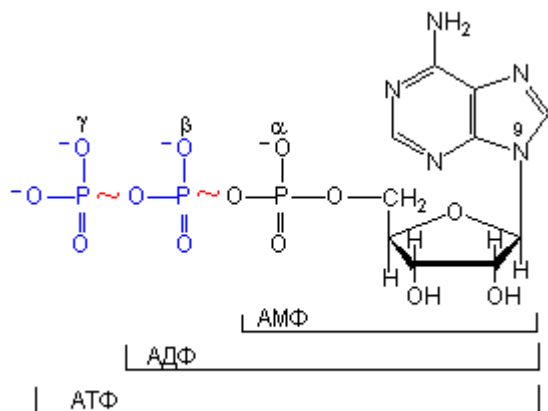
Макроергични връзки са тези, при чието хидролитно разграждане промяната на стандартната свободна енергия ΔG° е най-малко 30 kJ/mol (до 70 kJ/mol). При хидролитно разграждане на обикновени ковалентни връзки като естерни, гликозидни, пептидни (нормоергични връзки) ΔG° е от 8 до 21 kJ/mol. Макроергичните връзки се отбелязват със символа ~.

Макроергичните съединения се оприличават на акумулатор - способен да се зарежда с енергия от различни генератори, а от своя страна може да снабдява с енергия различни системи и процеси (фиг. 5-2-1). Ролята на такъв унифициран акумулатор се изпълнява най-вече от адениловата система АДФ/АТФ, позната от глава 3. Зареждането се състои в синтеза на АТФ от АДФ и Ф (или фосфорилиране на АДФ с Ф до АТФ) за сметка на енергия, отделена при окислителен процес. Затова този процес се нарича окислително фосфорилиране. Изпразването на акумулатора се състои в разграждане на АТФ до АДФ и Ф. В някои случаи АТФ се разгражда до АМФ и пирофосфат (ФФ) и това придава допълнителна гъвкавост на адениловата система в нейните функции на посредник между екзергоничните и ендергоничните процеси.



Макроергичните връзки в АТФ и АДФ са пирофосфатни (фиг. 5-2-2). В АТФ и в останалите нуклеозидтрифосфати има три фосфатни връзки: α , β и γ . Първата е обикновена естерна, а останалите две са макроергични (пирофосфатни). Най-често за работа се използва енергията на γ -връзката, и по-рядко тази на β -връзката. В АДФ и в останалите нуклеозиддифосфати има една макроергична пирофосфатна и една естерна връзка.

Фиг. 5-2-2. Пирофосфатни макроергични връзки в АТФ и АДФ.



Конкретни примери за други видове макроергични съединения са дадени в табл. 5-1. Посочена е ролята им в обмяната. Тук спадат фосфоенолпируват, 1,3-бисфосфоглицерат, креатин фосфат, различни ацил-КоА и други. Дадени са и стойностите на промяната в стандартната свободна енергия (ΔG°) при хидролиза на тези съединения.

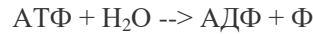
Табл. 5-1. Важни метаболити, съдържащи макроергични връзки*.

Макроергични съединения	Макроергична връзка	ΔG° kJ/mol	Роля в обмяната
Фосфоенолпируват $\text{CH}_2 = \underset{\text{O} \sim \Phi}{\text{C}} - \text{COO}^-$	енолфосфатна	- 61,9	метаболит от гликолиза и глюконеогенеза
1,3-бисфосфоглицерат $\Phi - \text{O} - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{COO}^- \sim \Phi$	ацилфосфатна	- 49,3	метаболит от гликолиза и глюконеогенеза
Креатинфосфат $\Phi \sim \text{NH} - \text{C} - \underset{\text{+NH}_2}{\text{N}} - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$	гуанидинфосфатна	- 43,0	резервно макроергично съединение в мускулите
Различни ацил-КоА, напр. ацетил-КоА $\text{CH}_3 - \text{CO} \sim \text{S} - \text{CoA}$	тиоестерна	- 31,4	метаболити от β -окисление и др.
нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфати напр. АТФ \rightarrow АМФ + Φ - Φ АТФ \rightarrow АДФ + Φ	пирофосфатна	- 32,2 - 30,5	активиране на огромен брой субстрати чрез фосфорилиране

*Стойностите за ΔG° са по Montgomery et al., 1996 [2], Harper et al., 1996 [3] и Lehninger et al., 1993 [4].

5.1.7 Хидролиза на АТФ при физиологични условия

При стандартни условия ΔG° за реакцията

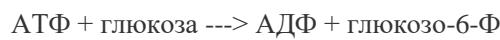


е - 30.5 KJ/mol (табл. 5-1). В живите клетки физиологичните концентрации на АТФ, АДФ и Ф не са 1 mol/L, а обикновено 5, 4 и 2.1 mmol/L, съответно. Концентрацията на водата при стандартни и физиологични условия се приема за единица в разредени разтвори.

Замествайки тези стойности в ур. 5.2.3, за ΔG се получава стойността - 42.7 KJ/mol, което е значително над стойността (-30.5 KJ/mol), изчислена при еквимоларни концентрации.

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{АДФ}] [\text{Ф}]}{[\text{АТФ}] [\text{H}_2\text{O}]} = \\ &= -30.5 + 1.98 (273+30) 2.303 \log \left[\frac{(4 \times 10^{-3}) (2.1 \times 10^{-3})}{5 \times 10^{-3}} \right] = \\ &= -42.7 \text{ KJ/mol} \end{aligned}$$

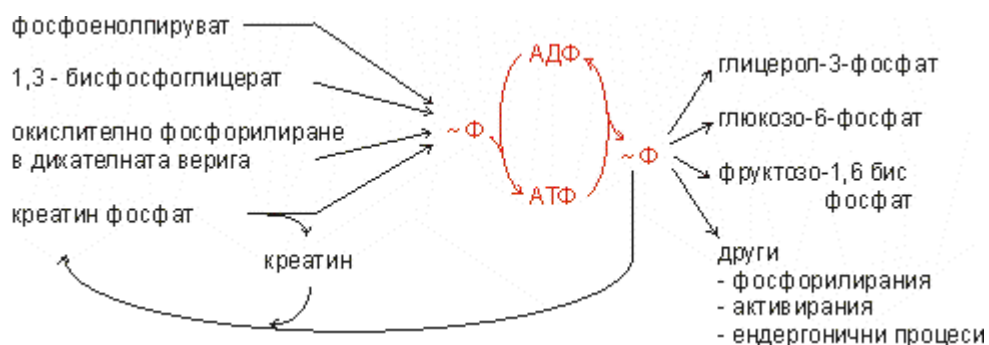
Фосфорната киселина се намира на различни енергетични нива в организма. Свободната фосфорна киселина е на нулево енергетично ниво. Естерно-свързаната фосфорна киселина е на нормално енергетично равнище (нормо-равнище). Изграждащата макроергични връзки фосфорна киселина е на високо енергетично равнище. При окислителното фосфорилиране фосфат се издига от нулево до високо равнище. При хидролиза на АТФ до АДФ и Ф фосфатната група преминава обратно от високо на нулево ниво. При активиране на субстрати, напр. в реакцията



фосфатната група се пренася от високо ниво на нормоергично ниво.

5.1.8 Централна роля на адениловата система за енергетичната обмяна в клетките

От табл. 5-1 в т. 5.1.6. се вижда, че АТФ не е най-богатото на енергия съединение - промяната в стандартната свободна енергия ΔG° при хидролиза е значително по-ниска от тази за други макроергични съединения. Но адениловата система има централна роля в биоенергетиката, именно поради междинната стойност за ΔG° спрямо другите макроергични съединения и нормоергичните съединения. Тази междинна стойност позволява АДФ да поема енергия от други макроергични съединения - предшественици на АТФ, а полученият АТФ да отдава енергия на различни нормоергични съединения, за да ги активира (фиг. 5-3). Креатин фосфат е резервно макроергично съединение в мускулите.



Фиг. 5-3. Централна роля на адениловата система АТФ/АДФ за енергетичната обмяна в клетките.

5.2 Биологично окисление

5.2.1 Резюме

В живите организми, както и в неживата природа, окислението (отделяне на електрони) винаги се съпътства от редукция (приемане на електрони). Редокspotенциалът, изразяван чрез уравнението на Нернст, е количествен израз на афинитета на веществата към електроните. При редокс-процеси електроните се придвижват от редокс-система с по-нисък редокс-потенциал към редокс-система с по-висок редокс-потенциал.

Клетки, които изискват кислород като електронен акцептор при окислението, имат аеробен метаболизъм, а тези, които не използват кислород, имат анаеробен метаболизъм. Аеробният метаболизъм се състои от три фази:

- 1) разграждане на биополимери в храносмилателния тракт до мономери. В тази фаза няма окислителни реакции, не се синтезират макроергични съединения.
- 2) превръщане на мономерите в ацетил-КоА. Отделни разградни реакции на различни субстрати са окислителни (субстратно окисление). Синтезата на АТФ за сметка на енергия от субстратно окисление се означава като субстратно фосфорилиране.
- 3) разграждане на ацетил-КоА в цитратния цикъл до CO_2 и H_2O .

Водородът, отделен от метаболити на цикъла, попада в дихателната верига. При окислението му в нея се отделят значителни количества енергия, която се акумулира в АТФ.

Биологичното окисление се отличава със следните особености:

- 1) То се катализира от оксидо-редуктази, които го ускоряват, придават му специфичност и възможност за регулация. Тези ензими са двукомпонентни - действат съвместно с редокс-системи.
- 2) В повечето случаи водородът или електроните, отделени от субстратите на биологичното окисление, не достигат директно до кислорода или друг краен акцептор. Това става постепенно и многостъпално, в поредица от реакции под действие на ензими с техните редокс-системи с нарастващ редокс-потенциал.
- 3) Поради това енергията се отделя също на порции, а не експлозивно и може да се съхрани в макроергични съединения.
- 4) В по-редки случаи кислородът участва директно в окислителни реакции без освободената енергия да се акумулира в макроергични съединения. Освен метаболитно значение, тези реакции имат значение и за топлопродукцията.

Оксидо-редуктазите се делят на четири групи:

- 1) анаеробни дехидрогенази, катализиращи съвместно с никотинамидни или флавинови редокс-системи окисление на субстрати или окисление в дихателната верига. Тук спадат и анаеробните транселектронази (цитохроми).
- 2) аеробни оксидази, които използват кислород за акцептор на водорода, отделен от субстратите, при което се получава:
 - а) H_2O (цитохром *c* оксидаза, крайният ензим в дихателната верига) или
 - б) H_2O_2 (аминоацидооксидази, ксантин оксидаза и др.).
- 3) оксигенази:
 - а) монооксигенази, които хидроксилират неспецифично лекарства и други чужди за клетката вещества с цел обезвреждане или катализируют стереоспецифични хидроксилирания в биосинтезата на различни стероиди и

б) диоксигенази, които вмъкват 2 атома кислород в ароматни пръстени, последвано от окислително разтваряне на пръстена (хомогентизинат оксидаза).

4) хидроксипероксидази (пероксидази, каталаза) - обезвреждат токсични прекиси и получаващите се от тях свободни радикали, които увреждат белтъци, нуклеинови киселини, мембрани.

Към редокс-системите с биологично значение спадат:

1) Никотинамидни

Те са със сравнително нисък редокс-потенциал. Като кофактори на анаеробни дехидрогенази лесно дехидрогенират стотици различни субстрати. НАДН предава водорода в дихателната верига, а НАДФН - за редуционни биосинтези.

2) Флавинови

Те са с по-висок редокс-потенциал от никотинамидните и са коензими или простетични групи на свързаните с дихателната верига дехидрогенази и на някои оксидази. Освен напълно редуцирана и окислена форма, имат и семихинонова форма, с което улесняват прехода от дву- към едноелектронен пренос.

3) С хинонова структура

КоQ (убихинон) е хидрофобен мобилен компонент на дихателната верига. Напълно редуцираната и окислената форми не са свързани с белтък. Семихиноновата форма е прикрепена към Q-свързващ белтък във вътрешната митохондрична мембрана.

4) Метал-съдържащи:

Тук спадат железни и медни йони, свързани към белтъчен компонент, Fe-S белтъци и различни хемове - простетични групи на цитохроми. Осъществяват едноелектронен пренос в дихателната верига и в електронопреносителни вериги в ендоплазмения ретикулум.

5) С тиолови групи:

Тези редокс-системи (липоева киселина и глутатион) в окислената си форма съдържат дисулфиден мост, а в редуцираната - сулфхидрилни групи. Липоат е простетична група на дихидролипоил трансацилаза от окислителното декарбоксилиране на α -кето киселини. Глутатион е добър редуктор и наред с НАДФН участва в процеси на обезвреждане на токсични радикали.

б) Аскорбинова киселина (витамин С)

Това съединение е важен анти-оксидант, необходим за обезвреждане на токсични свободни радикали.

5.2.2 Дефиниция на основни понятия

За биологичното окисление е валидна дефиницията за окислително-редукционен процес, в който при окисление от веществата се отделят електрони, а при редукция веществата приемат електрони (вж табл. 5-2).

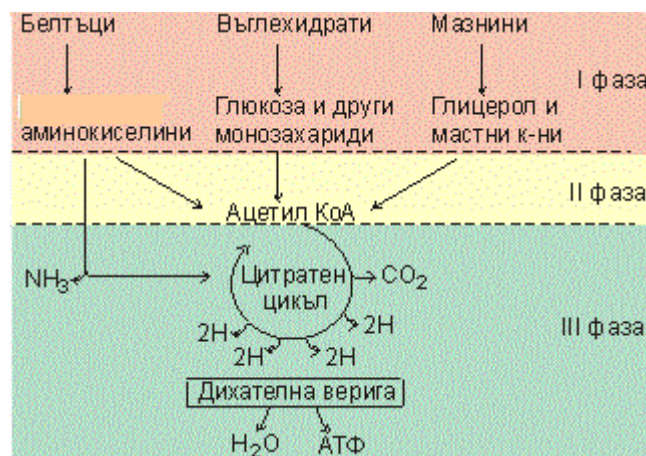
Табл. 5-2. Термини, използвани при описание на редокс-процеси.

Термин	Дефиниция
окисление	процес, при който от веществата се отделят електрони

редукция	процес, при който веществата приемат електрони
окислител	вещество, което приема електрони и се редуцира
редуктор	вещество, което отделя електрони и се окислява
редокspotенциал E	количествен израз на афинитета на веществата към електроните. Зависи от концентрацията на веществата и температурата: $E = E^{\circ} + (RT/nF) \ln [A_{ок}] / [A_{ред}]$. E° - стандартен редокс потенциал на системата при pH 7,0.
редокс-система	състои се от окислената и редуцираната форма на едно вещество
посока на придвижване на електроните	При редокс-процеси електроните се придвижват от вещество с по-нисък към вещество с по-висок редокspotенциал.

5.2.3 Стадии в катаболизма

Клетките, които използват кислород като електронен акцептор за генериране на енергия, имат **аеробен** метаболизъм, а тези, които не използват кислород, имат **анаеробен** метаболизъм. Аеробният метаболизъм се състои от три стадия (фази) (X. Кребс) - виж фиг. 5-4.



Фиг. 5-4. Общ поглед върху катаболизма на основните горива и синтеза на АТФ в окислителното фосфорилиране.

При човека в **първата фаза**, означавана като подготвителна, приетите с храната биополимери се хидролизират до мономери в храносмилателния тракт. Отделената свободна енергия е незначителна и не се акумулира в макроергични съединения.

Във **втората фаза** мономерите (хексози, мастни киселини и аминокиселини) се превръщат във все по-прости молекули, докато се получи ацетил-КоА и други метаболити от цитратния цикъл. В тази фаза отделни реакции са окислителни. Те протичат като пряко едностъпално анаеробно дехидрогениране на субстратите. Това именно анаеробно дехидрогениране на стотици различни субстрати по пътя на тяхното разграждане в хода на катаболизма се означава като **субстратно окисление**. Използват се и термините окисление на субстратно ниво или окисление в субстратната верига.

Синтезата на АТФ за сметка на енергия от субстратно окисление се означава като **субстратно фосфорилиране**.

В **третата фаза** ацетил-КоА (с 2 атома) се разгражда до CO_2 в цикъла на Кребс, който е крайният общ метаболитен път с изключително значение за катаболизма. В него има окислително-редукционни реакции, чрез които отделеният от субстратите водород попада в дихателните вериги. В тези вериги електроните се пренасят към кислорода и се получава вода.

При **окислението в дихателни вериги** се отделят значителни количества енергия, която се акумулира в АТФ. **Окислителното фосфорилиране в дихателната верига** дава около 75 %, а субстратното фосфорилиране около 25 % от АТФ в клетките.

5.2.4 Особенности на биологичното окисление

Биологичното окисление се отличава от окислението в неживата природа с някои свои важни особености.

1) Биологичното окисление се катализира от **ензими от група I (оксидоредуктази)**, които го ускоряват, придават му специфичност и възможност за регулация според нуждите на организма. Всички оксидоредуктази (т. 5.2.5) са двукомпонентни и действат съвместно с **редоксисистеми** (вж т. 5.2.6). Многобройни съединения с разнообразни химични групи се явяват техни **субстрати** (табл. 5-3), както ще проличи при изучаване на конкретните катаболитни пътища в следващите глави. Отделените от субстрата водород или електрони се пренасят върху **краен акцептор**. При аеробни условия краен акцептор е кислородът, който се редуцира до вода. При анаеробни условия краен акцептор е друго вещество, напр. пируват, който се редуцира до лактат, или ацеталдехид, който се редуцира до етанол.

Табл. 5-3. Примери за субстрати на биологичното окисление.

I. Субстрати, не взаимодействащи пряко с кислород

Субстрат	Окислявана група	Продукт	Участие в катаболитен път
малат β -хидроксиацил-КоА	-ОН -ОН	оксалацетат β -кетацил-КоА	цитратен цикъл β -окисление
глицералдехид-3-Ф α -кетоглутарат	-СНО или >C=O	1,3-бисфосфоглицерат сукцинил-КоА	гликолиза цитратен цикъл
сукцинат	-CH ₂ -CH ₂ -	фумарат	цитратен цикъл

аминокиселини	-NH ₂	α-кетокиселини	окислително дезаминиране
---------------	------------------	----------------	-----------------------------

II. Субстрати, взаимодействащи пряко с O₂

Субстрат	Вид на реакцията	Продукт	Участие в катаболитен път
фенилаланин	хидроксилиране	тирозин	разграждане на фенилаланин
хомогентизинат	оксигениране	фумарил-ацетоацетат	разграждане на фенилаланин

2) В неживата природа взаимодействието на веществата с кислорода е директно и съпроводено с отделяне на огромно количество топлина. Напр. в т.н. реакция на гърмящия газ при свързване на водород и кислород, температурата се повишава до 3000 °С.

Обратно, при биологичното окисление водородът или електроните, отделени от субстратите, не достигат до крайния акцептор директно, а **постепенно многостъпално**, минавайки в поредица от реакции, катализирани от ензими с техните редокс-системи с последователно нарастващи редокс-потенциали.

