

Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет імені Івана Франка



Андрій Бабський, Оксана Іккерт, Володимир Манько

ОСНОВИ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Підручник

Львів
2019

УДК 577+57.017.7+591.05+612.014+612.26
Б 12

Автори: А. Бабський, О. Іккерт, В. Манько

Рецензенти: академік НАН України, д-р біол. наук, проф. *С. О. Костерін*
(Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ);
д-р біол. наук, проф. *В. І. Луцак*, канд. біол. наук *Д. В. Господарьов*
(Національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ);
д-р біол. наук, проф. *М. М. Доліба*
(Пенсильванський університет, Філадельфія, США)

*Друкується за ухвалою Вченої ради Львівського національного університету
імені Івана Франка (протокол № 43/12 від 6 грудня 2017 р.)*

Бабський А.

Б 12 **Основи біоенергетики** : підручник [для студ. вищ. навч. закл.] / А. Бабський,
О. Іккерт, В. Манько. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2019. – 312 с. – (Серія
“Біологічні Студії”).

ISBN 978-966-613-752-7 (серія)
ISBN 978-617-10-0422-1

За останні десятиліття біоенергетика як наука досягла феноменальних успіхів у поясненні механізмів клітинної фізіології, причин патологічних відхилень і способів їхньої корекції. Для покращення сприймання складного наукового матеріалу студентами та використання отриманих знань на практиці надзвичайно важливими є систематизація сучасних знань у сфері біоенергетики й актуалізація інтегративної функції енергетичних механізмів, взаємозв'язку атомно-молекулярних процесів (зокрема, у мітохондріях) із фізіологічними функціями тканин, органів і організму в цілому. У підручнику послідовно представлено термодинамічні основи енергетики живого, джерела енергії в хемогетеротрофів, катаболічні процеси перетворення енергетичних субстратів, енергетичні основи фізіологічних процесів, типи мітохондріальних патологій і методи досліджень енергетичних процесів у клітинах і мітохондріях. Наприкінці кожного розділу подано скорочені підсумки викладеного матеріалу, завдання і контрольні питання, список додаткової літератури. Використано напрацювання та методичні підходи найкращих, на думку авторів, закордонних підручників з біоенергетики, матеріали численних монографій і періодичних видань, включно із власними публікаціями за останні 30–35 років.

Для студентів і аспірантів біологічних факультетів університетів, фізіологів, біофізиків, біохіміків, лікарів, фахівців у галузі клітинної біології, а також читачів, які цікавляться процесами енергетичних перетворень у нормі та за патологічних відхилень.

УДК 577+57.017.7+591.05+612.014+612.26

ISBN 978-966-613-752-7 (серія)
ISBN 978-617-10-0422-1

© Бабський А., Іккерт О., Манько В., 2019
© Львівський національний університет
імені Івана Франка, 2019

ЗМІСТ

Список скорочень	7
Від авторів	9
Розділ 1. Біоенергетика як наука	11
1.1. Особливості й закони біоенергетики	11
1.2. Перетворення енергії та загальний обмін речовин	13
1.3. Загальні характеристики метаболізму	19
1.4. Класифікація живих організмів за способом отримання енергії та карбону	21
Розділ 2. Біоенергетика і термодинаміка	25
2.1. Закони термодинаміки	25
2.2. Термодинамічні показники змін енергії	26
2.3. Адитивність змін вільної енергії послідовних хімічних реакцій	31
2.4. Основи термодинаміки необоротних процесів	33
Розділ 3. Будова і функції мітохондрій	37
3.1. Розподіл і локалізація мітохондрій у клітині	37
3.2. Розміри, форма й ультраструктура мітохондрій	40
3.3. Взаємозв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикулумом	43
3.4. Мітохондріальна ДНК	45
Розділ 4. АТФ як джерело енергії	51
4.1. Скільки АТФ утворюється в організмі?	52
4.2. Зміна стандартної вільної енергії у реакції гідролізу АТФ ...	54
4.3. Постачання енергії від АТФ способом перенесення групи ...	56
4.4. Енергетична та регуляторна роль аденілаткінази й АМФ-залежної кінази	60
4.5. Інші макроергічні сполуки	63
Розділ 5. Окисно-відновні реакції у біологічних системах	69
5.1. Окисно-відновні пари	69
5.2. Способи передачі електронів у окисно-відновних реакціях ..	70
5.3. Окисно-відновний потенціал	71
5.4. Роль піридинових і флавінових нуклеотидів у окисно-відновних реакціях	74