3) Всеки пренос на водород (електрони) от редокс-система с по-нисък към редокс-система с по-висок редокс-потенциал е екзергоничен процес, т.е. съпроводен е с отделяне на свободна енергия. **Тази енергия не се отделя наведнъж, а на порции в отделните стъпала на дихателните вериги.** Само първата порция остава пряко свързана с окислението на субстрата - т.е. в субстратната верига. Това постепенно (на порции) освобождаване на енергията в стъпалата на дихателните вериги позволява максимална част от нея да бъде превърната в макроергични съединения - в дихателните вериги се получават няколко мола АТФ при окисление на 2 Н атома, отделени от субстрата. Това не би било възможно, ако енергията се отдели наведнъж при пряко свързване на субстрата с кислород. Организацията на окислителното фосфорилиране може да се сравни с каскадното използване на енергията на водния пад. Стъпаловидното спускане и извличане на енергия от всяко стъпало (каскада) е по-изгодно, отколкото ако водата се пусне от голяма височина еднократно.

5.2.5 Ензими, осъществяващи биологичното окисление

Оксидоредуктазите се разделят на четири групи: дехидрогенази, оксидази, оксигенази и хидроксипероксидази.

5.2.5.1 Дехидрогенази

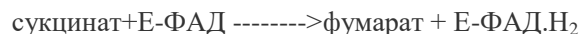
Всички ензими от тази голяма група са анаеробни, т. е. не могат да използват кислород като акцептор на водорода. Специфични са по отношение на субстрата и участват както в субстратното окисление, така и в дихателната верига. В зависимост от редокс-системата, с която действат, има :

1) Дехидрогенази с никотинамидни редокс-системи, например малат дехидрогеназа катализира реакцията:



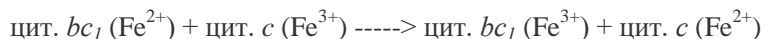
Тези ензими катализират пренос на 1 Н и 1 e⁻ (хидриден йон)

2) Дехидрогенази с флавинови редокс-системи, например сукцинат дехидрогеназа катализира реакцията:



Обикновено дехидрогеназните реакции са обратими поради малката разлика в редокspotенциала между субстрата и редокс-системата. Никотинамидните редокс-системи са слабо свързани с апоензима, докато връзката между него и флавиновите редокс-системи е много по-здрава, дори ковалентна в някои случаи.

3) Анаеробни транселектронази, катализиращи пренос на един електрон. Тук спадат цитохромите от дихателната верига (без цитохром *aa*₃), например цитохром *c* редуктаза катализира реакцията:



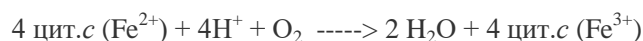
Транселектронази са също и цитохромите в електрон-пренасящите вериги в ендоплазмения ретикулум (виж т. 5.6.3).

5.2.5.2 Оксидази

Оксидазите са аеробни - използват кислород за акцептор на водорода, отделен от субстратите, при което се образува вода или водороден прекис. Към оксидазите спадат:

1) **Цитохром с оксидаза** (цитохром *aa*₃)

Този ензим съдържа хем като простетична група и медни йони. Това е крайният ензим в дихателната верига, предаващ електроните от цитохром *c* към кислорода, при което заедно с протони се образува вода:

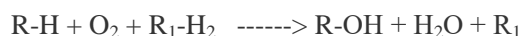


2) Останалите **оксидази, наричани също аеробни дехидрогенази**, не са свързани с дихателните вериги. Те съдържат най-често **ФМН** или **ФАД** като простетични групи, т.е. са флавопротеини. Катализират пренос на два водородни атома от субстрата директно към кислород, при което се получава водороден прекис вместо вода. Отделената при окислението на субстрата енергия се разсейва като топлина. АТФ не се получава. Към оксидазите-флавопротеини спадат D-и L- аминокиселини оксидази (виж фиг. 4-6 и глава 8), ксантин оксидаза (фиг. 4-29 и глава 9), алдехид дехидрогеназа, глюкозо оксидаза.

5.2.5.3 Оксигенази

1) **Моноксигенази или хидроксилази**

Те катализират вмъкването на един атом кислород в субстрата, при което се получава алкохолна или фенолна група. Другият кислороден атом се редуцира до вода от друг донатор на водород:



Тези ензими са част от електрон-пренасящите вериги в ендоплазмения ретикулум в черния дроб, които неспецифично хидроксилират попадналите в клетките лекарствени и други чужди вещества с цел обезвреждане (виж т.5.6.3). Митохондричните хидроксилазни системи в стероидогенни тъкани катализират стереоспецифични хидроксилирания в биосинтезите на стероидни хормони, витамин D, жлъчни киселини и др.

2) Диоксигенази

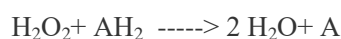
Това са ензими, които вмъкват два атома кислород в ароматни пръстени (пероксид), последвано от окислително разтваряне на пръстена. Такива ензими участват при разграждане на аминокиселини - напр. хомогентизинат оксидаза от обмяната на фенилаланин и тирозин (глава 8).

5.2.5.4 Хидроксипероксидази

Тези ензими катализират разграждането на вредните за организма прекиси и получаващите се от тях свободни радикали (т.5.6.4.), които увреждат белтъците, нуклеиновите киселини, мембраните и водят до рак и атеросклероза. Прекисите се редуцират под действие на различни редуктори като аскорбат, цитохром *c*, хинони и др. Тук спадат:

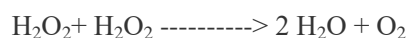
1) Пероксидази

Те катализират обезвреждане на H_2O_2 :



2) Каталаза

Тя катализира следната реакция:



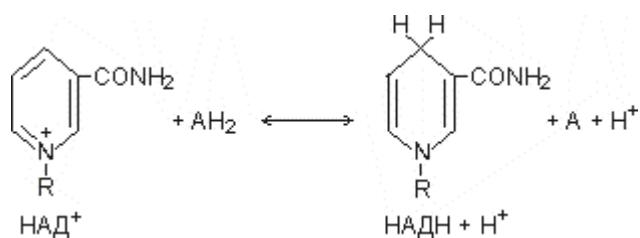
като едната молекула водороден перексид е донатор, а другата акцептор на водородни атоми (електрони).

5.2.6 Редокс-системи с биологично значение

5.2.6.1 Никотинамидни редокс-системи

Тук спадат никотинамидаденин динуклеотид ($НАД^+/НАДН + H^+$) и никотинамидаденин динуклеотидфосфат ($НАДФ^+/НАДФН + H^+$). Пълната структурна формула на окислените им форми е вече позната от фиг. 4-2 в т. 4.1.5. Единствената структурна разлика между двете е, че в НАДФ има допълнителна фосфатна група на 2' позиция в рибозата на адениловия нуклеотид. Функционално активна и променяща се в тази динуклеотидна структура е само никотинамидната база, която е всъщност витамин РР. НАД и НАДФ са производни на витамин РР (никотинамид).

На фиг.5-5 е представена редукцията на $НАД^+$ и едновременното окисление на субстрат с обща формула AH_2 . По същия начин протича и взаимодействието на $НАДФ^+$ със субстрати. Тези редокс-системи пренасят един Н атом и един електрон, т. е. формално хидриден йон Н. Окислените форми съдържат положително зареден пиридинов пръстен с ароматен характер (пиридиниев йон). Редуцираните форми не са заредени и пръстенът е с хиноноподобен характер. Поради това спектрите на окислените и редуцираните форми се различават. Редуцираните форми имат максимум на поглъщане при 340 nm и това позволява чрез измерване на екстинкцията при тази дължина на вълната да се определя количеството им, а от него и активността на дехидрогеназата, катализираща реакцията съвместно с никотинамидната редокс-система.



Фиг. 5-5. Оксидо-редукция между никотинамидна редокс-система и субстрат под действие на дехидрогеназа.

Никотинамидните редокс-системи освен близка структура, имат и много близък, при това нисък нормален редокс-потенциал (табл.5-4) - малко по-висок от този на различни субстрати, но по-нисък от този на флавиновите редокс-системи. Поради това биологичната роля на НАД^+ и НАДФ^+ е една и съща - като коензими на голям брой анаеробни дехидрогенази те отнемат водород от голям брой разнообразни субстрати в хода на началното субстратно окисление. Връзката между коензима и съответния апоензим е слаба. Специфичността към субстрата се определя от съответния апоензим.

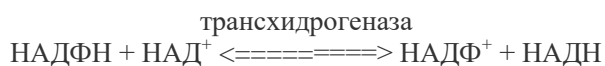
Табл. 5-4. Стандартни редокс-потенциали на някои важни редокс-системи и субстрати

Редокс-система	E° при рН 7, 25° С (волти)
$2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$	-0.414
ацетоацетат + $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \beta$ -хидроксибутират	-0.350
$\text{НАДФ}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{НАДФН} + \text{H}^+$	-0.324
$\text{НАД}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{НАДН} + \text{H}^+$	-0.320
ФМН в НАДН-дехидрогеназа + $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons$ \rightleftharpoons ФМН. H_2 в НАДН-дехидрогеназа	-0.300
$\text{ФМН} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{ФМН}.\text{H}_2$	-0.190
фумарат + $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons$ сукцинат	+0.031

убихинон + 2 H ⁺ + 2 e ⁻ <=====> убихинол	+0.045
цитохром b (Fe ³⁺) + e ⁻ <=====> цитохром b (Fe ²⁺)	+0.077
цитохром c ₁ (Fe ³⁺) + e ⁻ <=====> цитохром c ₁ (Fe ²⁺)	+0.220
цитохром c (Fe ³⁺) + e ⁻ <=====> цитохром c (Fe ²⁺)	+0.250
цитохром a (Fe ³⁺) + e ⁻ <=====> цитохром a (Fe ²⁺)	+0.290
цитохром a ₃ (Fe ³⁺) + e ⁻ <=====> цитохром a ₃ (Fe ²⁺)	+0.550
Fe ³⁺ + e ⁻ <=====> Fe ²⁺	+0.772
1/2 O ₂ + 2 H ⁺ + 2 e ⁻ <=====> H ₂ O	+0.816

Двете редокс-системи образуват общ резервоар в клетките. Редуцираните форми обаче предават акумулирания от субстратите водород в различни направления. Съотношението НАД⁺/НАДН в клетките се поддържа около 1000. Затова биологичната функция на НАДН е да доставя Н за дихателната верига (катаболизъм). Съотношението НАДФ⁺/НАДФН е около 0.01. Затова НАДФН доставя водород за редукионни биосинтези (анаболизъм).

При необходимост специален ензим трансхидрогеназа може да пренасочва големи потоци водород от катаболитно в анаболитно направление и обратно, тъй като катализира обратимата оксидо-редукция между двете никотинамидни редокс-системи:

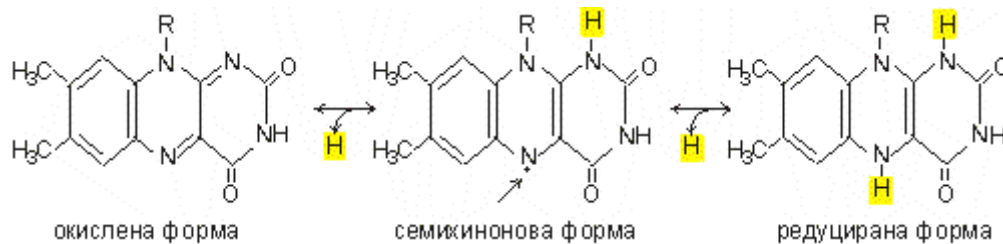


5.2.6.2 Флавинови редокс-системи

Тук спадат флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Пълната структура на окислените форми е позната от фиг. 4-2 в т. 4.1.5. Те са производни на витамин В₂ (рибофлавин). На фиг. 5-6 са представени трите редокс-форми: напълно редуцирана, семихинонова и напълно окислена. Тези редокс-системи пренасят два Н атома (електрони), но това може да става последователно, като се минава през междинна семихинонова форма, която е стабилен свободен радикал.

Кислородът, крайният акцептор на електрони в аеробните организми, може да приема само единични (несдвоени) електрони. А от метаболитите електроните се отделят по двойки. Чрез семихиноновата форма се осъществява преход между дву- и едноелектронен пренос.

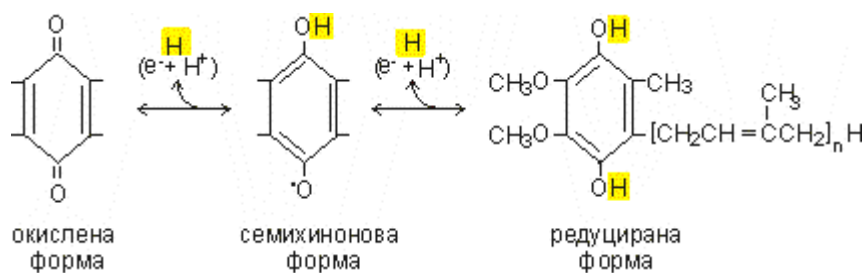
Редокspotенциалът им е по-висок от този на никотинамидните редокс-системи, но по-нисък от този на цитохромите (табл. 5-4). ФМН и ФАД са коензими на анаеробни дехидрогенази от дихателната верига (флавопротеини) и на други оксидази (аеробни дехидрогенази), които предават водорода директно на O_2 .



Фиг. 5-6. Оксидо-редукция между флавинова редокс-система и субстрат под действие на дехидрогеназа.

5.2.6.3 Редокс-системи с хинонова структура

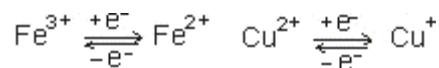
На фиг. 5-7 е представена структурата на трите форми на КоQ (редуцирана, семихинонова и окислена). Наричан е и убихинон (от английски ubi- повсеместен). КоQ.H₂ и КоQ са подвижни, несвързани с белтък компоненти на дихателната верига, а семихиноновата форма е прикрепена към Q-белтък, намиращ се от двете страни на вътрешната митохондрична мембрана. Бензохиноновото ядро и полиизопреновата странична верига му придават хидрофобни свойства и позволяват придвижването му във вътрешната митохондрична мембрана. Като подвижен компонент в излишък, убихинон участва в преноса на електрони между неподвижно вградени компоненти на дихателната верига, а именно между флавопротеините и цитохромите (виж фиг. 5-17 в т. 5.4.2). Участва и в изпомпването на протони от матрикса към междумембранното пространство посредством т.н. Q-цикъл, описан в т. 5.4.9.



Фиг. 5-7. Редуцирана, семихинонова и окислена форми на КоQ (убихинон). n - брой на изопреновите остатъци. При човек n = 10.

5.2.6.4 Метал-съдържащи редокс-системи

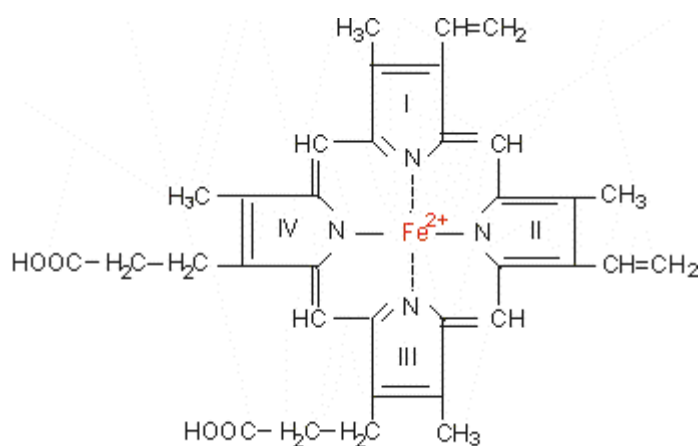
Железни или медни йони, обикновено здраво свързани с белтъчен компонент, могат да пренасят електрони:



В част от тези белтъци, освен желязо има и сяра в еквимоларни количества с желязото - наричат се Fe-S белтъци и са част от сложно устроените ензими в дихателната верига.

Други Fe-съдържащи редокс-системи са хемове. На фиг. 5-8 е дадена редуцираната форма на хема на цитохром *b*, който е идентичен с хема в хемоглобин и миоглобин.

Хем-съдържащи белтъци са цитохромите в дихателната верига и в електрон-пренасящи вериги в ендоплазмения ретикулум. В различните цитохроми хемове се различават по страничните заместители и връзки с белтъчната съставка. Но общото за всички хемове в цитохромите е, че валентността на Fe-йон се мени от +2 до +3 и обратно и така се осъществява пренос на електрони. Това е съществена разлика от непроменящата се валентност на Fe²⁺-йон в хема на хемоглобин и миоглобин, които пренасят кислород, а не електрони.

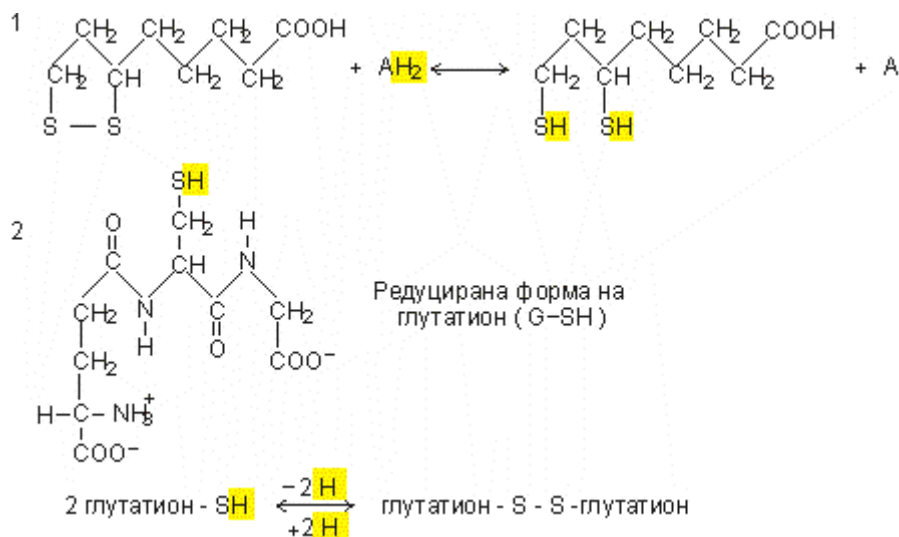


Фиг. 5-8. Структура на хема на цитохром *b* (редуцирана форма).

5.2.6.5 Тиолови редокс-системи

Тук спадат липоева киселина (липоат) (фиг. 5-9А) и глутатион (фиг. 5-9Б).

Липоевата киселина е тиооктанова киселина, която в редуцирано състояние има две сулфхидрилни групи - на 6 и 8 позиция. В окислено състояние възниква дисулфиден мост. Чрез карбоксилната си група липоевата киселина се свързва ковалентно към ε-амино група на лизилов остатък в апоензим, т.е. активната форма на липоат е липоамид. Холоензимът (дихидролипоил трансацилаза) е вторият ензим в тройния комплекс за окислително декарбоксилиране на α-кето киселини (виж т. 5.3.6).



Фиг. 5-9. Редокс-системи с тиолови групи.

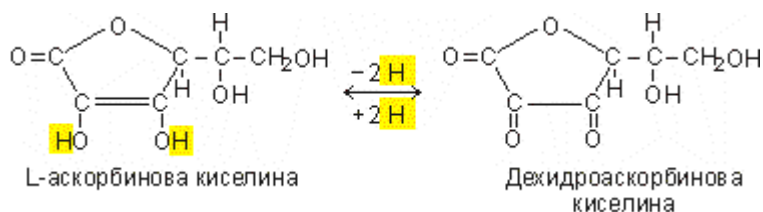
1 - Окислена и редуцирана форма на липоева киселина.

2 -. Окислена и редуцирана форма на глутатион.

Глутатионът е трипептид: γ -глутамил-цистеил-глицин. В окислената форма две молекули глутатион са свързани чрез дисулфиден мост. Като кофактор на глутатион пероксидаза участва в обезвреждането на водороден пероксид и свободния хидроксил радикал (виж т. 5.5.4).