Розділ 6. Гліколіз і енергетичний метаболізм вуглеводів	81
6.1. Гліколіз.....	83
6.1.1. Загальна характеристика.....	83
6.1.2. Перша стадія	85
6.1.3. Друга стадія.....	87
6.1.3. Енергетичний баланс гліколізу.....	91
6.2. Глікоген як форма зберігання глюкози	93
6.3. Глюконеогенез.....	94
6.4. Пентозофосфатний шлях	96
Розділ 7. Енергетика жирового обміну	101
7.1. Жирні кислоти і триацилгліцероли	101
7.2. Активація і транспорт жирних кислот	102
7.3. β -Окиснення жирних кислот	105
7.4. Енергетична цінність окиснення жирних кислот	108
7.5. Кетоніві тіла	109
Розділ 8. Катаболізм білків і амінокислот	115
8.1. Класифікація і структура амінокислот	116
8.2. Катаболізм амінокислот	118
8.3. Використання амінокислот у полярографічних і ЯМР дослідженнях	122
Розділ 9. Цикл Кребса	127
9.1. Піруватдегідрогеназний комплекс	127
9.2. Реакції циклу Кребса.....	129
9.3. Зберігання енергії, вивільненої у циклі Кребса.....	132
9.4. Метаболіти циклу Кребса як біосинтетичні субстрати	133
9.5. Регуляція циклу Кребса	136
Розділ 10. Будова і функції дихального ланцюга мітохондрій	143
10.1. Перенесення електронів дихальним ланцюгом	143
10.2. Мультиферментні комплекси дихального ланцюга	144
10.3. Протонний градієнт як форма зберігання енергії.....	152
Розділ 11. Синтез АТФ у процесі окисного фосфорилування	159
11.1. Теорії спряження дихання й окисного фосфорилування	159
11.2. Будова АТФ-синтази.....	164
11.3. Ротаційний каталіз синтезу АТФ.....	166
11.4. Співвідношення між спожитим O_2 та синтезованим АТФ	168

11.5. Транспортні процеси крізь внутрішню мембрану мітохондрій за синтезу АТФ	169
Розділ 12. Мітохондрії й активні форми кисню	175
12.1. Загальна характеристика й джерела активних форм кисню в клітині.....	175
12.2. Процеси пероксидного окиснення ліпідів: механізми, фізіологічне та патологічне значення.....	179
12.3. Антиоксидантний захист клітини	182
Розділ 13. “Бурштинова” енергетика	191
13.1. Структура та властивості сукцинату і сукцинатдегідрогенази	191
13.2. Нові дані про функціональну та структурну організацію циклу Кребса.....	194
13.3. Лімфоцити крові як “вікно” в енергетику організму	199
13.4. Терапевтична дія сукцинату	202
Розділ 14. Транспортувальні системи мітохондрій	209
14.1. Активний і пасивний транспорт речовин крізь біологічні мембрани.....	210
14.2. Загальна характеристика транспортувальних систем у мітохондріях	211
14.3. Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій.....	215
Розділ 15. Енергетика руху	225
15.1. Енергетика скелетних м’язів	225
15.2. Енергетичне забезпечення роботи серця.....	235
15.3. Рух війок і джгутиків	235
Розділ 16. Біоенергетичні основи секреторних і нейрогуморальних процесів	241
16.1. Енергетичні процеси за секреції інсуліну	242
16.2. Механізми секреції хлоридної кислоти	246
16.3. Енергетичне забезпечення передавання нервових імпульсів	248
16.4. Теорія субстратно-гормональних систем	250
Розділ 17. Мітохондріальні хвороби	257
17.1. Спадкові мітохондріальні хвороби.....	257
17.2. Порушення біоенергетичних процесів і їхня роль у розвитку інших захворювань.....	262

17.2.1. Рак	262
17.2.2. Мітохондрії та пошкодження серця за ішемії та реперфузії	266
17.2.3. Мітохондрії, β -клітини і діабет	269
17.2.4. Мітохондрії, інсульт і глутаматна токсичність	271
Розділ 18. Методи клітинної біоенергетики	277
18.1. Виділення мітохондрій методом диференціовального центрифугування	277
18.2. Ізолювання гепатоцитів	278
18.3. Ізолювання ацинарних клітин підшлункової залози	279
18.4. Ізолювання кардіоміоцитів	279
18.5. Визначення активності ферментів	279
18.6. Полярнографічний метод	282
18.7. рН-Метричний метод	287
18.8. Метод ядерно-магнітного резонансу	289
18.9. Позитронно-емісійна томографія	294
Іменний показчик	299
Предметний показчик	300