5.2.6.6 Аскорбинова киселина (аскорбат)

Тази редокс-система е в същност витамин С. На фиг. 5-10 са дадени окислената и редуцираната форми. Не се синтезира в човек и трябва да се приема редовно с храната. Витамин С е добър редутор ($E^{\circ'} = +0.08$) и може да редуцира O_2 , нитрати и цитохроми *a* и *c*. Като водно-разтворим антиоксидант инхибира образуването на нитрозамини в храносмилателния тракт. Усвояването на желязо е по-добро в присъствие на витамин С. Участва във важни окислителни реакции, някои от които в катаболитни пътища (разграждане на тирозин), а други в синтезни пътища: синтеза на норадреналин, образуване на жлъчка, стероидогенеза, зреене на колаген.



Фиг. 5-10. Окислена и редуцирана форма на аскорбинова киселина.

При недостиг на витамин С се развива скорбут с характерни признаци: кървящи венци, трудно зарастващи рани, при тежки случаи се стига до смърт. Витамин С е необходим за дейността на ензимите, които хидроксилират пролинови и лизинови остатъци в полипептидните вериги на проколаген при превръщането му в зрял колаген (виж т. 2.5.6).

5.2.7 Биологичното окисление на субстратно ниво генерира НАДН и НАДФН

Обобщавайки познанията за биологичното окисление, ясно е, че субстратното окисление е едностъпално анаеробно дехидрогениране на стотици различни субстрати под действие на специфични ензими дехидрогенази, кооперирани най-често с редокс-системите НАД^{+} и НАДФ^{+} . В резултат значителни количества водород под форма на НАДН могат да постъпят в дихателната верига или под форма на НАДФН да се използват за редукционни биосинтези.

Субстратното окисление е начален етап, предшестващ окислението в дихателната верига.

Енергията, отделена при субстратното окисление, поради малката разлика в редокспотенциалите, обикновено се разсейва като топлина, тъй като не достига за образуване на 1 мол АТФ. Има само три случая, когато едновременно с окислението се извършва и акумулиране на отделената енергия в макроергично съединение и те са разгледани в следващата точка 5.3.

5.3 Окислително фосфорилиране на субстратно ниво

5.3.1 Резюме

Сред стотиците случаи на субстратно окисление има само няколко, при които отделената енергия е достатъчна за образуване на макроергично съединение. Два от тях (окислителното фосфорилиране на глицералдехид-3-фосфат и енолазната реакция) са част от гликолизата. Протичат в цитоплазмата под действие на единични ензими. Окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселини е по-сложен процес, катализира се от дехидрогеназни комплекси и протича в митохондриите.

Окислителното фосфорилиране на глицералдехид-3-фосфат се катализира от глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, която свързва субстрата към цистеинова сулфхидрилна група в активния център и с коензим НАД^{+} осъществява окислението на алдехидната група на субстрата. Това е екзергонична реакция, при която отделената енергия не се разсейва, а се акумулира в тиоестерна макроергична връзка в рамките на ензим-субстратния комплекс. Освен оксидоредуктазна активност, ензимът има и трансферазна активност, чрез която прехвърля ацилния радикал върху фосфат. Получава се макроергичният продукт 1,3-бисфосфоглицерат, предшественик на АТФ. Макроергичната му фосфатна група се използва за фосфорилиране на АДФ до АТФ.

Енолазната реакция е единствената позната реакция в биосферата, при която неорганичен фосфат се издига от нормоергично на макроергично ниво. При нея без участието на външна редокс-система, енолазата катализира дехидратиране на 2-фосфо-глицерат до друг предшественик на АТФ - фосфоенолпируват (ФЕП), който е с най-висока стойност на ΔG° за хидролиза. Дехидратирането може да се разглежда като вътрешномолекулна оксидоредукция, съпроводена с отделяне на енергия, която се консервира в енол-фосфатната макроергична връзка. Последващият пренос на макроергичната фосфатна група от ФЕП върху АДФ е необратима реакция, тъй като тавтомеризирането на първоначално получаващия се енол-пируват до кето-пируват е силно екзергонична реакция.

Макар и със скромнен количествен принос гликолитичните фосфорилирания са важни в условия на кислородна недостатъчност.

Окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселините пируват до ацетил-КоА и на α -кетоглутарат до сукцинил-КоА са важни реакции. Първата осъществява връзката между гликолизата и цитратния цикъл, а втората е част от цитратния цикъл.

Пируватдеhidрогеназният комплекс (ПДХ) се състои от три ензима и 5 кофактора: пируват дехидрогеназа (E_1) с кофактор тиамин пирофосфат (ТПФ), дихидролипоил трансацетилаза (E_2) с протетична група липоамид и външен КоА, дихидролипоил дехидрогеназа (E_3) с ФАД и външен НАД⁺. α -кетоглутарат дехидрогеназният комплекс се отличава от ПДХ само по първия ензим.

Организирането на ензимите в сложно устроени комплекси има следните предимства:

- 1) Разстоянието, което субстратите трябва да изминат между активните центрове на ензимите е по-малко, отколкото ако ензимите не са в комплекс. Това увеличава реакционната скорост.
- 2) Намалва се възможността междинните метаболити да реагират с други молекули в странични реакции;
- 3) Реакциите, катализирани от мултиензимния комплекс, се регулират координирано.

5.3.2 Разлика в редокс-потенциалите на реагиращите редокс-системи, необходима за синтеза на АТФ

Окислително фосфорилиране на субстратно ниво е синтезата на АТФ или други макроергични съединения за сметка на енергия, отделена при субстратно окисление.

При оксидо-редукционните процеси отделената свободна енергия може да се изчисли от израза (5.2.4):

$$-\Delta G = n F \Delta E^{o'}$$

където n - брой на пренасяните електрони; $F = 96500 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$; $\Delta E^{o'}$ - разликата в нормалните редокс-потенциали на реагиращите редокс-системи.

Изхождайки от това, че $\Delta G^{o'}$ за хидролиза на АТФ е -30.5 KJ/mol (табл. 5-1), може да се изчисли, че за синтезата на γ -фосфатната връзка на АТФ е необходимо $\Delta E^{o'}$ да бъде поне 0.158 V .

В живите клетки физиологичните концентрации на АТФ, АДФ и Ф не са 1 mol/L , а обикновено $5, 4$ и 2.1 mmol/L , съответно. Тогава и $\Delta G^{o'}$ за хидролиза на АТФ е 42.7 KJ/mol (вж т. 5.1.7). В такъв случай $\Delta E^{o'}$ на реагиращите редокс-системи трябва да бъде по-висок - около $0,2$ до $0,25 \text{ v}$.

Сред стотиците случаи на субстратно окисление има само три случая, когато отделената енергия не се разсейва като топлина, а се акумулира в продукта на окислението, който е макроергично съединение.

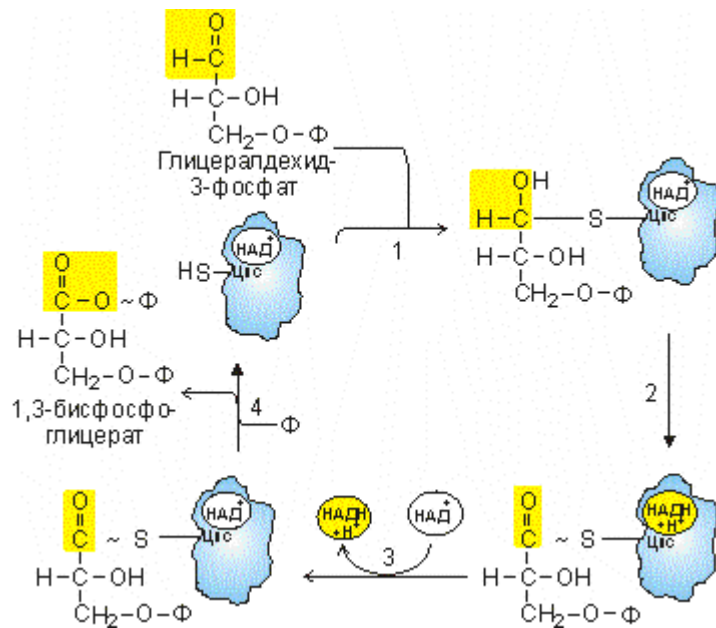
Тези случаи на субстратно фосфорилиране или по-общо казано, на енергетично спрягане на субстратно ниво, са:

- 1) окислително фосфорилиране на глицералдехид -3-Ф;
- 2) окислително декарбоксилиране на α -кето киселини;
- 3) енолазна реакция

5.3.3 Окислително фосфорилиране на глицералдехид 3-фосфат

Този процес (фиг. 5-11) е част от гликолизата. Той илюстрира основен принцип в биоенергетиката: окислението на субстрата е съпроводено с отделяне на енергия; отделената енергия се акумулира в макроергично съединение.

Фиг. 5-11. Молекулен механизъм на окислителното фосфорилиране на глицералдехид-3-фосфат.



Субстрат на реакцията е глицералдеhid-3-фосфат. Катализира се от глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа. В активния център на ензима има -SH група от цистеинов остатък за свързване на субстрата. Като коензим участва редокс-системата НАД^+ . Алдехидната група на субстрата се окислява, отделя се енергия и тя се акумулира в макроергична тиоестерна връзка в рамките на ES комплекс. Редокс-системата се редуцира. Външен окислен НАД^+ измества редуцирания НАДН.

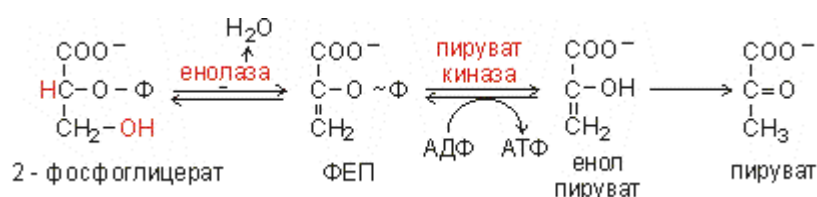
В следващия етап тиоестерната връзка се превръща в ацилфосфатна. Ензимът, освен оксидоредуктазна, има и трансферазна активност - катализира още една реакция - прехвърляне ацилния радикал върху фосфат. Получава се 1,3-бисфосфоглицерат.

След това макроергичният фосфат от 1,3-бисфосфоглицерат се пренася върху АДФ - образува се АТФ и 3-фосфоглицерат. Тази реакция се катализира от фосфоглицерат киназа.

Сумарната реакция е окисление на глицералдеhid-3-фосфат до 1,3-бисфосфоглицерат с редукция на НАД^+ , спрегнато със синтезата на АТФ от АДФ и Ф. Фосфорната киселина се издига от нулево на високо макроергично ниво в АТФ.

5.3.4 Енолазна реакция

Тази реакция (фиг. 5-12) също е част от гликолизата.



Фиг. 5-12. Окислително фосфорилиране при енолазна реакция.

Енолазната реакция е забележителна с 2 неща:

- 1) Тя е единствената позната реакция, при която фосфатната група се издига от нормоергично ниво (в 2-фосфоглицерат) до макроергично ниво (във фосфоенолпируват).
- 2) При тази реакция се получава енол-фосфатната макроергична връзка с най-висока $\Delta G^{0'} = -61.9 \text{ kJ/mol}$ (виж табл. 5-1 в т. 5.1.6) без видимо да протича окислителен процес. За разлика от горния пример тук не участва НАД⁺ или друга редокс-система, а се отделя вода.

Отделянето на вода, обаче, може да се разглежда като вътрешномолекулна оксидоредукция - водород се отделя от втория въглероден атом (окисление), а хидроксилна група - от третия въглероден атом (редукция).

Това вътрешно-молекулно прегрупиране е съпроводено с отделяне на енергия, която се акумулира в макроергичната енол-фосфатна връзка. Така че всъщност енолазната реакция, привидно изключение от правилото, също илюстрира общия биоенергетичен принцип, че в резултат на оксидо-редукция се отделя енергия и тя се акумулира в макроергична връзка.

В следващата реакция под действие на пируват киназа енергията, акумулирана в ФЕП, се използва за синтеза на АТФ, като ФЕП се превръща през енол-пируват в неговия тавтомер пируват в кето-форма.

В този случай фосфатната група се пренася на високо макроергично ниво (от ФЕП върху АДФ до получаване на АТФ). Тавтомеризирането на енол-пируват в кето-формата, обаче е силно екзергонична реакция, чиято $\Delta G^{0'}$ осигурява енергия, повече от необходимата за синтеза на АТФ. Това е причината и за необратимостта на пируват киназната реакция.

5.3.5 Значение на гликолитичните фосфорилирания

Макар и количественият принос на субстратните гликолитични фосфорилирания да е скромнен, разгледаните реакции имат значение, тъй като:

- 1) В условията на кислородна недостатъчност, напр. в усилено работещ мускул, те са единственият източник на АТФ
- 2) Не се повлияват от вещества, които инхибират или разстройват (разпират) окислението в дихателните вериги и спрегнатото с него фосфорилиране;
- 3) при митохондрични заболявания снабдяват клетката с АТФ;
- 4) доставят АТФ, когато енергията, отделена в дихателната верига, се използва не за синтеза на АТФ, а за други ендергонични процеси;
- 5) биосинтезите в цитоплазмата се осъществяват с помощта на гликолитичен АТФ.

5.3.6 Окислително декарбоксилиране на α -кето киселини

5.3.6.1 Обща реакция и значение

Окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселини (пируват, α -кетоглутарат, α -кетобутират и разклонени кето-киселини) се представя най-общо със следната реакция:



От карбоксилната група на α -кетокиселината се отделя CO_2 с едновременно окисление на α -кето групата до $-\text{COOH}$ група, така че от алфа-кето киселината се получава карбонова киселина (под форма на тиоестер с КоА). Най-значими са два случая на окислително

декарбосилиране:

- 1) пируват до ацетил КоА;
- 2) α -кетоглутарат до сукцинил -КоА.

Значението на тези реакции е голямо - първата реакция е връзка между гликолизата и цитратния цикъл, а втората е част от цитратния цикъл.

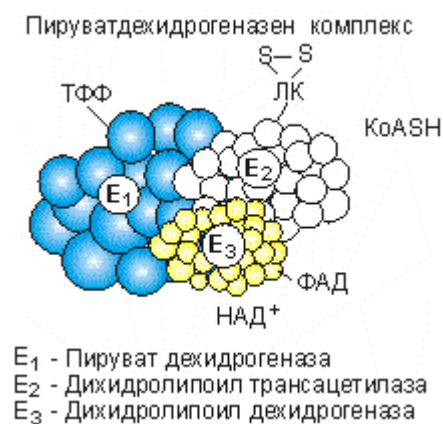
За разлика от гликолитичните фосфорилирания, окислителното декарбосилиране протича не в цитоплазмата, а във вътрешната митохондрийна мембрана, така че отделеният от субстрата водород лесно постъпва в дихателната верига. И в двата случая се катализира от сложни тройни ензимни комплекси: пируват дехидрогеназен комплекс и α -кетоглутарат дехидрогеназен комплекс, които се отличават само по първия ензим в комплекса. Затова в т. 5.3.6.2. ще се разгледа само комплексът, действащ върху пируват.

Организирането на ензимите в сложно устроени комплекси има следните предимства:

- 1) Разстоянието, което субстратите трябва да изминат между активните центрове на ензимите е по-малко, отколкото ако ензимите не са в комплекс. Това увеличава реакционната скорост.
- 2) Намалва се възможността междинните метаболити да реагират с други молекули в странични реакции;
- 3) Реакциите, катализирани от мултиензимния комплекс, се регулират координирано.

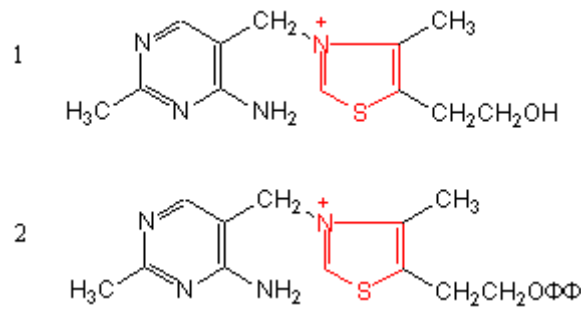
5.3.6.2 Пируват дехидрогеназен комплекс

Пируват дехидрогеназният комплекс се състои от три ензима и пет кофактора (фиг. 5-13):



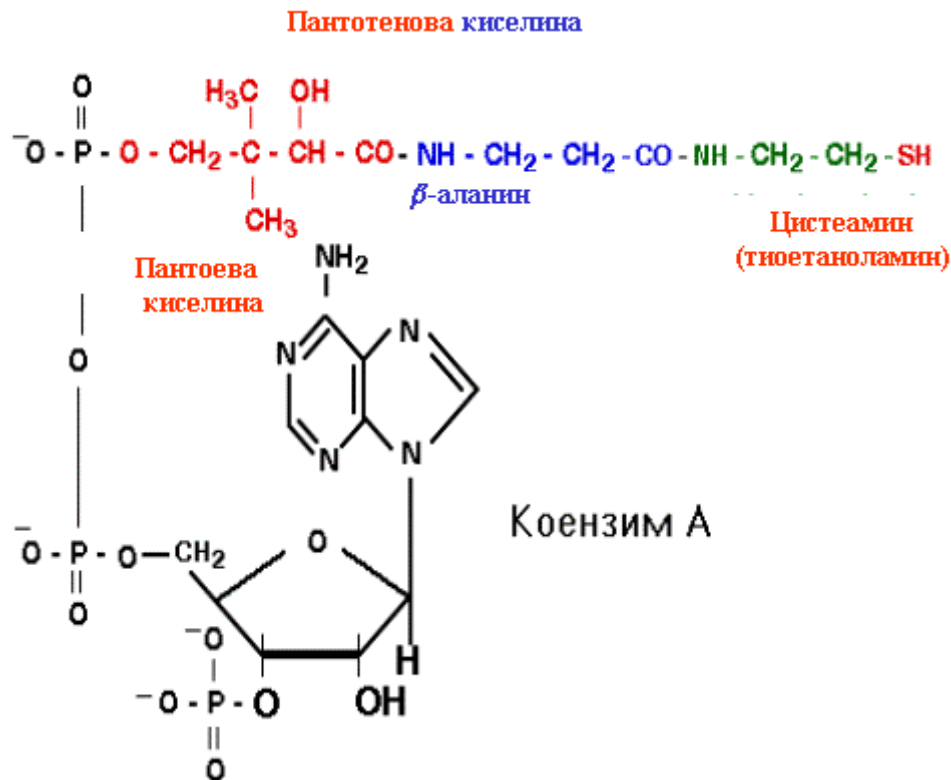
Фиг. 5-13. Опростена схема за структурата на пируват дехидрогеназен комплекс, катализиращ окислително декарбосилиране на пируват. Показани са кофакторите, необходими за действието на всеки апоензим.

1) пируват дехидрогеназа (въпреки, че действа като декарбосилаза) (E₁). Действа съвместно с кофактора тиаминпирофосфат (ТФФ) (фиг. 5-14). Тиаминпирофосфат е производно на витамин В₁ (тиамин). Витамин В₁ съдържа пиримидинов и тиазолов пръстени, свързани чрез метиленова група. От значение за свързването на субстрата и декарбосилирането му е тиазоловият пръстен.



Фиг. 5-14. Структура на тиамин (витамин В₁) (1) и тиамин пирофосфат (2).

2) **дихидролипоил трансацетилаза (E₂)**. Съдържа като простетична група липоева киселина (ЛК), която е под форма на липоамид, тъй като е ковалентно свързана чрез киселинно-амидна връзка към ε-амино-група на лизилов остатък в апоензима. Свободен (неензимно свързан) кофактор КоА-SH (фиг. 5-15) е необходим, за да поеме окисления продукт от E₂. КоА е сложно съединение, производно на витамина пантотенова киселина. Чрез SH-групата на биогенния амин цистеамин КоА образува макроергични тиоестери с карбонови киселини.



Фиг. 5-15. Структура на КоА.

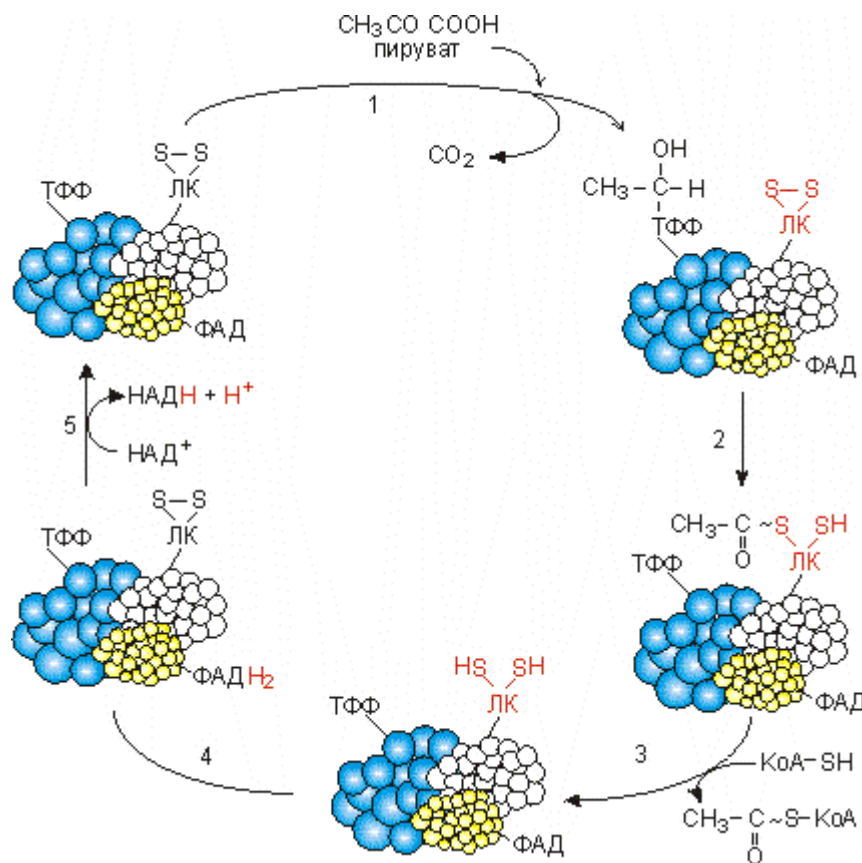
Към аденилов нуклеотид е прикрепена пантотенова киселина, а към нея цистеамин. Пантотеновата киселина съдържа пантоева киселина (α,γ-дихидрокси-β, β-диметилмаслена киселина) и β-аланин. SH-групата на цистеамин образува тиоестерна връзка с получаващата се -COOH група.

3) **дихидролипоил дехидрогеназа (E₃)**. Съдържа ФАД като простетична група и се нуждае от НАД⁺, за да се възстанови ФАД в окислена форма.

Всеки един от тези три ензими се състои от голям брой субединици. Напр. за *E. coli* организацията е следната: 24 субединици от E_1 и 12 субединици от E_3 са подредени около сърцевина от 24 субединици от E_2 . При еукариоти комплексите са още по-сложни - 60 субединици от E_1 и 12 субединици от E_3 са подредени около 60 субединици от E_2 .

5.3.6.3 Молекулен механизъм на окислителното декарбоксилиране на пируват

През първия етап (фиг. 5-16) пируват дехидрогеназата съвместно с ТФФ свързва пируват към тиазоловия пръстен на ТФФ и го декарбоксилира до активен ацеталдехид (1).



Фиг. 5-16. Молекулен механизъм на окислителното декарбоксилиране на пируват под действие на пируват дехидрогеназния комплекс.

1 - свързване на пируват и декарбоксилиране на пируват; 2 - дехидрогениране на хидроксиетил-ТПФ; 3 - Прехвърляне на ацетиловия радикал от липоамид върху КоА; 4 - дехидрогениране на липоевата киселина; 5 - окисление на ФАДН_2 .

През втория етап активният ацеталдехид се пренася върху липоева киселина (ЛК) в окислена форма, и свързан с нея, се окислява до активен ацетат (2). При това ЛК се редуцира с разтваряне на дисулфидния мост, а отделената при окислението на активния ацеталдехид до активен ацетат енергия се акумулира в тиоестерна макроергична връзка в рамките на ES комплекс между E_2 и субстрата. E_2 има и втора активност - да прехвърли получения ацетилен радикал от липоева киселина върху КоА като акцептор (3). Получава се макроергичен продукт ацетил КоА с тиоестерна макроергична връзка, а липоевата киселина остава редуцирана.

В третия етап E_3 -ФАД окислява E_2 -ЛК(SH)₂ (4), а външен НАД^+ окислява E_3 -ФАД (5). За да се обясни последното, трябва да се има предвид следното: Стандартният редокс-потенциал

на свободен ФАД е по-висок от този на $\text{НАД}^+ / \text{НАДН} + \text{H}^+$, но ензимно свързаният ФАД, поради локални взаимодействия на заредени групи в апоензима близо до ФАД, има по-нисък редокс-потенциал и е възможно да редуцира НАД^+ . Полученият редуциран НАД е субстрат за дихателната верига, която също е локализирана във вътрешната митохондрийна мембрана.

5.3.6.4 Роля на витамините B_1 , B_2 , РР и пантотенова киселина в окислителното декарбоксилиране на α -кетокиселини

Четири от петте кофактори в окислителното декарбоксилиране са производни на витамини. Тук участват тиамин (B_1) под форма на тиаминпирофосфат, рибофлавин (B_2) под форма на ФАД, никотинамид (РР) под форма на НАД и пантотенова киселина под форма на КоА.

Витамин B_1 освен в окислително декарбоксилиране е кофактор и на транскетолазата в пентозофосфатния път (пренос на C_2 фрагменти). Има го в пълнозърнести житни семена и месо.

Нарушението на окислителното декарбоксилиране при авитаминоза B_1 (при консумиране на лющен ориз, захар, бяло брашно или при алкохолици, които почти не приемат храна) води до заболяването бери-бери - в началото се засяга периферната нервна система, характерни са изтощение, мускулна слабост, кожни нарушения, загуба на тегло. По-късно това прогресира до сърдечно-съдова, нервна и мускулна дегенерация. Описание на бери-бери е направено от Якобус-Бонитус 1630 г., когато е работил на остров Ява: "Бери-бери (= овца) е едно много мъчително заболяване. При поразените от тази болест треперят коленете, те повдигат високо крака и ходят подобно на овце. Това е вид паралич или по-скоро тремор. При болните има отклонения в характера на движението, нарушава се чувствителността на ръцете и краката, а понякога и на цялото тяло." (цитирано по [5]).

5.4 Дихателни вериги

5.4.1 Резюме

Дихателната верига е сложно организирана и специализирана система във вътрешната митохондрийна мембрана със следните функции: да събира редуциращи еквиваленти от различни субстрати, да ги пренася към O_2 (окисление) и да акумулира отделената при окислението енергия като синтезира АТФ (окислително фосфорилиране).

Дихателната верига се състои от разтворими и мембранно свързани компоненти, които са организирани в 4 комплекси, действащи съвместно с АТФ синтаза. Някои от компонентите пренасят по 1 електрон (Fe-S-белтъци, цитохроми, Cu-йони). Други пренасят по 2 електрона (КоQ, ФМН, ФАД).

Електроните се придвижват от редокс-центрове с по-нисък (по-отрицателен) редокс-потенциал към редокс-центрове с по-висок (по-положителен) редокс-потенциал. Чрез опити с инхибитори на електронния транспорт е установена последователността на дихателните преносители и мястото на постъпване на електроните в дихателната верига.

Комплекс I (850 kD) се състои от 43 субединици с простетична група редокс-системата ФМН. Част от субединиците са Fe-S белтъци. Те съдържат Fe-S кластери като простетични групи, участващи в електронния транспорт. Комплекс I пренася два електрона от НАДН към КоQ и изпомпва 4 протона в интрамембранното пространство.

Комплекс II се състои от сукцинат дехидрогеназа с простетична група ФАД и още три малки хидрофобни субединици, Fe-S кластери, и цитохром b_{560} . Комплекс II пренася

електрони от сукцинат през ФАД към КоQ, но отделената енергия не е достатъчна за синтеза на АТФ.

Комплекс III в бозайници е димер, като всеки мономер се състои от 11 субединици, в които влизат цитохром b_{562} (b_H), цитохром b_{566} (b_L), цитохром c_1 и един Fe-S белтък. Комплекс III пренася 2 електрона от КоQH₂ към 2 молекули цитохром c и посредством Q-цикъла изпомпва 4 протони в интрамембранното пространство.

Комплекс IV в бозайници е димер. Всеки мономер се състои от 13 субединици, като трите най-големи и най-хидрофобни субединици (I, II и III) са митохондрично кодирани.

Комплекс IV има 4 редокс-центра: меден атом, известен като Cu_B, цитохром a и цитохром a_3 (свързани към субединица I) и двойка медни атоми, известни като Cu_A-център (свързан към субединица II).

Комплекс IV редуцира O₂ до 2 H₂O като използва 4 електрона от цитохром c и 4 протона от матрикса. За всеки 2 електрона, които редуцират кислород, се изпомпват в интрамембранното пространство 2 протона.

Съгласно химио-осмотичната теория преносът на електрони по дихателната верига е движеща сила за изпомпване на протони в интрамембранното пространство от комплекси I, III и IV, при което се установява трансмембранен електрохимичен градиент. Обратното връщане на протоните в матрикса през F_o-компонент на АТФ-синтазата (F₁-F_o-АТФаза) задвижва нейния F₁-компонент да синтезира АТФ от АДФ и Ф.

Коефициентът на окислително фосфорилиране P/O, показващ броя на молекулите синтезиран АТФ за 1 атом O редуциран, не е задължително да бъде цяло число. Теоретично изпомпването на 10 протони при преноса на електрони от НАДН към кислород е достатъчно за синтез на 3 мола АТФ. При пренос на електрони от сукцинат през ФАД се изпомпват 6 протони, което е достатъчно за синтеза на 2 мола АТФ. Преносът на 2 електрона през комплекс IV изпомпва 2 протона, достатъчно за синтеза на 1 мол АТФ. Експериментално определяните стойности на P/O не са цели числа, а са 2.5, 2 и 1, съответно за пренос на електрони от комплекс I до O₂, комплекс II до O₂ и комплекс IV до O₂.

Вещества, които снемат мембрания потенциал, действат като разобщители (напр. отровата 2,4-динитрофенол и естествени разпругащи агенти като Ca²⁺, мастни киселини, билирубин и др.). Олигомицин и други вещества, които се свързват към F_o-компонент на АТФ-синтазата действат като инхибитори на окислителното фосфорилиране, тъй като прекратяват обратния пренос на протони от междумембранното пространство към матрикса.

Познанията върху дихателни вериги обясняват действието на опасни отрови. Ротенон и барбитурати, антимицин А и смъртоносните KCN и CO, съответно действат като инхибитори на електронния транспорт в комплекс I, III и IV. Смъртоносна за алкохолици е комбинацията от барбитурати и етанол, тъй като етанолът усилва депресирация ефект на барбитурати върху централната система

5.4.2 Локализация и функции - общ поглед

При синтеза на АТФ за сметка на енергия, отделена при окисление в дихателната верига, се говори за **окислително фосфорилиране или енергетично спрягане в дихателната верига**.

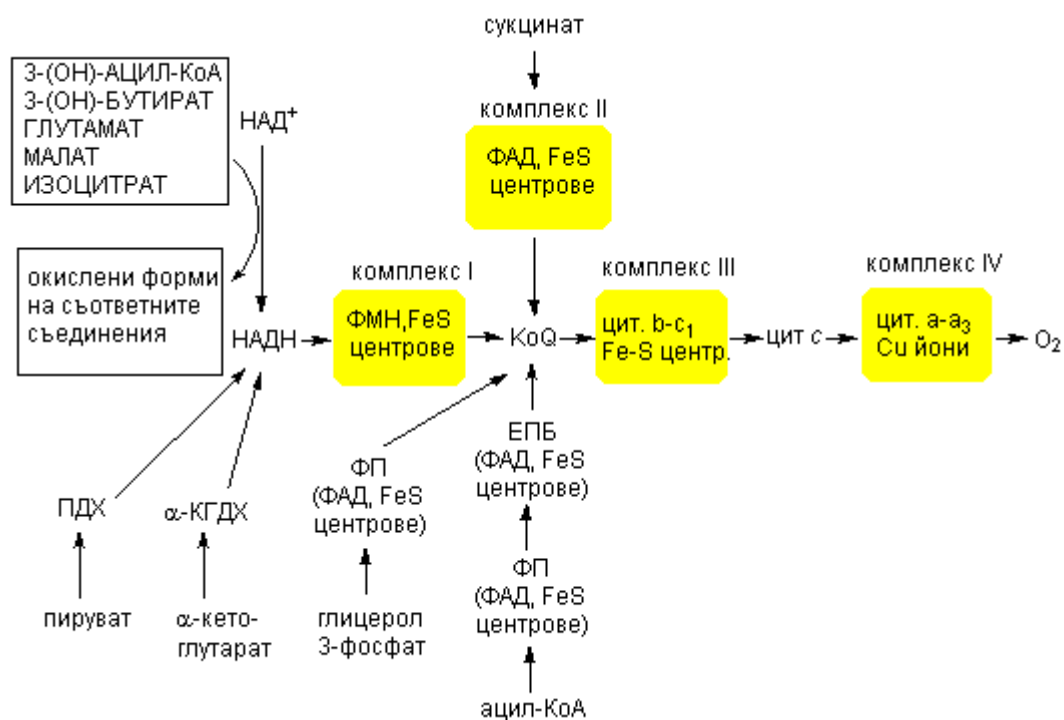
Дихателната верига е локализирана във вътрешната митохондрична мембрана. Тя е сложно организирана и специализирана система (фиг. 5-17-1) със следните функции:

- 1) събиране на редуциращи еквиваленти (водородни атоми или електрони) от различни субстрати.
- 2) пренос на редуциращи еквиваленти към молекулен кислород (окисление в дихателната

верига);

3) акумулиране на енергията, отделена при окислението, под форма на АТФ (окислително фосфорилиране в дихателната верига)

Тези функции се изпълняват от високомолекулни и сложно устроени оксидо-редуктази (с различни редокс-системи), подредени в белтъчно-липидния слой на вътрешната митохондрийна мембрана по нарастващ редокспотенциал и действащи съвместно със същия мембранно разположената и сложно устроена АТФ-синтазна система.



Фиг. 5-17-1. Общ поглед върху четирите комплекси на дихателната верига и някои допълнителни ензими, доставящи водород от различни субстрати.

Най-големи количества водород постъпват през комплекс I, дехидрогениращ НАДН. Сукцинат се дехидрогенира от комплекс II. За ацил-КоА, глицерол-3-фосфат и др. има допълнителни специфични флавопротеини, не участващи в четирите комплекси. Тези комплекси, както и непоказаната АТФ синтаза, са разгледани в следващите точки.

Първата функция (събиране на редуциращи еквиваленти) се изпълнява от комплекси I и II, които съдържат флавинови и други редокс-системи. Най-големи количества водород под форма на НАДН постъпват през комплекс I. НАДН е субстрат за действието на този комплекс.

Субстратът НАДН се получава в три вида процеси: 1) множество субстратни дехидрогенирания в матрикса на митохондриите, 2) окислително декарбоксилиране на α -кетокиселини; 3) чрез малатната совалкова система, внасяща цитоплазмен Н в митохондриите (вж глава 6).

Сукцинатът е субстрат на комплекс II.

В дихателната верига има и други флавопротеини, близки по структура и функции на комплекс II. Тук спадат ацил КоА дехидрогеназа, електрон-пренасящ белтък, глицеролфосфат дехидрогеназа и др. Всички те имат висока специфичност по отношение на субстратите-донатори на водород - всеки ензим има свой субстрат. Те са анаеробни дехидрогенази и при физиологични условия предават редуциращите еквиваленти само на

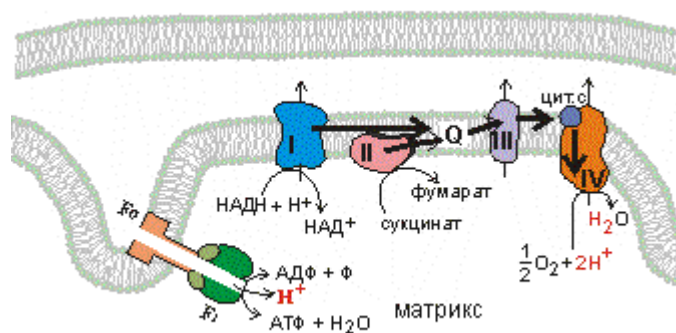
KoQ, а не на кислорода. Те са сложно устроени, с четвъртична структура. Като редокс-центрове съдържат ФАД и Fe-S белтъци. Благодарение на тези флавопротеини субстрати с по-висок редокс-потенциал могат да доставят водород за дихателната верига.

Третата функция се осъществява с участието на комплекси I, III и IV, действащи като протонни помпи, и от мембранната АТФ-синтаза.

5.4.3 Молекулно устройство и действие на дихателната верига

Някои от компонентите на дихателната верига са разтворими и подвижни, а други са мембранно свързани. Компонентите са организирани в 4 комплекса, действащи съвместно с АТФ синтаза (фиг. 5-17-2).

Тези комплекси са разположени асиметрично - някои компоненти пронизват мембраната и се издават и към матрикса, и към междумембранното пространство. Едни са по-близо до матрикса, а други до междумембранното пространство.



Фиг. 5-17-2. Асиметрично разположение на компонентите на дихателната верига във вътрешната митохондрична мембрана. С римски цифри от I до IV са означени описаните в текста комплекси в дихателната верига.

Комплекс I (НАДН-КоQ оксидоредуктаза)

Използва се и названието НАДН-дехидрогеназен комплекс или просто НАДН-дехидрогеназа. Този огромен (850 kD) комплекс се състои от 43 субединици, пронизвайки вътрешната митохондрична мембрана и издавайки се както към интрамембранното пространство, така и към матрикса.

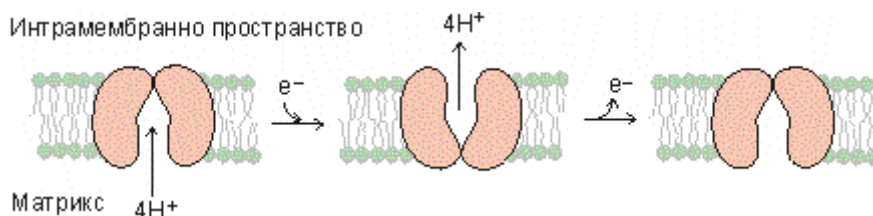
Като простетична група участва редокс-системата ФМН (виж т. 5.2.6.2). Част от субединиците са Fe-S белтъци. Те съдържат различни Fe-S кластери като простетични групи (най-вече [2Fe-2S] и [4Fe-4S]), участващи в електронния транспорт. В тях желязото е нехемово и е свързано координативно със S атоми. Сярата в тези кластери е два вида - неорганична и органична - от цистеинови остатъци на белтъците.