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АДФ	– аденозиндифосфат
АДФ/О	– ефективність окисного фосфорилювання
АМФ	– аденозинмонофосфат
АМФК (АМРК)	– 5'-АМФ-залежна протеїнкіназа
АОА	– амінооксіацетат
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФО	– активні форми кисню
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
ГДФ	– гуанозиндифосфат
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ГМГ-КоА	– гідроксиметилглутарил-КоА
ДНФ	– 2,4-динітрофенол
ЕГТА	– етиленгліколь-тетраацетат
ЕТФ	– електронтранспортувальний флавопротеїн
ІФ ₃	– інозитол-3-фосфатчутливі Ca ²⁺ -канали
ІЦДГ	– ізоцитратдегідрогеназа
α-КІДГ	– α-кетоглутаратдегідрогеназа
ККД	– коефіцієнт корисної дії
КоА	– кофермент А
НАДН	– нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлений)
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
ПДГ	– піруватдегідрогеназа
ПЕТ	– позитронно-емісійна томографія
ПТП	– пора транзйєнтної проникності
СОД	– супероксиддисмутаза
ТЗМ	– транслоказа зовнішньої мембрани
ФАДН ₂	– флавінаденіндинуклеотид
Ф _n	– фосфор неорганічний
ФЕП	– фосфоенолпіруват
ФФК-1	– фосфофруктокіназа-1
цАМФ	– циклічний аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклічний гуанозинмонофосфат
ЦС	– цитратсинтаза
ЯМР	– ядерно-магнітний резонанс
АК1-АК7	– адєнілаткіназа (ізоформи)
АКТ1	– протеїнкіназа В
ЕААТs	– транспортери амінокислот
FCSP	– карбоніліціанід-р-трифторметоксифєнілгідразон
FID	– спад вільної індукції (free induction decay)
GLUT	– транспортер глюкози (glucose transporter)

GSH	– відновлений глутатіон
GSSG	– окиснений глутатіон
HbF	– фетальний гемоглобін
HEPES	– 4-2 (гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонат
HIF-1	– гіпоксієіндукуючий фактор-1 (hypoxia-inducible factor-1)
IGF-1	– інсуліноподібний фактор росту
IRS-1	– субстрат інсулінового рецептора-1 (insulin receptor substrate-1)
LKB1	– кіназа печінки B1 (liver kinase B1)
MAM	– асоційовані з мітохондріями мембрани ендоплазматичного ретикулуму (mitochondria-associated ER membrane)
MCU	– Ca^{2+} -уніпортер
MELAS	– синдром MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)
MERRF	– синдром MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibres)
MFN	– мітофузини
NMDA	– N-метил-D-аспартат
mRyR	– мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали
mTOR	– серин/треонінова протеїнкіназа
NaDC	– натрій-дикарбоксилатні котранспортери
PGC-1 α	– пероксомний коактиватор проліферативного γ -рецептора (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α)
TIGAR	– регулятор гліколізу й апоптозу
TIM	– транслоказа внутрішньої мембрани мітохондрії (translocase of the inner membrane)
Oxa-1	– асоційована з білком оксидаза-1 (oxidase assembly protein-1)
RaM	– система швидкого поглинання іонів кальцію (rapid mode of Ca^{2+} uptake)
RF	– радіочастотний імпульс (radio frequency)
ROS	– активні форми кисню, АФО (reactive oxygen species)
SERCA	– Ca^{2+} -помпа сарко/ендоплазматичного ретикулуму (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)
TE	– час відлуння (echo-time)
TIM	– транслоказа внутрішньої мембрани (translocase of the inner membrane)
TNF	– фактор некрозу пухлин (tumot necrotic factor)
TSC2	– суберин (tuberous sclerosis protein 2)
TSPO	– білок-транслокатор
VACC	– потенціалкерований Ca^{2+} -канал
VDAC	– потенціалозалежні аніонні канали (voltage dependent anion channels)
UCP	– роз'єднувальний білок (uncoupling protein)

ВІД АВТОРІВ

Дослідження біоенергетичних процесів проводяться на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського університету імені Івана Франка з 60-х років ХХ ст. Піонерами цих досліджень під керівництвом проф. Ірини Шостаковської були Михайло Тимочко і Степан Гордій. Особлива увага зверталася на енергетичні процеси в печінці й інших органах травної системи тварин. Із 1970-х років кафедра фізіології людини і тварин тісно співпрацювала з лабораторією проф. Марії Кондрашової Інституту біофізики АН СРСР в Пушино, що суттєво розширило спектр досліджуваних тканин і органів (серце, головний мозок, скелетні м'язи) та концептуальне сприйняття отриманих результатів. Принципово новий етап досліджень розпочався у 1990-х роках, коли співробітники кафедри (Микола Доліба, Андрій Бабський, Марко Ватаманюк, Оксана Горинь) отримали змогу працювати в таких елітних американських університетах як Пенсильванський у Філадельфії, Індіанський в Індіанapolisі та Корнельський в Ітаці, відомих своїми успіхами у дослідженні енергетичних процесів, зокрема, із залученням методу ядерно-магнітного резонансу.