Комплекс I пренася два електрона от НАДН към КоQ в следната последователност:



Комплекс I е анаеробна дехидрогеназа (виж. т.5.2.5.1). Той е входна врата за постъпване на H в дихателната верига. Осигурява висока ефективност на електронния пренос. При физиологични условия предава редуциращи еквиваленти само на КоQ, но не директно на O₂. Строгата му анаеробност *in vivo* е от решаващо значение за постепенното (на порции) окисление и акумулиране на освободената енергия.

Комплекс I е една от трите протонни помпи в дихателната верига. При пренос на 2 електрона от НАДН към КоQ изпомпва 4 протона в интрамембранното пространство (фиг. 5-18-1). Конформацията на окислената и редуцираната форми са различни. В окислено състояние протоните се свързват към аминокиселинни остатъци от матриковата страна на мембраната. Редукцията води до конформационни промени, при които протонираниите групи са вече към интрамембранното пространство и освобождават там протоните.



Фиг. 5-18-1. Схема за възможното действие на комплекс I като протонна помпа. Движеща сила за протонната транслокация е електронният пренос между редокс-центровете в комплекс I.

Комплекс II (сукцинат - КоQ оксидоредуктаза)

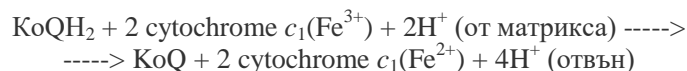
Този комплекс бе известен и просто като сукцинат дехидрогеназа, но вече се знае, че се състои от сукцинат дехидрогеназа с протетична група ФАД и още три малки хидрофобни субединици, Fe-S кластери, и цитохром b_{560} . Комплекс II пренася електрони от сукцинат през ФАД към КоQ, но отделената енергия не е достатъчна за синтеза на АТФ.

Комплекси I и II не действат последователно, а успоредно. И двата комплекса прехвърлят водород от своите субстрати върху КоQ и го редуцират.

КоQ или убихинон, който е подвижен компонент в дихателната верига, служи като колектор на електрони. Продукт на комплекси I и II, той е субстрат за действието на комплекс III. В окислената и редуцираната си форма КоQ функционира като свободна, нискомолекуларна, несвързана с белтък редокс-система. Вече знаем неговата структура (фиг. 5-7 в т. 5.2.6.3). Бензохиноновото ядро и изопреновата верига му придават липофилни (хидрофобни) свойства, които го правят много удобен за изпълнение на биологичната роля - пренос на редуциращи еквиваленти от неподвижно вградените в мембраната ФП към също така неподвижно вградените цитохроми. Наличието и на трета семихинонова форма позволява той да осъществява преход от дву- към едноелектронен пренос. Тази форма има важно значение и за протичане на т.н. Q-цикъл, който е част от дейността на комплекс III.

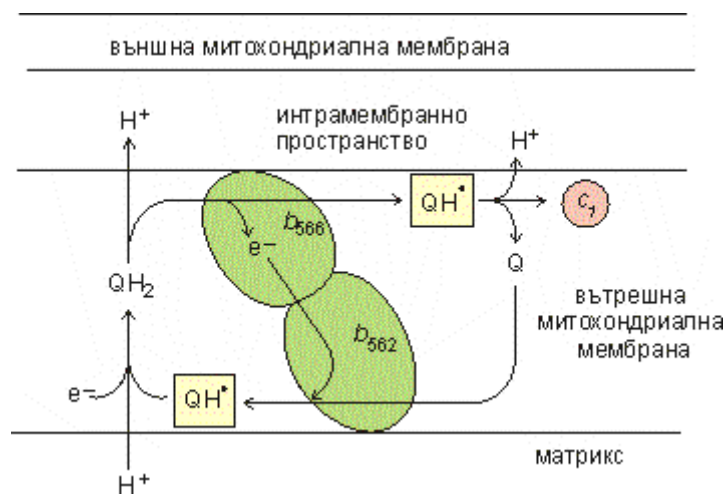
Комплекс III (Коензим Q - цитохром c оксидоредуктаза)

Известен е като $b-c_1$ -комплекс или цитохром c редуктаза. Комплекс III в бозайници е димер, като всеки мономер се състои от 11 субединици, в които влизат цитохром b_{562} , цитохром b_{566} , цитохром c_1 и един Fe-S белтък. Комплекс III пренася 2 електрона от CoQH_2 към 2 молекули цитохром c и посредством Q-цикъла (фиг. 5-18-2) изпомпва 4 протони в интрамембранното пространство съгласно следното уравнение [1]:



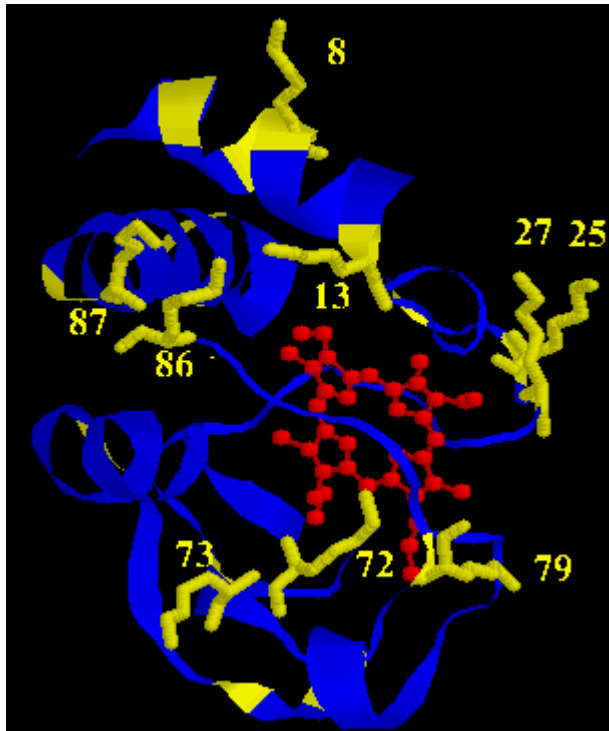
QH[•] е прикрепен от двете страни на мембраната към специален Q-свързващ белтък. QH₂ и Q са подвижни.

Цитохромите в комплекса се подреждат по нарастващ редокс-потенциал, както следва: b_{566} , b_{562} , c_1 . Като простетична група всеки цитохром съдържа хем (желязо-порфиринов пръстен). В редуцирана форма валентността на желязото е +2, в окислена +3.



Фиг. 5-18-2. Схема за възможното действие на комплекс III като протонна помпа посредством Q-цикъла. QH^{\bullet} е прикрепен от двете страни на мембраната към специален Q-свързващ белтък. QH_2 и Q са подвижни. Цитохроми b_{562} и цитохром b_{566} са представени в зелен цвят.

Цитохром c (фиг. 5-18-3) е нискомолекулен периферен мембранен белтък (13 kD). Съдържа една полипептидна верига с 19 лизинови и 3 аргинилови остатъка, поради което е алкален белтък с pI 10.6. Чрез положително заредените лизинови и аргинилови групи се свързва със своите биологични партньори комплекс III (цитохром c редуктаза и комплекс IV (цитохром c оксидаза), а също и с фосфолипидите от мембраната чрез електростатични взаимодействия. Тези сравнително по-слаби връзки позволяват той да се изолира лесно от мембраната, за разлика от другите цитохроми. Приема се, че е белтъчен преносител на електрони, без ензимни функции. С ниската си молекулна маса, форма и структура той е идеално пригоден да поема електрони от цитохром c редуктазата и да ги предава на цитохром c оксидазата. Той е от най-детайлно изучените белтъци. Знае се първичната структура на цитохром c от над 120 вида - от най-низши организми до човек. Оказва се, че няколко лизинови остатъци са строго консервативни в течение на еволюцията, следователно са жизнено важни (Лиз13, Лиз 72, Лиз 86, Лиз87, а също и Лиз8, Лиз25, Лиз 27, Лиз 73, Лиз79. Именно те образуват пръстен около хема и участват във взаимодействието с кисели групи от комплекс III и комплекс IV. Модифицирането им (блокирането им) с различни вещества намалява в различна степен електрон-пренасящата способност на цитохром c и така се съди за важноста на всеки лизинов остатък.



Фиг. 5-18-3. Структура на цитохром с. Фигурата е приготвена с програмата Raswin [7], ползвайки данните за атомните координати на цитохром с от Protein Data Bank [10].

α -Спиралните участъци в полипептидната верига са представени с модел тип "панделка" в синьо, хемът с модел "топки и пръчки" в червено, а консервативните лизинови остатъци, заобикалящи хема и имащи значения за взаимодействие с кисели групи от комплекс III ($b-c_1$) и комплекс IV (цитохром с оксидаза) са представени с модел тип "пръчки" в жълто и са означени техните номера. Особено важни за електронния пренос са Лиз 13, Лиз 86, Лиз 87 и Лиз 72.

Комплекс IV в бозайници е димер. Всеки мономер се състои от 13 субединици, като трите най-големи и най-хидрофобни субединици (I, II и III) са митохондрично кодирани.

Комплекс IV има 4 редокс-центра: меден атом, известен като Cu_B , цитохром a и цитохром a_3 (свързани към субединица I) и двойка медни атоми, известни като Cu_A -център (свързан към субединица II).

Комплекс IV редуцира O_2 до $2 H_2O$ като използва 4 електрона от цитохром с и 4 протона от матрикса. За всеки 2 електрона, които редуцират кислород, се изпомпват в интрамембанното пространство 2 протона.

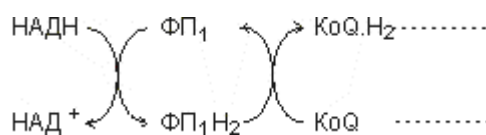
В обобщение:

Някои от компонентите на дихателната верига пренасят по 1 електрон (Fe-S-белтъци, цитохроми, Cu-йони). Други пренасят по 2 електрона (CoQ, ФМН, ФАД).

Електроните се придвижват от редокс-центрове с по-нисък (по-отрицателен) редокс-потенциал към редокс-центрове с по-висок (по-положителен) редокс-потенциал.

Компонентите на дихателната верига са в динамично състояние. Те периодично минават от окислено в редуцирано състояние, и обратно, както личи от фиг. 5-19.

Комплекс I, комплекс III и комплекс IV действат като протонни помпи.



Фиг. 5-19. Динамично преминаване на компонентите на дихателната верига от редуцирана в окислена форма и обратно. Показана е опростено само началната част на веригата - последователна оксидоредукция между НАДН, ФМН от комплекс I и CoQ.

5.4.4 Термодинамика на електронния транспорт в местата за протонна транслокация

При окисление на НАДН от O_2 в дихателната верига общата промяна в стандартната свободна енергия $\Delta G^{o'}$ е -218 kJ/mol съгласно ур. 5.2.4 (табл. 5-5). Тъй като за синтеза на 1 мол АТФ се изискват 30.5 kJ/mol , то теоретично отделената при окислението на НАДН енергия е достатъчна за синтеза на няколко мола АТФ. Тази енергия се отделя не наведнъж, а на порции, като в някои от етапите енергията не достига за синтеза на АТФ и се разсейва като топлина.

Ако разликата в редокspotенциала между съседни редокс-центрове е около или по-голяма от $0.19\text{-}0.20 \text{ V}$, то отделената енергия съгласно ур. 5.2.4 ще бъде повече от 30.5 kJ/mol , т.е. достатъчно за синтеза на 1 мол АТФ. В табл. 5-5 са дадени изчислените според ур. 5.2.4 стойности на $\Delta G^{o'}$ за реакциите, катализирани от комплексите на дихателната верига.

Табл. 5-5. Стойности на отделената енергия в реакциите, катализирани от комплексите на дихателната верига.

Комплекс	Реакция	$\Delta E^{o'}$ (V)	$\Delta G^{o'}$ (kJ/mol)
I	$\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{КоQ} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{КоQH}_2$	0.360	- 69.5
II	$\text{ФАДН}_2 + \text{КоQ} \rightarrow \text{ФАД} + \text{КоQH}_2$	0.085	- 16.4
III	$\text{КоQH}_2 + \text{цит. } c(\text{Fe}^3) \rightarrow \text{КоQ} + \text{цит. } c(\text{Fe}^2)$	0.190	- 36.7
IV	$\text{цит. } c(\text{Fe}^2) + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{цит. } c(\text{Fe}^3) + \text{H}_2\text{O}$	0.580	- 112
Общо четирите комплекса	$\text{НАДН} + \text{H}^+ + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O}$	1.130	- 218

Вижда се, че в комплекси I, III и IV отделената енергия е достатъчно за синтеза на АТФ. Затова дълго време се смяташе, че именно в тези три места (първо, второ и трето) става спрягане на окислението с фосфорилиране на АДФ до АТФ. Наричаха се и все още в някои учебници се наричат енергетично спрягащи или фосфорилиращи места. След възприемане на химиосмотичната теория (т. 5.4.9) те се означават като места за протонна транслокация.

Трябва да се подчертае, че комплекс I (първо място), комплекс III (второ място) и комплекс IV (трето място) не синтезират директно АТФ, както първоначално бе смятано. Както бе показано в т. 5.4.3 те действат като протонни помпи - пренасят електрони към кислорода и изпомпват протони от матрикса в интрамембранното пространство, при което възниква трансмембранен протонен градиент. Неговата енергия се използва за синтеза на АТФ от АТФ синтазата.

5.4.5 Коефициент на окислителното фосфорилиране

Коефициентът на окислителното фосфорилиране (P/O) е отношение, което показва колко мола АТФ се синтезират от АДФ и Ф при транспорт на два електрона към един атом кислород до получаване на вода в дихателната верига.

Измерването на този коефициент в изолирани митохондрии при различни експериментални условия е било полезно както за установяване подреждането на компонентите на дихателната верига, така и за осветляване механизма на окислителното фосфорилиране. Той има различна стойност в зависимост от субстрата, доставящ водород за дихателната верига (вж табл. 5-6).

Табл. 5-6. Стойности на коефициента на окислително фосфорилиране P/O при окисление на различни субстрати.

Субстрат	Работещи места за протонна транслокация	Теоретични стойности за P/O	Ревизирани стойности** за P/O
НАДН	първо, второ, трето	3	2.5
сукцинат	второ, трето	2	1.5
аскорбат + ТМФД*	трето	1	1

*ТМФД - тетраметил-р-фенилен диамин - липидно разтворимо вещество, което заедно с аскорбат подава електрони на комплекс IV.

** по P. Hinkle [6].

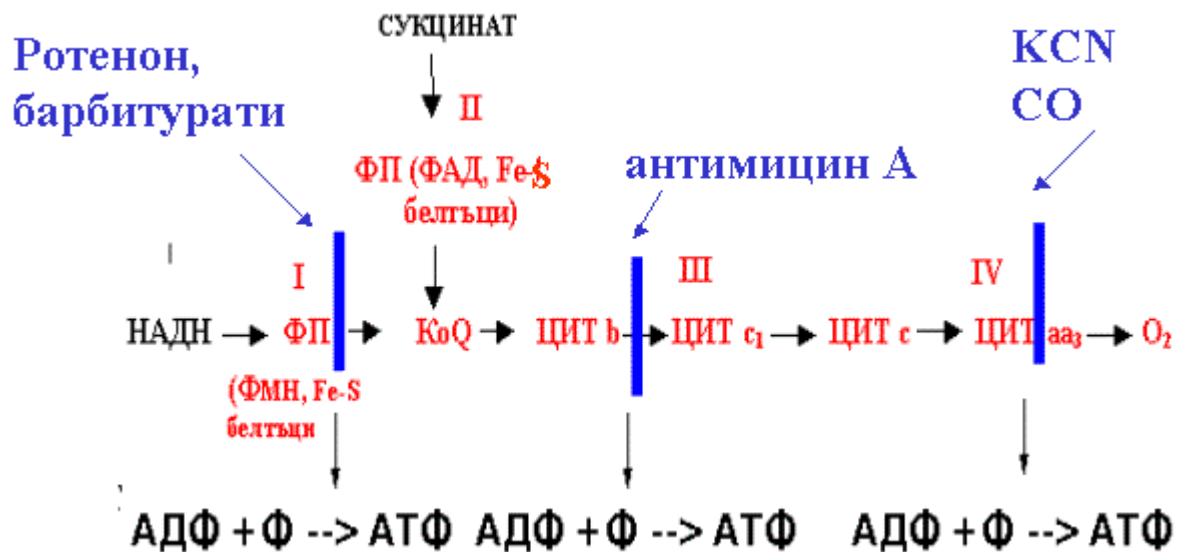
Преносът на 2 електрона през комплекси I, III и IV е свързано с изнасяне на 10 протони от матрикса в интраембранното пространство. Отделената при това енергия е достатъчна за синтеза на три мола АТФ (P/O = 3). Субстратите с по-висок редокс-потенциал подават водород в по-късен етап и някои от местата за протонна транслокация не работят. Напр. електроните от ФАДН₂ не минават през комплекс I и поради това се изнасят само 6 протони, което е достатъчно за синтеза на 2 мола АТФ (P/O = 2). Преносът на 2 електрона само през комплекс IV е свързано с изнасяне на 2 протона и това е достатъчно за синтеза на 1 мол АТФ (P/O = 1).

Експерименталните стойности за P/O не са били цели числа, но дълго време бяха закръглени на цели числа, т.е. ползваха се теоретичните стойности, дадени в табл. 5-6. Трябва да се има предвид, че част от протонния градиент се използва и за други ендергонични процеси, а също, че макар и в слаба степен може да има неспецифично снижаване на протонния градиент. През 1991 г. P. Hinkle преразгледа стойностите за P/O и показва, че вместо 3, 2 и 1, те трябва да се корегират на 2.5, 1.5 и 1. Тези ревизирани стойности са в съгласие с химиоосмотичната теория за механизма на окислителното фосфорилиране, разгледана в т. 5.4.9.

5.4.6 Инхибитори на електронния транспорт

За определяне точното подреждане на компонентите на дихателната верига допринесоха и опитите с инхибитори на електронния транспорт. Тези опити осветлиха и механизма на действие на някои отрови.

Инхибиторите на електронния транспорт са вещества, които спират преноса на електрони в енергетично спрягащите места на дихателната верига (вж фиг. 5-20) и вторично спират и фосфорилирането.

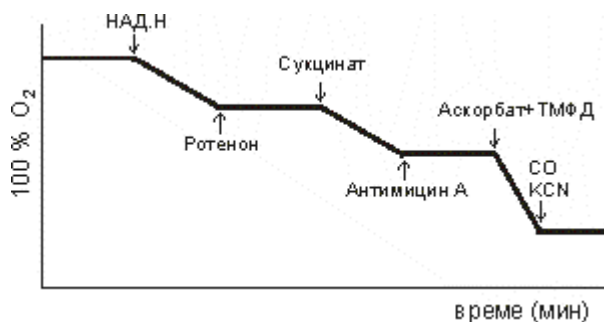


Фиг. 5-20. Енергетично свързани (фосфорилиращи места, места за протонна транслокация) в дихателната верига и специфични за тях инхибитори на електронния транспорт.

Специфични за първо място са напр. ротенон, барбитурати и др.; за второ място - напр. антимицин А; за трето място - CO, KCN и др. Инхибиторите разделят дихателната верига на окислен и редуциран сегмент. В мястото на блока два съседни дихателни преносителя са в противоположно редокс-състояние: преди блока преносителят е в максимално редуцирано състояние, а след блока - в максимално окислено състояние.

На фиг. 5-21 е показан полярографски запис на кислородна консумация на изолирани митохондрии.

Скалата на полярографския апарат се наглася така, че да е между 0 до 100 % кислород. Първоначално в съдчето на полярографа се поставят митохондрии в изотоничен буфер. Поради липса на субстрат окисление не се извършва - писецът върви хоризонтално. Добавя се НАДН. Започва окисление. Скоростта му се изчислява от наклона на правата. Добавя се ротенон, окислението се инхибира и писецът върви хоризонтално. Възобновяването на окислението при добавяне на сукцинат означава, че той доставя Н за дихателната верига в по-късен етап след първото фосфорилиращо място. Антимицин А инхибира сукцинатното окисление, но то може да се възобнови от аскорбат в комбинация с ТМФД. Следователно те доставят електрони за веригата в етап след второто фосфорилиращо място. Аскорбатното окисление се инхибира от KCN.



Фиг. 5-21. Електронен транспорт в изолирани митохондрии при добавяне на различни субстрати и инхибитори, проследен чрез измерване на кислородната консумация.

Стойността на Р/О в присъствие на инхибитори на електронния транспорт е нула. Щом няма окисление, няма отделяне на енергия и АТФ не се синтезира - виж табл. 5-7.

Табл. 5-7. Стойности на коефициента на окислително фосфорилиране Р/О при окисление на различни субстрати в присъствие на инхибитори на електронния транспорт, разпрягащи агенти или инхибитори на окислителното фосфорилиране.

Субстрат	Работещи места за протонна транслокация	Теоретични стойности за Р/О
НАДН	първо, второ и трето	3
НАДН + ротенон	-	0
сукцинат + ротенон	второ и трето	2
сукцинат + антимицин А	-	0
сукцинат + KCN	-	0
аскорбат + ТМФД* + антимицин А	трето	1
сукцинат + (2,4-ДНФ)	-	0
сукцинат + олигомицин	-	0

*ТМФД - тетраметил-р-фенилен диамин - липидно разтворимо вещество, което заедно с аскорбат подава електрони на комплекс IV.

**Действието на 2,4-ДНФ (разпрягащ агент) и на олигомицин (инхибитор на окислителното фосфорилиране) е разгледано в т. 5.4.8.

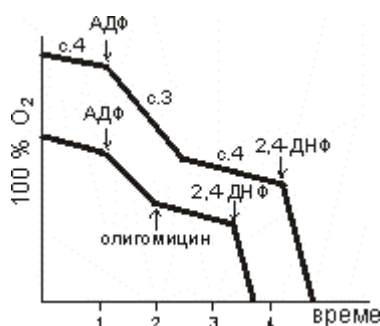
5.4.7 Дихателен контрол

Дихателният контрол представлява обратимо повлияване на електронния транспорт (окислението) в дихателната верига от съотношението в концентрациите на АДФ и АТФ. Това е възможно, тъй като окислението и фосфорилирането са спрегнати, взаимозависими процеси, които нормално не могат да функционират един без друг. При извършване на работа се разгражда АТФ до АДФ и това стимулира окислението. То, от своя страна, отделя енергия за синтеза на АТФ.

Измерването на кислородната консумация в присъствие и отсъствие на АДФ позволява да се измерва и степента на дихателен контрол (фиг. 5-22). Тук е представен полярографски запис, демонстриращ дихателен контрол, упражняван от АДФ. Добавеният АДФ (акцептор на енергията) стимулира окислението докато се превърне в АТФ. Тогава без друга добавка дишането възстановява началния слаб интензитет. Нова добавка на АДФ отново би стимулирала окислението и това може да се наблюдава докато свърши кислородът в полярографската клетка. Състоянието на митохондриите след добавяне на АДФ се нарича активно, а след изчерпването на АДФ - контролируемо или неактивно състояние. По-късно е било установено, че всъщност не само АДФ, а фактически отношението [АДФ] [Ф] /

[АДФ], наричано фосфатен потенциал, упражнява дихателния контрол. Високи стойности на АДФ и Ф стимулират окислението, а високи стойности на АТФ го инхибират.

Добавянето на разпрягащия агент 2,4-ДНФ разединява окислението от фосфорилирането. Окислението се усилва, но отделената енергия не се акумулира в АТФ, а се разсейва като топлина, т.е. дихателната верига върви на празен ход. В митохондриите с добавен разпрягащ агент не се наблюдава дихателен контрол. На долния запис се вижда, че добавянето на олигомицин прекратява фосфорилирането и окислението. Добавянето на разпрягащ агент след олигомицин стимулира окислението. Това показва, че олигомицинът не действа директно върху окислението, а върху етап от фосфорилирането (първичен ефект), а спирането на окислението е вторичен ефект.



Фиг. 5-22. Полярографски запис на кислородна консумация, демонстриращ дихателен контрол в изолирани митохондрии. с. 4 - неактивно (контролируемо) състояние; с. 3 - активно състояние след добавяне на АДФ. Тези цифри 4 и 3 са въведени от В. Chance (USA), който е описал пет възможни състояния за митохондриите в зависимост от наличието или отсъствието на субстрати, кислород, АДФ и активността на ензимите.

Дихателен контрол се демонстрира само в добре спрегнати митохондрии - т.е. в митохондрии, в които процесите на окисление и фосфорилиране са зависими. Затова наличието на дихателен контрол е чувствителен тест за качеството на изолираните митохондрии - интактност на мембраната и спрегнатост на окислението и фосфорилирането.

5.4.8 Разпрягащи агенти и инхибитори на окислителното фосфорилиране

Опитите с разпрягащи агенти и инхибитори на окислителното фосфорилиране са допринесли за разкриване механизма на образуването на АТФ.

Типичен представител на разпрягащите агенти е 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ). Добавени към изолирани митохондрии, тези агенти разединяват (разпрягат) окислението от фосфорилирането. Поради необразуване на АТФ, клетката изпитва недостиг от енергия и компенсаторно пуска в разграждане нови и нови субстрати на окислението. Окислението се усилва неколкосткратно, но отделената енергия се разсейва като топлина - дихателната верига върви на празен ход. При по-високи дози може да се стигне до смъртен изход. 2,4-ДНФ е външно за клетките вещество. В организма обаче има естествени разпрягащи агенти - мастни киселини, Са йони, тироксин, билирубин и др. Това показва, че и разпрегнатото (свободно) окисление има своето значение (виж т. 5.6.).

Типичен представител на инхибиторите на окислителното фосфорилиране е олигомицин. Този антибиотик инхибира АТФ синтазата, свързвайки се с един от нейните участъци. Спирането на фосфорилирането вторично инхибира и окислението. За разлика от олигомицин, инхибиторите на електронния транспорт първично инхибират окислението, а вторично и фосфорилирането.

5.4.9 Механизъм на окислителното фосфорилиране в дихателната верига

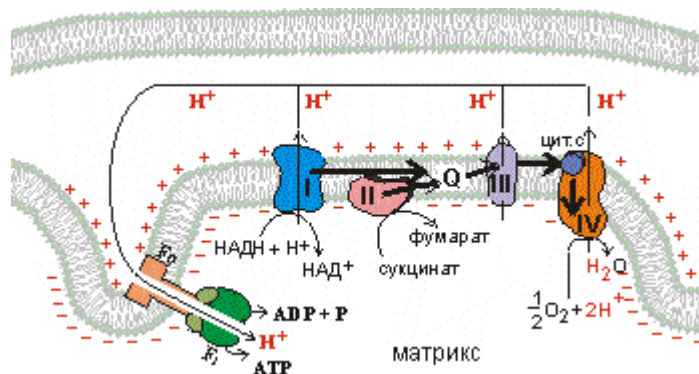
Според по-ранната химическа хипотеза по аналогия със субстратните фосфорилирания във всяко енергетично-спрягащо място отделената енергия се поема от неизвестни междинни спрягащи фактори, при което възникват макроергични съединения, водещи до синтеза на АТФ. Въпреки упоритата работа на водещи изследователски екипи, спрягащите фактори не бяха идентифицирани.

Питър Митчел пръв посочи, че те просто не съществуват. Освен това Митчел е забелязал, че окислително фосфорилиране се извършва само ако мембраната на митохондриите е интактна, неувредена.

Въз основа на тези два факта, на измерванията на рН в митохондрии чрез конструирания от самия него чувствителен рН-метър и на изследванията с разобщители и инхибитори на окислителното фосфорилиране, Митчел разработи принципно нова схема за механизма на окислителното фосфорилиране. Той постулира и впоследствие бе доказано наличието на:

- 1) непроницаема за H^+ и $-OH$ - спрягаща митохондрийна мембрана;
- 2) трансмембранно ориентирани дихателни преносители, осъществяващи векторен пренос на електрони и протони през мембраната
- 3) обратима пренасяща протони АТФазна система.

Преносът на електрони по дихателната верига към O_2 е движеща сила за изнасяне на протони от матрикса към междумембранното пространство (фиг. 5-23). Това води до възникване на трансмембранен електрохимичен потенциал, който има две компоненти - химична (натрупване на H^+ отвън и OH^- вътре в матрикса) и електрична (натрупване на положителни заряди отвън и отрицателни заряди вътре). Експериментално е доказано, че рН в междумембранното пространство е по-ниско, отколкото в матрикса. Този електрохимичен потенциал задвижва синтеза на АТФ под действие на АТФ синтаза. Структурата на този ензимен комплекс е разгледана в т. 5.4.10



Фиг. 5-23. Механизъм на окислителното фосфорилиране според химио-осмотичната теория на Митчел.

Днес е общоприето, че комплексите I, III и IV действат като протонни помпи.

Протоните от матрикса излизат навън, при което възниква трансмембранен електрохимичен потенциал. Тъй като мембраната е непроницаема за протони, връщането им в матрикса става по градиента, но само през молекулярния комплекс на АТФ-синтазата. Преходът на протони от зона с висока концентрация на протони към зона с ниска концентрация отделя свободна енергия, за сметка на която се синтезира АТФ. Така между матрикса и междумембранното пространство се извършва непрекъснат кръговрат на протони, движеща сила на който е транспортът на електрони.

Химиоосмотичната теория обяснява необходимостта от мембрана, създаването на протонен градиент и действието на разпрягащите агенти и олигомицин, както и необходимостта от специални транспортни системи за АТФ, АДФ, Ф, Ca^{2+} , пируват и совалкови системи за

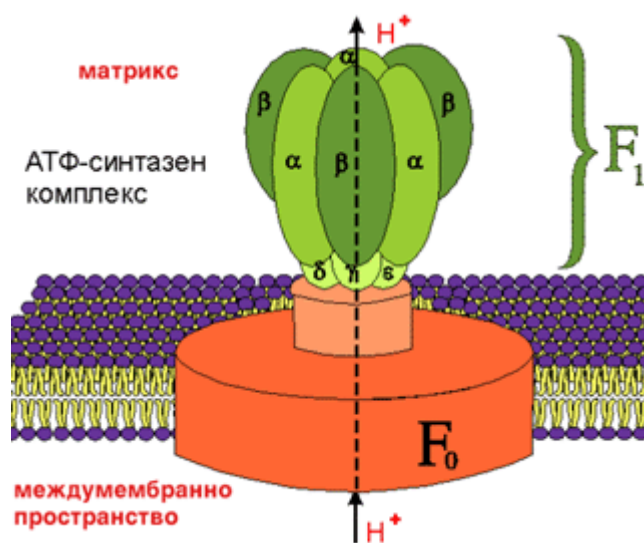
вносяне на цитозолен водород. Разпрягащите агенти като слаби ароматни киселини свързват протоните, внасят ги вътре и снемат трансмембрания потенциал. Олигомицинът, токсичен антибиотик, е мощен инхибитор на фосфорилирането, защото се свързва с митохондриятната АТФ синтаза и блокира обратния пренос на протони към матрикса.

5.4.10. Структура и действие на АТФ синтаза

АТФ синтазата е вградена във вътрешната митохондриятна мембрана (фиг. 5-24-1). Състои се от два главни компонента F_0 и F_1 . Компонентът F_1 напомня кръгла топка за брава или шапка на гъба, откъдето е дошло и названието гъбовидни образувания по кристите. Гъбовидните образувания, състоящи се от АТФ синтазни комплекси, са обърнати към матрикса. Гъбките посредством крачета се съединяват с компонента F_0 . Индексът "0" не означава нула, а буквата "o", от олигомицин, който се свързва с тази част от молекулата на АТФ синтазата.

Ако кристите се озвучат с ултразвук, получават се субмитохондриятни частици, в които АТФ синтазните комплекси в гъбките са обърнати към външната среда - "обърнати частици", защото в митохондриите те са насочени навътре, към матрикса. Изолирани от мембраната, тези ензимни комплекси катализират разграждането на АТФ. Оттук идва другото име на комплекса: АТФаза. Но в интактни митохондрии, главната ѝ биологическа функция се състои не в разграждане, а в синтеза на АТФ.

По-късно бе установено, че F_1 се състои от 9 субединици от 5 различни типа α , β , γ , δ , ϵ . Субединиците α и β оформят главичката, а останалите - част от крачето.



Фиг. 5-24-1. Структура на АТФ синтазен комплекс.

Компонентът F_1 се състои от 9 субединици от 5 различни типа α , β , γ , δ , ϵ . Субединиците α и β оформят главичката, а останалите - част от крачето.

Компонентът F_0 е разположен в мембраната. В него се свързва олигомицин и блокира преноса на водород през ензима, а с това и окислителното фосфорилиране.

Синтезата на АТФ включва следните три фази:

1. Поемане на протони от F_0 от междумембранното пространство и пренос към F_1 ;
2. Синтеза на АТФ под действие на F_1 ;
3. Използване на енергията на протонния градиент за освобождаване на АТФ от F_0 , което изисква взаимодействие между F_0 и F_1 .

На фиг. 5-24-2 е даден механизъм за синтеза на АТФ, предложен от Р. Вoyer [7].



Фиг. 5-24-2. Механизъм за синтеза на АТФ по [7].

F₁-компонентът на АТФ синтазата се състои от три αβ димери. Във всеки от тях има нуклеотид-свързващо място с различен афинитет към адениловите нуклеотиди:

О-място - с много нисък (нулев) афинитет към лигандите и каталитично неактивно;

Л-място с нисък афинитет към лигандите и каталитично неактивно;

Т-място, здраво свързващо АТФ и каталитично активно.

АТФ се синтезира в следните етапи:

- 1) АДФ и Ф свързват към Л-мястото.
- 2) Энергията на протонния градиент променя природата на свързващите места: Л-място се превръща в Т-място; Т-място се превръща в О-място; О-място се превръща в Л-място.
- 3) АТФ, синтезиран в предишния цикъл, се отделя от О-място. АДФ и Ф в Т-място се превръщат в АТФ, който остава здраво свързан до освобождаването му в следващия цикъл.

5.4.11 Приложение на познанията върху дихателната верига за изясняване механизма на действие на опасни отрови

Вдишването на HCN или поглъщането на KCN, инхибитори за трето енергетично-спрягащо място, инхибира бързо и смъртоносно цитохром *c* оксидазната реакция в митохондриите дихателни вериги. Цианидът е една от най-мощните и бързо действащи отрови. Той се свързва с Fe³⁺ на хема на цит. *aa*₃ и блокира преноса на електрони към O₂. Окислението и фосфорилирането спират и смъртта настъпва за секунди до минути поради недостиг на кислород, най-вече в централната нервна система. Ако диагнозата се постави много бързо, на отровения се дават нитрити, които превръщат окси-хемоглобин в метхемоглобин MetHbOH(Fe³⁺), а той отнема цианидния йон от цит. *aa*₃-(Fe³⁺-CN⁻), образувайки MetHbOH(Fe³⁺)-CN.

Вкарването на тиосулфат води до превръщане на цианида в безвредния тиоцианат под действие на ензима роданаза.

Барбитуратите, специфични инхибитори за първо енергетично-спрягащо място, се използват като приспивателни. Вземането на по-висока доза може да е смъртоносно. **Особено опасна е комбинацията от барбитурати и алкохол [6]**. Алкохолът усилва депресиращия им ефект върху централната нервна система и инхибира тяхното разграждане. Трезвият алкохолик е по-нечувствителен към тях, тъй като ги разгражда по-бързо. Обикновено до фатален край се стига, когато трезвият алкохолик не може да заспи, въпреки че е поел барбитурати. Раздразнен, той взема още от тях, а също и алкохол. Заспива, но повече не се събужда поради синергийния ефект на барбитуратите и алкохола.

5.5 Свободно окисление

5.5.1 Резюме

С термина "свободно или неспрегнато окисление" се означава окислението, при което отделената енергия не се акумулира в макроергични съединения.

Свободното окисление има значение:

- 1) за топлопродукцията в топлокръвните организми. Митохондриите дихателни вериги в мускули и мастна тъкан се разпират от повишено съдържание на висши мастни киселини, отделени от триацилглицероли под въздействие на адреналин, който активира липаза в мастна тъкан. В кафява мастна тъкан има разпирателен белтък термогенин, през който

изпомпаните в интрамембранното пространство протони се връщат в матрикса, шунтирайки АТФ-синтазата. Чрез термогенин, вместо за синтеза на АТФ, енергията на протонния градиент се превръща в топлина.

2) за метаболизма (десатурация на висши мастни киселини, неспецифично хидроксилиране на различни чужди за клетката вещества с цел обезвреждане и за специфично хидроксилиране като част от синтезата на стероидни хормони и други вещества.

Непълната редукция на O_2 с единичен електрон под действие на различни фактори води до последователно образуване на супероксиден анион, H_2O_2 и хидроксиден свободен радикал, които са токсични - модифицират белтъци, нуклеинови киселини и мембранни липиди. Това може да допринесе за стареенето и някои дегенеративни болести. За обезвреждането на тези активни производни на кислорода, в организма има специални ензими - супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза с кофактор глутатион, каталаза. Редуцираната форма на глутатион се поддържа с НАДФН и други редуктори (антиоксиданти) като витамин С, β -каротен и др.

5.5.2 Топлопродукция

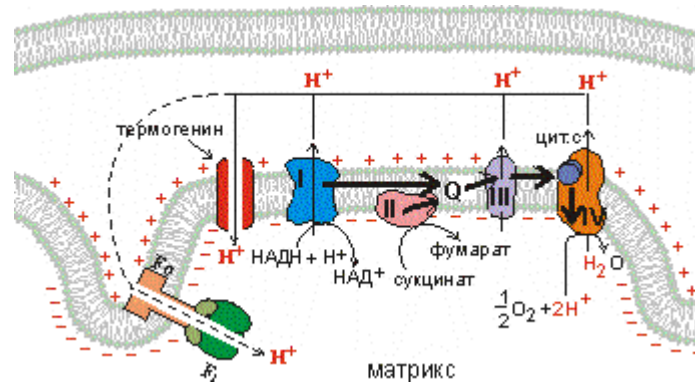
Наред със спрегнатото окисление в клетките се извършва и свободно (неспрегнато) окисление. При него отделената енергия не се акумулира в макроергични съединения, а се превръща в топлина, което е важно за поддържане на постоянна телесна температура в топлокръвните организми. Освен за топлопродукция свободното окисление има значение и за метаболизма (виж т. 5.5.3).