Для студентів біологічного факультету основи знань з біоенергетики викладали на кафедрі в загальному курсі “Фізіологія людини і тварин” та спецкурсі “Фізіологія клітини”. Перший спеціалізований курс із біоенергетики у Львівському університеті імені Івана Франка був запроваджений Андрієм Бабським з 1992 р. Цей курс читали під різними назвами (“Біоенергетика”, “Основи біоенергетики”, “Біоенергетичні основи фізіологічних процесів”) також Степан Гордій та Оксана Іккерт.

За більш ніж півстолітню історію досліджень з біоенергетичної тематики на кафедрі фізіології людини і тварин захищено чотири докторські та понад 20 кандидатських дисертацій. Отримані результати стали однією з підвалин загальновизнаної наукової школи “Біоенергетика та електрофізіологія секреторних клітин”, засновниками якої заслужено вважають професорів Ірину Шостаковську та Мирона Клевця.

За останні десятиліття біоенергетика як наука досягла феноменальних успіхів у поясненні механізмів клітинної фізіології, причин патологічних відхилень і способів їхньої корекції. Тому надзвичайно актуальними є систематизація сучасних знань у цих сферах, їхнє представлення у доступній сучасним студентам формі. Це повинно покращити як сприймання матеріалу студентами, так і використання отриманих знань на практиці. Незважаючи на те, що знання основ енергетичних процесів у живих організмах викладають практично в усіх вітчизняних університетах, на сьогодні спеціалізованого підручника з біоенергетики українською мовою немає.

У нашому підручнику послідовно представлено термодинамічні основи енергетики живого, джерела енергії в хемогетеротрофів, катаболічні процеси перетворення енергетичних субстратів, енергетичні основи фізіологічних процесів, типи мітохондріальних патологій, методи досліджень енергетичних процесів у клітинах і мітохондріях. Наприкінці кожного розділу подано скорочені підсумки представленого матеріалу, завдання і контрольні питання, перелік додаткової літератури. Ми використали деякі напрацювання та підходи із найкращих, на нашу думку, закордонних підручників [Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основи біохімії за Ленінджером, 2016; Nicholls D.G., Ferguson S.J. Bioenergetics, 2013; Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика, 2010], матеріали численних монографій та періодичних видань, включно із власними публікаціями за останні 30–35 років. Особливу увагу ми намагалися звертати на інтегративну функцію енергетичних процесів, взаємозв'язок атомно-молекулярних процесів (зокрема, у мітохондріях) із фізіологічними функціями тканин, органів і організму загалом.

Підручник розрахований на студентів і аспірантів біологічних факультетів університетів, фізіологів, біофізиків, біохіміків, лікарів, фахівців у галузі клітинної біології, а також на читачів, які цікавляться процесами енергетичних перетворень у нормі та за патологічних відхилень.

Будемо вдячні читачам за їхні побажання, уточнення і критику, які ми обов'язково візьмемо до уваги у майбутньому перевиданні підручника.

БІОЕНЕРГЕТИКА ЯК НАУКА

- Особливості й закони біоенергетики
- Перетворення енергії та загальний обмін речовин
- Загальні характеристики метаболізму
- Класифікація живих організмів за способом отримання енергії та карбону

Найважливіша властивість живих організмів полягає у їхній здатності отримувати, перетворювати і запасати енергію в різних формах. Різноманітні форми прояву життя нерозривно пов'язані з енергетичним обміном. Нормальна життєдіяльність організму, необхідною умовою якої є сталість внутрішнього середовища, потребує затрат енергії. Саме енергетичний обмін є показником загального стану та фізіологічної активності організму.

1.1. ОСОБЛИВОСТІ Й ЗАКОНИ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Біоенергетика – це галузь біології, яка за допомогою кількісних методів вивчає механізми отримання, перетворення та використання енергії живими клітинами у процесах життєдіяльності організмів.

За Володимиром Скулачовим, біоенергетика є однією з чотирьох основних функцій живого – разом із генетикою, метаболікою та сенсорикою (рис. 1.1). У ній застосовують біологічні, фізико-хімічні та комп'ютерні методи дослідження і підходи, але її завдання є суто біологічними. Вона досліджує живу матерію на різних рівнях організації – від молекулярного до біосферного. Тому біоенергетика тісно пов'язана з біофізикою, біохімією, молекулярною та клітинною біологією, фізіологією, екологією, а також із фізикою, хімією та іншими науками.