При изследване на експериментални животни (гълъби), се забелязва, че те поглъщат 2 - 4 пъти повече кислород. Това голямо увеличение на дишането се осъществява чрез включване на основния дихателен апарат на клетките, т.е. митохондриите дихателни вериги и преминаването им в разпрегнато състояние. Митохондриите на мускулна и кафява мастна тъкан много бързо се разпрегват при изследване. При излизане от топла стая на студено, в първите минути неволно потреперваме. Мускулните влакна се съкращават, като използват наличния АТФ. Това трае минути и е достатъчно за пренастройване на дихателните вериги от спрегнато в разпрегнато състояние. Под влияние на студа от студовите рецептори по кожата се изпраща сигнал в централната нервна система, откъдето пък се сигнализира за отделяне на хормона адреналин, който активира липазата в мастна тъкан. Липазата разгражда мастите до висши мастни киселини (ВМК) и глицерол. ВМК действат разпрегващо върху митохондриите дихателни вериги в мускулите.

В повечето бозайници, вкл. и човека, при новородени има особена кафява мастна тъкан, чиято главна задача е да продуцира топлина за бебето. Тя е разположена отзад на врата на бебетата. Кафявият цвят идва от присъствието на голям брой митохондрии, и следователно голямо количество цитохроми, чиито хемни групи силно поглъщат видима светлина. В кафявата мастна тъкан митохондриите са практически винаги разпрегнати поради високите концентрации на висши мастни киселини. Ако към изолирани митохондрии от кафява мастна тъкан се добави албумин, който свързва мастните киселини, не се проявява разпрегващият им ефект и митохондриите стават спрегнати. Спящите зимен сън животни (кафяви мечки, мечки-грizzли) също имат големи количества от тази тъкан.

Митохондриите на кафява мастна тъкан окисляват субстратите, и най-вече мастни киселини, нормално. Електроните по дихателната верига достигат до кислорода, а това е съпроводено с изпомпване на протони от матрикса, както при другите митохондрии. Но митохондриите на кафява мастна тъкан имат уникален белтък термогенин, наричан още разпрегващ белтък. Този вграден във вътрешната мембрана белтък осигурява път за протоните, без да минават през АТФ синтазата (фиг. 5-25). Като резултат от това шунтиране, енергията на окислението не се акумулира в АТФ, а се разсейва като топлина,

което допринася за поддържане на телесната температура. А това е много важно за новородените бебета, които нямат козина както при животните.



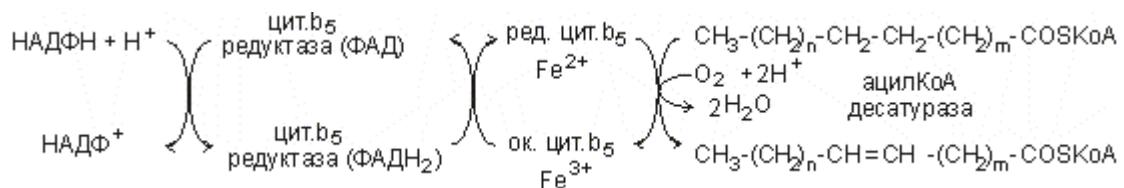
Фиг. 5-25. Действие на разпрягащия белтък термогенин в митохондрии на кафява мастна тъкан.

Дихателната верига изпомпва протони от матрикса в междумембранното пространство. Вместо през АТФ-синтетазния комплекс, протоните се връщат обратно в матрикса през термогенин, който осигурява алтернативен път. Така вместо за синтеза на АТФ, енергията на протонния градиент се разсейва като топлина, т.е. използва се за топлопродукция

5.5.3 Електронен пренос в ендоплазмения ретикулум

Свободното окисление има и метаболитно значение. В ендоплазмения ретикулум има скъсени електропреносителни вериги, които се отличават от досега разгледаните дихателни вериги в митохондриите по следните 3 неща:

- 1) локализация;
- 2) различни компоненти - вместо НАД, по-често НАДФН е донатор на H, вместо известните цитохроми участват други цитохроми - напр. цит. P450, цит. ν_5 ;
- 3) функция - в тях не се произвежда АТФ и топлопродукцията не е главната им задача, макар че известни количества топлина се отделят. В част от веригите се извършва десатурация или получаване на ненаситени мастни киселини (фиг. 5-26), а в други - хидроксилиране на субстрати (фиг. 5-27).



Фиг. 5-26. Скъсена електро-преносителна верига за десатурация на висши мастни киселини, под форма на активни ацил-КоА. Водородните атоми от мастната киселина редуцират единия кислороден атом. Водородните атоми от НАДФН + H⁺ редуцират другия кислороден атом.

Фиг. 5-27. Скъсена електро-преносителна верига за хидроксилиране на субстрати. Единият кислороден атом се

Супероксидът е реактивно вещество, което може да модифицира клетъчни белтъци, нуклеинови киселини и липиди в мембраните и затова е токсичен. За обезвреждане на супероксида има специален ензим **супероксид дисмутаза**. Тя превръща два супероксидни аниона заедно с 2 протона в кислород и H_2O_2 . Дисмутация е реакция, в която 2 идентични молекули се превръщат в различни вещества. Едната молекула се окислява, а другата се редуцира. Супероксид дисмутазата има важна роля в защитата срещу токсичността на кислорода. Среща се във всички аероби и отсъства в облигатни анаероби. Човешките клетки съдържат 2 типа дисмутаза. Цитозолният ензим се състои от 2 идентични субединици, всяка от които съдържа 1 атом мед и 1 атом цинк. Митохондрият ензим съдържа 2 манганови атома за мономерен протеин, както и бактериалната дисмутаза. Интравенозно инжектиране на супероксид дисмутаза е в клинични изпитания при коронарно запушване, за да се намали токсичността на получаващия се супероксид при подобни увреждания.

H_2O_2 е реактивно вещество, което може да модифицира клетъчни белтъци, нуклеинови киселини и липиди в мембраните и затова е токсичен. Обезврежда се, като се превръща в кислород и вода под действие на **каталаза** или **глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза**.

Разтворите на водороден пероксид се използват като дезинфектант и за третиране на раневи инфекции.

Интересно е, че водороден пероксид специално се образува в левкоцити и макрофаги, които убиват бактерии.

Трети токсичен радикал е **хидроксилният свободен радикал**. Той е по-токсичен и по-реактоспособен от другите два. Може да бъде разрушен при реакция с витамин С, бета-каротен и витамин Е. Това е в основата на защитното антиоксидантно действие на тези витамини. Може да бъде разрушен и при реакция с глутатион под действие на глутатион пероксидаза. Редуциран глутатион се осигурява под действие на глутатион редуктаза с коензим НАДФН + H^+ .

5.6 Цитратен цикъл

5.6.1 Резюме

Цитратният цикъл е серия от реакции, в които осем ензима последователно разграждат ацетиловата група на ацетил-КоА до CO_2 и H_2O . Това е съпроводено с отделяне на водород под форма на 3 мола редуциран НАД и 1 мол редуциран ФАД. При окислението на НАДН и ФАДН₂ в дихателните вериги се освобождава и акумулира енергия под форма на АТФ. Освен това 1 мол АТФ се получава на субстратно ниво.

Цитратният цикъл има централна роля в метаболизма. Той е главен катаболитен път за разграждане на въглехидрати, масти и белтъци и главен източник на АТФ - четири негови метаболита доставят водород за дихателните вериги. Той е тясно свързан и с анаболитните процеси. От негови метаболити започват важни синтезни пътища.

Цитрат синтазата катализира кондензацията на ацетил-КоА и оксалацетат, която е екзергонична и необратима реакция.

Аконитазата катализира изомеризирането на цитрат до изоцитрат.

Изоцитрат дехидрогеназата катализира необратимото окислителното декарбоксилиране на изоцитрат до α -кетоглутарат, съпроводено с отделяне на CO_2 и получаване на НАДН.

α -Кетоглутарат дехидрогеназният комплекс катализира необратимото окислително декарбоксилиране на α -кетоглутарат до сукцинил-КоА. Това е единствената реакция в

цикъла, където се получава макроергично съединение на субстратно ниво. Тук се отделя втората молекула CO_2 и се получава НАДН.

Сукцинат тиокиназата (наричана и сукцинил-КоА синтетаза) спряга превръщането на сукцинил-КоА в сукцинат със синтеза на 1 мол АТФ от АДФ и Ф.

Сукцинат дехидрогеназата, част от комплекс II в дихателната верига, дехидрогенира сукцинат до фумарат. Получава се ФАДН₂. Фумарат се хидратира под действие на фумараза до малат.

Малат дехидрогеназата катализира обратимата оксидо-редукция на малат до оксалацетат, който отново може да се включи в цикъла.

Общата равностетка е, че при разграждане на 1 мол ацетил-КоА до CO_2 и H_2O се получават теоретично 12 мола АТФ (или 10 съгласно корекцията на Hinkle).

Регулаторните ензими в цитратния цикъл са тези, които катализират необратимите екзергонични реакции: цитрат синтаза, изоцитрат дехидрогеназа и α -кетоглутарат дехидрогеназният комплекс. Значение за регулацията има и пируват дехидрогеназният комплекс, доставящ ацетил-КоА. Четири витамини от В-комплекс действат като кофактори на регулаторните ензими, а също и на други ензими от цикъла.

Попълващи (анаплеротични) реакции, като напр. лигазното карбоксилиране на пируват до оксалацетат, поддържат необходимата концентрация на оксалацетат и на други междинни метаболити.

При генетично обусловена недостатъчност на пируват дехидрогеназния комплекс (ПДХ) има повишени нива на лактат, пируват и аланин в серума, което води до хронична лактатна ацидоза. При такива пациенти се наблюдават тежки неврологични разстройства, в повечето случаи със смъртен изход. При шок поради намалено снабдяване на тъканите с O_2 също се инхибира ПДХ и се развива лактатна ацидоза. ПДХ може да се активира с дихлорацетат, тъй като той инхибира киназата на ПДХ и не може да се получи неактивната фосфорилирана форма на ПДХ.

5.6.2 Особенности и биологично значение за катаболизма и анаболизма

Като синоними се ползват и названията цикъл на Кребс (по името на откривателя му Ханс Кребс) и цикъл на трикарбоксилите киселини.

Цитратният цикъл е серия от реакции, които водят до разграждане на ацетил-КоА до CO_2 и H_2O . Това е съпроводено с отделяне на водород, при окислението на който в дихателните вериги се освобождава и акумулира енергия под форма на АТФ. Междинните продукти на цикъла действат като катализатори - те вземат участие в реакциите, но концентрацията им остава постоянна.

За цитратния цикъл са характерни следните особености:

- 1) Той е изключително аеробен процес. В отсъствие на кислород не функционира.
- 2) Локализиран е в матрикса на митохондриите, в близост с дихателните вериги.

Цитратният цикъл има централна роля в метаболизма .

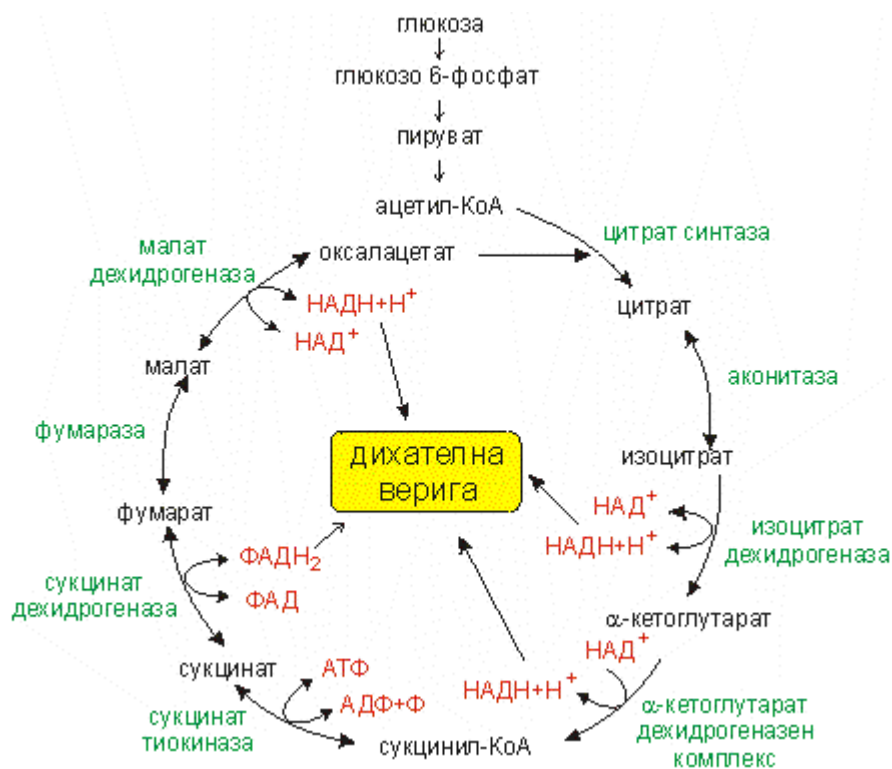
- 1) Той е главен източник на АТФ - четири негови метаболита доставят водород за дихателните вериги;
- 2) Той е главен катаболитен краен път за разграждане на въглехидрати, масти и белтъци; Междинните продукти от разграждането на тези вещества постъпват не само чрез ацетил-КоА, но и чрез α -кетоглутарат, фумарат, сукцинат, оксалацетат.

- 3) Цитратният цикъл е тясно свързан и с анаболитните процеси. От негови метаболити започват биосинтезите на:
- аминокиселини (α -кетоглутарат \rightarrow глутамат, оксалацетат \rightarrow аспартат (има значение за трансаминиране и окислително дезаминиране));
 - порфирини (сукцинил КоА и глицин)
 - въглехидрати - глюконеогенеза (оксалацетат \rightarrow фосфоенолпируват)
 - мастни киселини (реакцията малат \rightarrow пируват осигурява НАДФН); цитратът изнася ацетилови групи от митохондриите в цитоплазмата; а поредицата от реакции цитрат \rightarrow изоцитрат \rightarrow α -кетоглутарат осигурява НАДФН;
 - уреа (за синтеза на урея цитратният цикъл доставя CO_2 и АТФ).

Споменатите процеси се извършват в различни тъкани, но черният дроб е единственият орган, където всички те се извършват в значителна степен. Затова особено тежки за организма са последствията при увреждане на голям брой чернодробни клетки (хепатит или цироза). За значението на цитратния цикъл говори и фактът, че не са описани генетични дефекти за ензимите от цитратния цикъл в живи индивиди - очевидно такива дефекти са несъвместими с нормалното развитие, с живота.

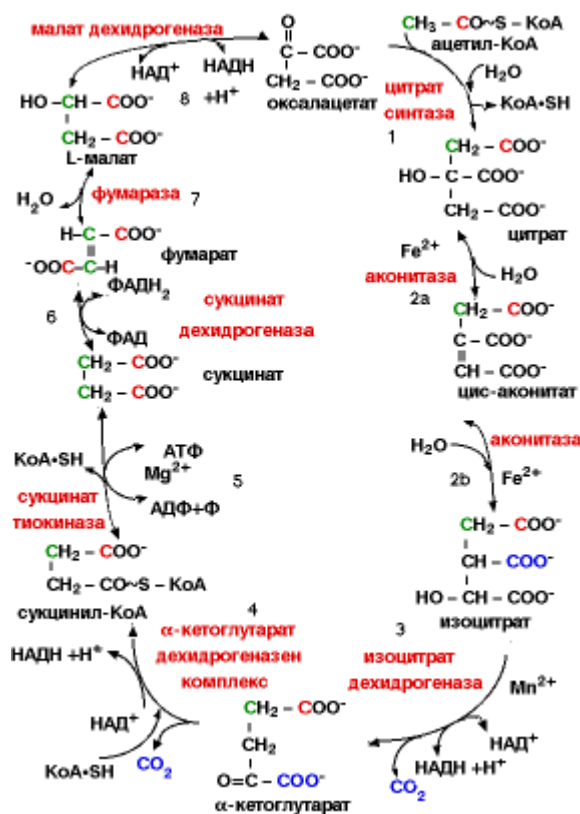
5.6.3 Химизъм на реакциите в цитратния цикъл

р>Обобщен вид на цитратния цикъл е представен на фиг. 5-29.



Фиг. 5-29. Метаболити и реакции в цитратния цикъл в обобщен вид. Показани са реакциите, където се получават редуцирани форми на НАД и ФАД, предаващи водород за дихателните вериги.

Подробно реакциите на цитратния цикъл са представени на фиг. 5-30.



Фиг. 5-30. Реакции на цитратен цикъл:

1 - Кондензация на оксалацетат и ацетил-КоА до цитрат; 2 - Превръщане на цитрат в изоцитрат; 3 - Окислително декарбосилиране на изоцитрат (като β-хидроксикиселина) до α-кетоглутарат; 4 - Окислително декарбосилиране на α-кетоглутарат (като α-кетокиселина) до сукцинил-КоА; 5 - Энергията, акумулирана в макроергичната връзка на сукцинил-КоА се пренася върху АДФ и се получава сукцинат и АТФ на субстратно ниво; 6 - Дехидрогениране на сукцинат до фумарат; 7 - хидратиране на фумарат до малат; 8 - дехидрогениране на малат до оксалацетат.

Цикълът започва с кондензация на ацетилКоА с оксалацетат под действие на цитрат синтаза при участие на молекула вода и отделяне на Ко. Образува се С-С връзка между С от метиловата група на ацетилКоА и карбонилния С от оксалацетат. Получава се цитрат. Енергетично тази необратима реакция ($\Delta G_1^{0'} = -31.5 \text{ kJ/mol}$) се осигурява от хидролиза на тиоестерната връзка в ацетил-КоА.

Цитратът се превръща в изоцитрат под действие на аконитаза, която съдържа Fe²⁺ под форма на Fe-S кластер. Това става двустъпално - дехидратация до цис-аконитат и рехидратация до изоцитрат. Реакциите са обратими. Цитратът е симетрична молекула, но аконитазата винаги действа върху тази част, която е от оксалацетат. Свързаният цитрат в поне три точки от активния център вече прави молекулата асиметрична. Инхибитор на аконитазата е флуорацетат. При този ензимен блок се натрупва цитрат.

Изоцитратът се дехидрогенира и декарбосилира до α-кетоглутарат под действие на изоцитрат дехидрогеназа. Това е окислително декарбосилиране на β-хидрокси киселина. НО-група на изоцитрат е в β-позиция спрямо -СООН група, която се **декарбосилира**. СО₂ се отделя от оксалацетатната част. Реакцията е необратима ($\Delta G_1^{0'} = -21 \text{ kJ/mol}$). Известни са три изоензима - митохондрийна НАД-зависима изоцитрат дехидрогеназа, която действа в цитратния цикъл и още два НАДФ-зависими изоензими, един в митохондриите и един в цитоплазмата. НАДН отдава Н в дихателна верига, в която се синтезират 3 мола АТФ.

Следва окислително декарбосилиране на α-кетокиселината α-кетоглутарат до сукцинил КоА, чийто молекулен механизъм вече е разгледан (т.5.3.6). Това е третата необратима

реакция в цикъла ($\Delta G_1^{\circ} = -33 \text{ kJ/mol}$). Тук се отделя втората молекула CO_2 . Катализира се от α -кетоглутаратдехидрогеназен комплекс, аналогичен на пируватдехидрогеназния комплекс. Единствено първият ензим е различен - специфичен е за α -кетоглутарат, а не за пируват. Инхибитор на това окислително декарбоксилиране е арсенит, при което се натрупва α -кетоглутарат. Продуктът сукцинил КоА съдържа тиоестерна макроергична връзка, получена на субстратно ниво. Това е единственият пример в цитратния цикъл за енергетично спрягане на субстратно ниво. Освен това полученият НАДН предава Н в дихателна верига, където се получават 3 мола АТФ.

Енергията, акумулирана в сукцинил КоА се пренася върху АДФ - получава се АТФ под действие на ензима сукцинат тиокиназа, наричана още сукцинил КоА синтетаза - от обратната реакция.