Біоенергетика зосереджується над розв'язком трьох визначальних питань: 1) що є джерелом енергії; 2) як енергія перетворюється і нагромаджується; 3) як енергію використовують.

Біоенергетика має важливе теоретичне та практичне значення. Її теоретичне значення полягає у формуванні уявлень про: 1) способи перетворення та

механізми використання енергії живими організмами; 2) зміни енергетичних процесів у організмі; 3) зміни в роботі організму чи окремих його фізіологічних систем за умов порушення процесів перетворення і використання енергії. З теоретичного значення біоенергетики випливає її практичне застосування у медицині, ветеринарії, геронтології, фізіології та біохімії спорту, фізіології екстремальних станів тощо.

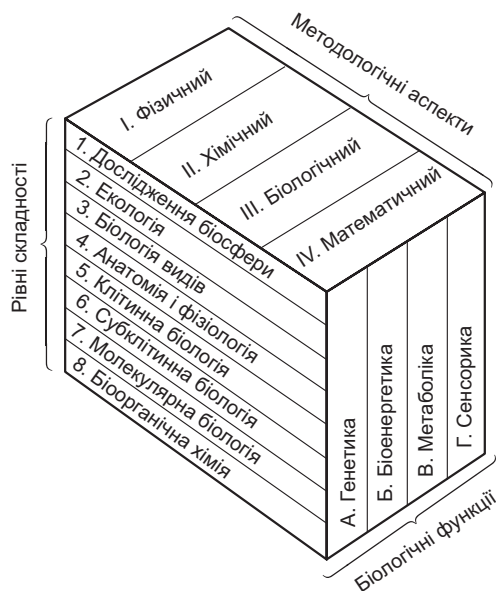


Рис. 1.1. Місце біоенергетики у системі біологічних наук [за Скулачовим В.П., 1989]

Дослідження у біоенергетиці ґрунтуються на застосуванні законів фізики й хімії стосовно біологічних систем. Однак складність і специфічність біологічних структур та процесів, що в них відбуваються, зумовлюють низку глибоких відмінностей між біоенергетикою й енергетикою неживої природи. **Перша фундаментальна особливість біологічної енергетики** зумовлена тим, що організми – це термодинамічно відкриті системи, які функціонують лише за умови постійного обміну енергією і речовиною з навколишнім середовищем. **Друга особливість біоенергетики** пов'язана з тим, що процеси в живих клітинах відбуваються за відносно стабільних умов, коли немає суттєвих перепадів температури, тиску й об'єму. У такому разі перехід теплоти в роботу в організмі неможливий, і тепловиділення є фактично втратою енергії. В організмах є специфічні механізми прямого перетворення однієї форми вільної енергії на іншу, оминаючи її перехід у тепло. Частина енергії, що вивільняється, перетворюється на тепло і втрачається. Інша частина перетворюється на вільну хімічну енергію особливих сполук, енергію осмотичного, концентраційного й електричного градієнтів клітинної мембрани та є надзвичайно мобільною, тобто може й за постійної температури перетворюватися на інші форми і використовуватися для виконання біологічної роботи з досить високим к.к.д.

Професор В. П. Скулачов сформулював три закони біоенергетики:

1. Жива клітина уникає прямого використання енергії зовнішніх ресурсів для здійснення корисної роботи. Вона спочатку перетворює їх на одну із трьох конвертованих форм енергії (“енергетичних валют”), а саме на АТФ, $\Delta\mu_{\text{H}}$ або $\Delta\mu_{\text{Na}}$, які потім використовує для здійснення різних процесів, що потребують енергії.
2. Будь-яка жива клітина має як мінімум дві “енергетичні валюти” – водорозчинну (АТФ) і зв’язану з мембранами ($\Delta\mu_{\text{H}}$ або $\Delta\mu_{\text{Na}}$).
3. “Енергетичні валюти” клітини можуть перетворюватись одна на одну¹. Тому отримання бодай однієї з них достатньо для підтримання життєдіяльності клітин.



Енергетичні процеси всіх живих організмів – від бактерій до людини – мають спільні риси. Це означає, що процеси та механізми, за допомогою яких здійснюється акумулювання і використання енергії, принципово не відрізняються.

1.2. ПЕРЕТВОРЕННЯ ЕНЕРГІЇ ТА ЗАГАЛЬНИЙ ОБМІН РЕЧОВИН

Енергетичний обмін організму – це сукупність процесів перетворення різних форм енергії між собою, а також нагромадження і використання макроергічних сполук. Він тісно пов’язаний з обміном речовин (метаболізмом). Зокрема, вивільнення енергії хімічних зв’язків органічних речовин відбувається у процесі катаболізму білків, жирів і вуглеводів. Переважна частина (75–80 %) цієї енергії відразу розсіюється у вигляді тепла. Решта енергії резервується у вигляді макроергічних зв’язків молекули АТФ і трансмембранних іонних градієнтів та може використовуватися для здійснення корисної роботи в організмі, наприклад, для синтезу клітинних і тканинних структур (анаболізму) чи виконання механічної роботи. Практично всі види енергії хімічних зв’язків, яка витрачається на виконання зовнішньої, теплової чи електричної роботи, теж врешті-решт перетворюються на теплоту, тому загальну інтенсивність енергетичного обміну можна визначати за кількістю виділеної організмом теплоти.

Класичне вимірювання енергетичного обміну здійснюють за допомогою методу **прямої калориметрії** (рис. 1.2). Вона базується на безпосередньому оцінюванні в біокалориметрах кількості тепла, що виділяється організмом.

¹ Енергія $\Delta\mu_{\text{Na}}$ використовується для синтезу АТФ у деяких морських бактерій, наприклад, у *Propionigenium modestum*. У клітинах тварин $\Delta\mu_{\text{Na}}$ безпосередньо використовується для транспорту глюкози, амінокислот і деяких іонів

У калориметрі Етуотера–Бенедикта утворене людиною тепло вимірюється за допомогою термометрів по нагріванню води, яка протікає по трубках у камері. Кількість води вимірюють у баку. За допомогою помпи повітря відкачують із камери і проганяють крізь баки зі сірчаною кислотою – для поглинання води і з натронним вапном² – для поглинання вуглекислоти. Кисень подають із балона. Тиск у камері підтримують сталим за допомогою пристрою з гумовою мембраною.

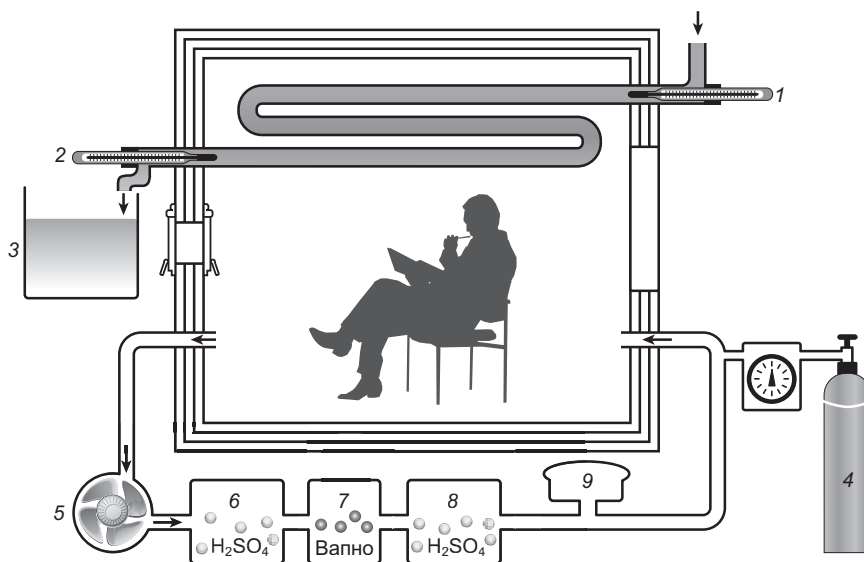


Рис. 1.2. Схема калориметра Етуотера–Бенедикта: 1, 2 – термометри для вимірювання тепла, утвореного людиною; 3 – бак з водою; 4 – кисневий балон; 5 – помпа для видачування повітря із камери; 6, 8 – баки зі сірчаною кислотою; 7 – бак із натронним вапном; 9 – мембрана для підтримання тиску в камері

Цей метод дав змогу встановити, що живі організми підпорядковуються тим самим законам збереження енергії, що й неживі системи. Наприклад, кількість тепла, виділеного організмом, відповідає енергетичній цінності спожитих і окиснених поживних речовин.

Беручи до уваги, що в основі теплоутворення лежать окисні процеси, за яких споживається O_2 і утворюється CO_2 , є можливість непрямої калориметрії за газообміном організму та середовища. З цією метою для тварин використовують спеціальні респіраторні камери конструкції Шатерникова (рис. 1.3). За допомогою помпи (П) повітря відкачують із камери (К), а змішувик (З) охолоджує повітря. Колонка із лугом (Л) використовується для поглинання CO_2 , а балон (Б) – для поглинання водяної пари кальцій хлоридом. Кисень автоматично подається в камеру, і зміни температури вимірюють термометрами (Т).