В митохондриния матрикс има втора сукцинил КоА синтетаза, специфична за гуаниловите нуклеотиди, но тя не участва в цитратния цикъл. Алтернативна реакция в извънчернодробни тъкани се катализира от сукцинилКоА-ацетоацетат-КоАтрансфераза (тиофороза), в която превръщането на сукцинилКоА до сукцинат е спрегнато с активирането на ацетоацетат в ацетацетилКоА (глава 7).

Следва обратимо дехидрогениране на сукцината до фумарат под действие на сукцинатдехидрогеназа (разглеждана в ензимологията при конкурентно инхибиране с малонат - т. 4.3.4.) и като един от флавопротеините в дихателната верига (т.5.4.3). Водородът от получения ензимно свързан ФАДН₂ се пренася до O_2 , при което се получават 2 мола АТФ. Малонатът действа като конкурентен инхибитор - натрупва се сукцинат. Фумаразата (фумарат хидратаза) катализира обратимо присъединяване на вода към фумарат. Получава се малат. Малатът се дехидрогенира до оксалацетат. Редуцираният НАДН предава Н в дихателна верига - получават се 3 мола АТФ.

5.6.4. Метаболитна и енергийна равностметка

Както личи от фиг. 5-29 и фиг. 5-30, на три места в цитратния цикъл има дехидрогеназни реакции с кофактор НАД, който се превръща в НАДН + H^+ . В тези дихателни вериги, започващи с НАДН, се получават теоретично $3 \times 3 = 9$ мола АТФ (или $3 \times 2.5 = 7.5$ съгласно корекциите на Hinkle). В дихателната верига, започваща със субстрат сукцинат, се получават теоретично още 2 мола АТФ (или 1.5 съгласно корекцията на Hinkle). На субстратно ниво при окислителното декарбоксилиране на α -кетоглутарат до сукцинат се получава още 1 мол АТФ.

Общата равностметка е, че при разграждане на 1 мол ацетил-КоА до CO_2 и H_2O се получават теоретично 12 мола АТФ (или 10 съгласно корекцията на Hinkle).

Общото намаление в свободната енергия е около 881 kJ при моларни концентрации на реагиращите вещества. При енергетично съдържание на една ~ връзка от около 34.5 kJ, синтезираните 12 мола АТФ ще съдържат около 47 % от отделената енергия, което е много висок коефициент на полезно действие. Огромната част от промяната в свободната енергия е за сметка на дихателните вериги - 800 kJ. Остатъкът от около 80 kJ идва от останалите стъпала.

Изоцитрат дехидрогеназата и малат дехидрогеназата са обикновени матриксни субстратни дехидрогенази за разлика от тройния ензимен α -кетоглутарат дехидрогеназен комплекс, където дехидрогенирането се предхожда от декарбоксилиране. Този дехидрогеназен комплекс, както и сукцинат дехидрогеназата са локализираны във вътрешната митохондриална мембрана. Сукцинат дехидрогеназата е част от комплекс II в дихателната верига.

Сумарната реакция за разграждането на ацетил-КоА в цитратния цикъл и свързаните с него дихателни вериги има следния вид:



Цикълът започва с кондензация на ацетил коА и оксалацетат и завършва с регенерация на оксалацетат, като в хода на реакциите оцетната киселина се разгражда до вода и CO_2 . Фактически се разгражда част от оксалацетатната молекула, която се възстановява от внесен ацетат. В четирите окислителни стъпала се отделят 8 атома Н, а в двата етапа на декарбоксилиране се отделят два мола CO_2 . Молекулата на ацетата съдържа 4 атома Н, а в цикъла се отделят 8. Допълнителните 4 атома идват от двете молекули вода, които се включват в цикъла. Така при един оборот на цикъла всъщност се разгражда 1 молекула ацетат и 2 молекули вода. В четирите дихателни вериги се образуват 4 молекули вода, които ангажират 2 молекули кислород.

5.6.5 Роля на витамините

Витамините имат ключова роля за цитратния цикъл.

Четири витамина от В комплекс имат точно определени роли в цитратния цикъл:

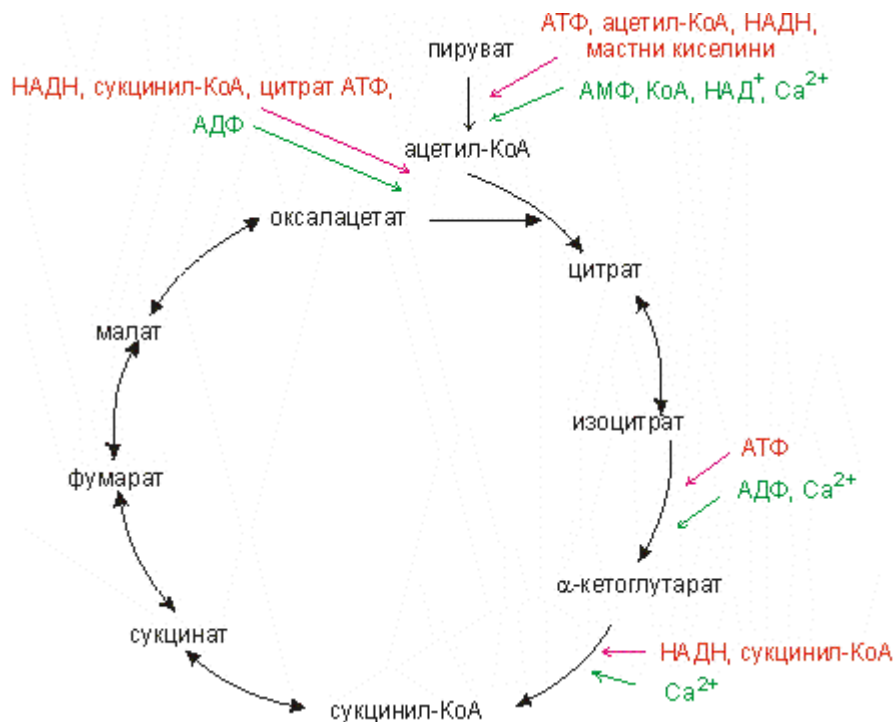
- 1) B_1 - под форма на ТФФ е коензим на първия ензим от α -кетоглутарат дехидрогеназния комплекс;
- 2) B_2 - под форма на ФАД е коензим на третия ензим от α -кетоглутарат дехидрогеназния комплекс и на сукцинат дехидрогеназата;
- 3) пантотенова киселина е част от КоА, който като свободен кофактор поема получените при окислително декарбоксилиране ацетилов и сукцинилов радикали;
- 4) витамин РР - под форма на НАД е коензим на изоцитрат дехидрогеназа, малат дехидрогеназа и α -кетоглутарат дехидрогеназен комплекс, а също и на пируват дехидрогеназния комплекс, който доставя ацетил-КоА за цикъла.

5.6.6 Регулация на цитратния цикъл

Интензитетът на цитратния цикъл е под строг контрол. За разлика от други метаболитни вериги, в които има един скорост-определящ ензим, в цикъла има три регулаторни ензими. Това са цитрат синтаза, изоцитрат дехидрогеназа и α -кетоглутарат дехидрогеназен комплекс. Тези реакции катализират трите силно екзергонични и необратими стъпала в цитратния цикъл. Освен това, значение за регулацията на цитратния цикъл има и пируват дехидрогеназен комплекс (ПДХ), доставящ ацетил-КоА.

Наличието на субстрати, необходимостта от междинните метаболити като биосинтетични прекурсори и изискванията за АТФ са фактори, повлияващи интензитета на цикъла (фиг. 5-31).

Фиг. 5-31.
Регулация на пируват дехидрогеназния комплекс (ПДХ) и цитратния цикъл. Зеленият цвят означава активиране, а червеният - инхибиране.



ПДХ се инхибира алостерично от високи стойности на отношенията $[ATP] / [ADP]$, $[NADH] / [NAD^+]$ и $[acetylCoA] / [CoA]$, които са показатели за наличие на енергия и субстрати. При намаляване на тези отношения АМФ, КоА и NAD^+ активират алостерично ПДХ.

Интензитетът на цикъла се намалява при недостиг на субстратите (оксалацетат и ацетил-КоА) или NAD^+ . Сукцинил-КоА, АТФ и цитрат са алостерични инхибитори на началните реакции. Ca^{2+} сигнализируют мускулното съкращение и стимулират окислителните реакции, при които се отделя и акумулира енергия.

Влияние на отношенията на нуклеотидите: АТФ/АДФ и НАДН/НАД⁺.

Вече знаем какво представлява дихателният контрол (т. 5.4.7). Посредством отношението АТФ/АДФ се регулира интензитета на окисление и окислително фосфорилиране в дихателните вериги. Те от своя страна регулират интензитета и на цитратния цикъл. Активността на цикъла зависи от доставянето на окислени дехидрогеназни кофактори (НАД и ФАД), което пък зависи от наличието на АДФ, т.е. от скоростта на използване на АТФ. Следователно, при наличие на кислород, скоростта на използване на АТФ за работа определя скоростта на окисление и активността на цикъла.

Алостерично повлияване

Ефекторите могат да бъдат нуклеотиди, метаболити от самия цикъл или други вещества. Всички регулаторни дехидрогенази се активират от Ca^{2+} , чиято концентрация нараства при мускулно съкращение и секреция - т.е. при процеси, изискващи енергия. Цитрат синтазата се инхибира алостерично от АТФ и НАДН. Изоцитрат дехидрогеназата се стимулира алостерично от АДФ, а НАДН и АТФ действат като алостерични инхибитори. Пируват дехидрогеназният и α-кетоглутарат дехидрогеназният комплекс се инхибират алостерично от НАДН и ацетилКоА/сукцинил КоА.

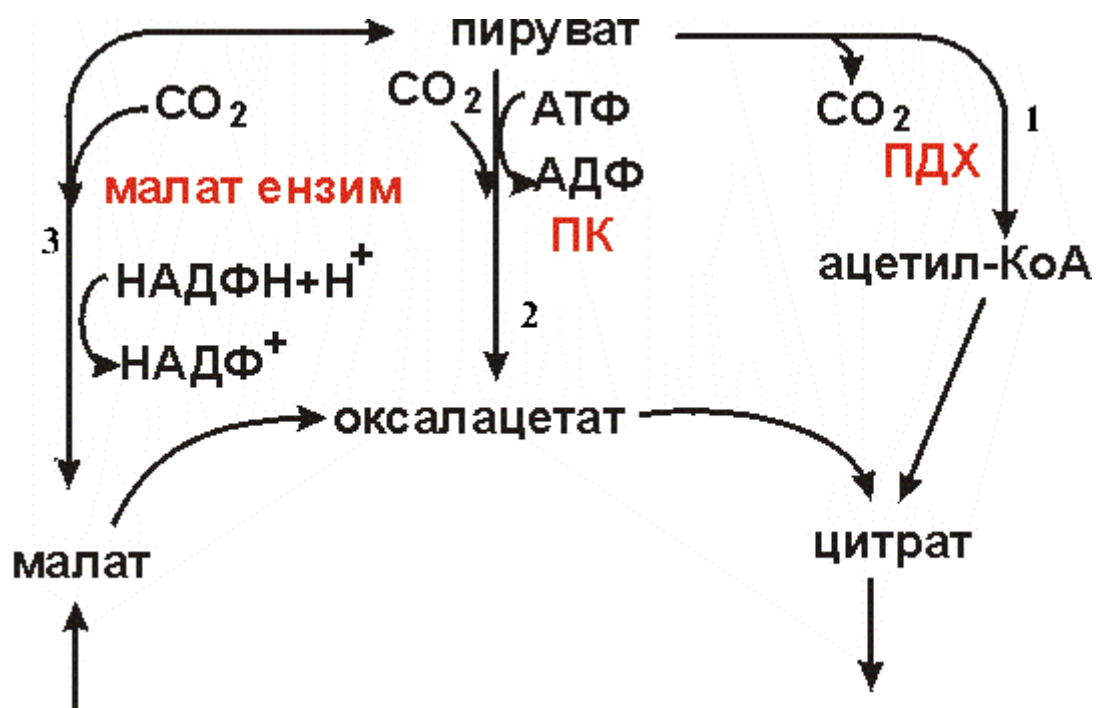
Особено важни за регулацията са субстратите оксалацетат и ацетилКоА. Цитратният цикъл спира, ако няма оксалацетат. Той е ограничаващ метаболит. Интензитетът на цикъла зависи от концентрацията на оксалацетат. Последствията от спиране на цикъла са неблагоприятни - снижава се производството на АТФ и се натрупва в излишък ацетилКоА, от който се получават кетонови тела (глава 7). При голям излишък от кетонови тела се стига до опасно животозастрашаващо състояние - кетоацидоза. За да не се получи всичко това, съществуват т.н. попълващи (анаплеротични) реакции (т. 5.6.7). Ако оксалацетатът е в излишък, той като конкурентен инхибитор инхибира сукцинатдеhidрогеназата.

АцетилКоА е мощен алостеричен активатор на пируват карбоксилазата (глава 6). Цитратът, когато е в излишък, действа като алостеричен инхибитор на фосфофруктокиназата - блокира гликолизата (глава 6), а с това и своето получаване. Освен това, той минава в цитоплазмата и там действа като мощен алостеричен активатор на ацетилКоА карбоксилазата - т.е. стимулира липогенеза (глава 7).

Тази система на контрол и балансиране обезпечават при нормално постъпване и използване на междинните метаболити регулация на биохимичните реакции - за да няма нито излишък, нито недостиг на метаболити. Нарушения на този баланс се получават при гладуване и диабет.

5.6.7 Попълващи (анаплеротични) реакции

Пируватът, освен като източник на ацетил-КоА (реакция 1 на фиг. 5-32), при необходимост може да се превърща и в оксалацетат (реакция 2 на фиг. 5-32). Това е много важна попълваща (анаплеротична) реакция за цитратния цикъл. Тя представлява лигазно карбоксилиране на пируват до оксалацетат.



Фиг. 5-32. Попълващи (анаплеротични) реакции за цитратния цикъл.

Чрез тази реакция се поддържа нивото на оксалацетат, началния задвижващ и краен метаболит на цитратния цикъл. Тази реакция е втора връзка между гликолиза и цитратен цикъл, освен окислителното декарбоксилиране на пируват. Освен това, тя е част от глюконеогенеза (вж т. 6.2.2).

Чрез тази реакция въглехидратите авторегулират своята обмяна, а с това и обмяната на мастите.

Друга реакция с подобна роля е редуktivното карбоксилиране на пируват до малат под действие на малат ензим с кофактор НАДФН (реакция 3 на фиг. 5-32). Тази реакция е обратима, затова малат ензимът има и друго название: НАДФ-зависима декарбоксилираща малат дехидрогеназа.

Попълващи са също реакциите, при които аминокиселини се превръщат в метаболити на цитратния цикъл (глава 8).

5.7. Приложение на познанията в клиничната практика

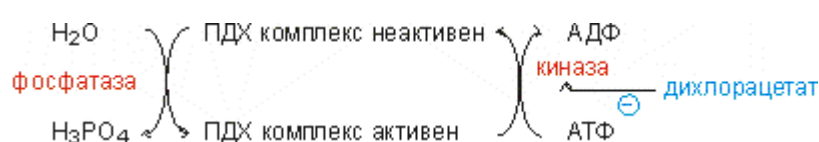
5.7.1. Пируват дехидрогеназна недостатъчност

При деца са описани различни смущения в пируватния метаболизъм, дължащи се на недостатъчност на една или друга каталитична или регулаторна субединица на пируват дехидрогеназния комплекс (ПДХ). Обикновено това води до повишени нива на лактат, пируват и аланин в серума, което води до хронична лактатна ацидоза. При такива пациенти се наблюдават тежки неврологични разстройства и в повечето случаи се стига до смърт.

Диагнозата на пируват дехидрогеназната недостатъчност се поставя обикновено чрез определяне активността на ензимния комплекс и/или активността на отделни субединици в култури от кожни фибробласти, взети от пациент.

В някои случаи пациентите се повлияват добре от кетогенна диета, а въглехидрати се поемат в минимално количество.

Пируват дехидрогеназният комплекс е активен във дефосфорилираната си форма и неактивен във фосфорилираната форма. При шок поради намалено снабдяване на тъканите с кислород се инхибира пируват дехидрогеназния комплекс и се развива лактатна ацидоза. Затова в този случай се дава дихлорацетат, който инхибира киназата на ПДХ комплекс и следователно активира ПДХ комплекс [7] - виж фиг. 5-33.



Фиг. 5-33.

Активиране на пируват дехидрогеназния комплекс чрез дихлорацетат, който инхибира киназата на ПДХ комплекс и не позволява да се получи неактивната фосфорилирана форма на комплекса.

5.7.2. Хипоксични увреждания на тъкани

В процес на разработка

5.8. Материали за самостоятелна работа

1. Изберете **главната страница на "Интерактивни тестове"**. От нея изберете реалния тест "Биоенергетика" в желан от Вас режим.

2. Свалете от сървъра, разархивирайте и проиграйте анимацията на дихателната верига като отворите файла "mito.exe"

[mito.zip](#)

създадена от Jim D. Morton, New Zealand с различни субстрати, инхибитори на електронния транспорт, разпрягащи агенти и инхибитори на окислителното фосфорилиране.

3. Свалете от сървъра, разархивирайте и проиграйте анимацията [rcr.zip](#),

създадена от Jim D. Morton, New Zealand. Изпробвайте различни субстрати и ефектори при симулиране на полярографски запис за измерване на кислородната консумация и дихателен контрол в изолирани митохондрии.

4. Отворете нов прозорец в браузера Netscape Communicator и посетете

<http://www.auhs.edu/netbiochem/>. Разгледайте анимациите на дихателната верига на NetBiochem, чиито URL са дадени по-долу:

[low_atp](http://www.auhs.edu/netbiochem/movies/low_atp.mov) (http://www.auhs.edu/netbiochem/movies/low_atp.mov) и

[high_atp](http://www.auhs.edu/netbiochem/movies/high_atp.mov) (http://www.auhs.edu/netbiochem/movies/high_atp.mov)

Те отразяват спрягането между електронния транспорт, протонната транслокация и синтезата на АТФ.

Браузърът ще ви подсказва с какви допълнителни програми (plug-ins) ще трябва да се снабдите

от Интернет. Анимациите не се виждат с Internet Explorer.

5.9 Литература

1. Николов, Т. Обща биохимия за биолози и биохимици, 1991, Наука и изкуство, София.
2. Montgomery, R., T. Conway, A. Spector. (1996) Biochemistry. A Case-Oriented Approach. The C. V. Mosby Company, St. Louis, Sixth Edition.
3. Murray, R., D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell (1996) Harper's Biochemistry, Prentice-Hall International, Inc., Twenty-Fourth Edition.
4. Lehninger, D., D. Nelson, M. Cox, Principles of Biochemistry (1993) Worth Publishers, Second Edition.
5. Страйер, Л. Биохимия. Пер. с англ. Мир, 1985, т. 2, стр. 60
6. Hinkle, P. C., Kumar, M. A., Resetar, A. and Harris, D. L. Biochemistry, 30, 1991, 3576-3582. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation.
7. Cross, R. L. Ann. Rev. Biochem. 50, 1987, 687.
8. Misra, P. S., Lefevre, A., Ishii, H., Rubin, E. and Lieber, C. S. Am. J. Med. 51, 1971, 346. Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and rats.
9. Patel, M.S. and Haris, R. A. FASEB J. 9, 1995, 1164. Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic diseases.