² Суміш $NaOH$ і $Ca(OH)_2$

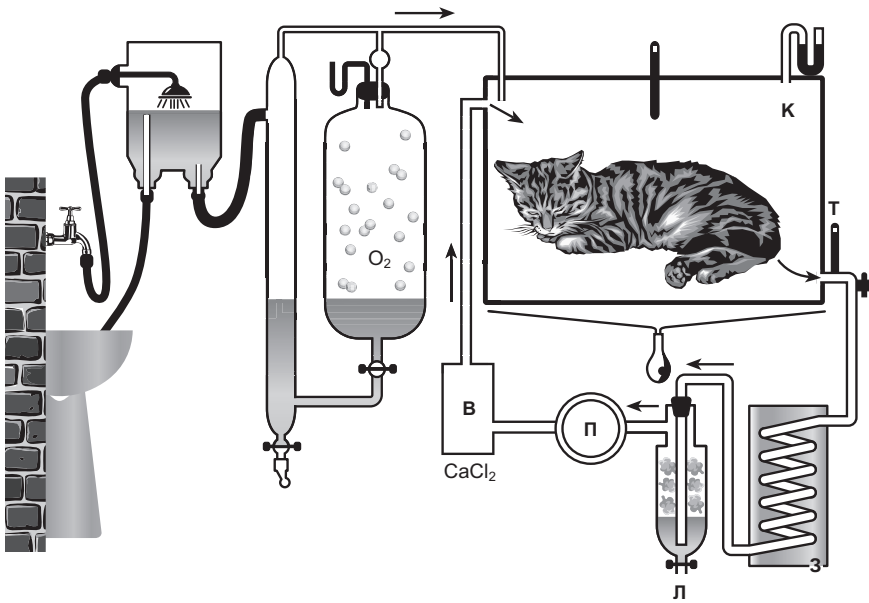


Рис. 1.3. Респіраторний апарат Шатерникова: К – камера; П – помпа, що викачує повітря з камери; З – змієвик, що охолоджує повітря; Л – колонка з лугом для поглинання CO_2 ; В – балон для поглинання водяної пари хлоридом кальцію. Зліва – пристрій для автоматичного подання кисню в камеру; Т – термометри

Для людей створено схожий за принципом апарат конструкції Дугласа–Голдейна (рис. 1.4). У горизонтальній трубці, що з'єднана із загубником, містяться клапани, які дають змогу вдихати атмосферне повітря і видихати повітря у мішок.

Поглинтий організмом кисень використовується для окиснення білків, жирів і вуглеводів. Окиснювальний розпад 1 г кожної із цих речовин потребує неоднакової кількості кисню (табл. 1.1).

Найбільше енергії вивільняється за окиснення жирів і, відповідно, за цих умов споживається найбільша кількість кисню. Знаючи загальну кількість кисню, спожитого організмом, можна обчислити енергетичні затрати лише тоді, коли відомо, які саме речовини – білки, жири чи вуглеводи – окиснювалися. Показником, який дає змогу встановити це, є **дихальний коефіцієнт**.



Рис. 1.4. Респіраторний апарат Дугласа–Голдейна

Таблиця 1.1

Енергія та споживання кисню за окиснення поживних речовин

Поживні речовини	За окиснення 1 г поживних речовин		Вивільняється енергії за споживання 1 л кисню, кДж	Дихальний коефіцієнт
	вивільняється енергії, кДж	споживається кисню, л		
Білки	17,2	0,97	19,3	0,8
Жири	39,9	2,02	19,6	0,7
Вуглеводи	17,2	0,83	21,1	1

Дихальний коефіцієнт – це співвідношення об'єму виділеного CO_2 до об'єму поглинутого O_2 за окиснення різних речовин.

Наприклад, глюкоза може окиснюватися до оксиду карбону та води у такій реакції:



Як бачимо, кількість виділеного CO_2 дорівнює кількості поглинутого O_2 . Згідно з законом Авогадро–Жерара рівні кількості газів за сталої температури і тиску займають однаковий об'єм. Отже, дихальний коефіцієнт для глюкози (як й інших вуглеводів) дорівнює одиниці.

За окиснення жирів дихальний коефіцієнт нижчий. Наприклад, за окиснення трипальмітину співвідношення CO_2 (102) до O_2 (145) становить 0,703. Дихальний коефіцієнт за окиснення білків дорівнює 0,8, а за традиційно змішаної їжі – 0,85–0,9.

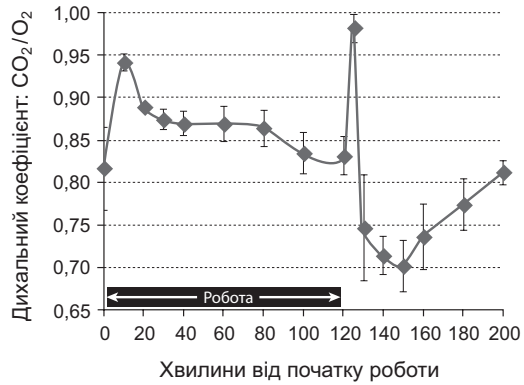
Відповідному дихальному коефіцієнтові відповідає певний калоричний еквівалент кисню.

Калоричний еквівалент кисню — це кількість теплоти, що вивільнюється в організмі у результаті споживання 1 л кисню.

Якщо усереднений дихальний коефіцієнт за умови споживання традиційно змішаної їжі дорівнює 0,85, то калоричний еквівалент 1 л кисню у цьому разі дорівнює 20,4 кДж.

Цікаві зміни дихального коефіцієнта спостерігають за інтенсивної роботи скелетних м'язів (рис. 1.5). На початку роботи він збільшується майже до одиниці, оскільки в цей період використовуються переважно вуглеводи. Потім трохи зменшується, а після зупинки роботи спостерігають різке збільшення дихального коефіцієнта, який змінюється швидким зменшенням нижче початкового рівня. Відновлення дихального коефіцієнта до початкового рівня триває 30–50 хв.

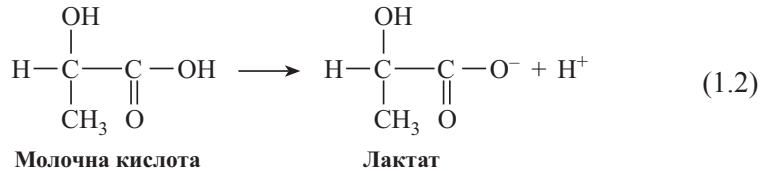
Рис. 1.5. Зміни дихального коефіцієнта під час двогодинної інтенсивної роботи і після неї. $M \pm m$, $n = 4$ [за даними: Бабский Е.Б. и др., 1985]



Підвищення дихального коефіцієнта відразу після роботи зумовлене інтенсифікацією дихання для ліквідації кисневого боргу.

Кисневий борг – це додаткове споживання O₂ після фізичного навантаження, яке забезпечує відновлення витрачених під час роботи запасів енергії.

Під час тривалого фізичного навантаження у м'язах нагромаджується молочна кислота, на окиснення якої не вистачило кисню (кисневий борг). Вона дисоціює на лактат і протон:



Продукти дисоціації молочної кислоти – лактат і протон монокарбоксилатним транспортером надходять у кров. Для запобігання ацидозові вивільнений протон реагує з гідрокарбонатом плазми крові¹ з утворенням карбонової кислоти, яка в еритроцитах дисоціює на оксид карбону і воду:



Завдяки цьому кількість виділеного легеннями з організму CO₂ більша за кількість CO₂, що утворився на цей момент у тканинах.

Далі переважна кількість лактату (60 %) окиснюється у печінці до CO₂ та H₂O, перетворюється на глікоген і/або амінокислоти (35 %), а приблизно 5 % виділяється зі сечею та потом. Тому дихальний коефіцієнт швидко зменшується.

¹ Інші буферні системи плазми крові теж залучаються до ліквідації метаболічного ацидозу

Енергетичний обмін складається з основного обміну та робочої надбавки.

Основний обмін – рівень енергетичного обміну у стані фізичного та психоемоційного спокою. Робоча надбавка – кількість енергії, що затрачається на виконання зовнішньої роботи.

Основний обмін визначають вранці, за умов температурного комфорту (18...20 °C), натще, в положенні лежачи з розслабленими м'язами, у стані неспання. Під час сну він нижчий на 6–10 %, а протягом тривалого голодування – знижується на 40 %.

Основний обмін у чоловіків середньої статури приблизно становить 7 100 кДж за добу, у жінок – приблизно на 10 % нижчий, але зростає під час вагітності. Робоча надбавка студентів і викладачів, які ведуть переважно сидячий спосіб життя, становить 2 500 кДж за добу, а людей важкої фізичної праці – 5 000 кДж на добу.

Великі теплокровні тварини мають вище абсолютне значення основного обміну. Проте відношення його інтенсивності до маси тіла у малих тварин є більшим, оскільки відношення площі поверхні до маси у них більше.

Закон поверхні тіла Макса Рубнера (1883 р.): витрати енергії теплокровних тварин пропорційні площі поверхні тіла.

Однак закон поверхні Рубнера має певні обмеження. У 1932 р. Макс Клейбер визначив, що в алометричних тварин (із непропорційним співвідношенням площі поверхні та маси) інтенсивність метаболізму залежить від маси тіла у степені 0,75 (рис. 1.6).

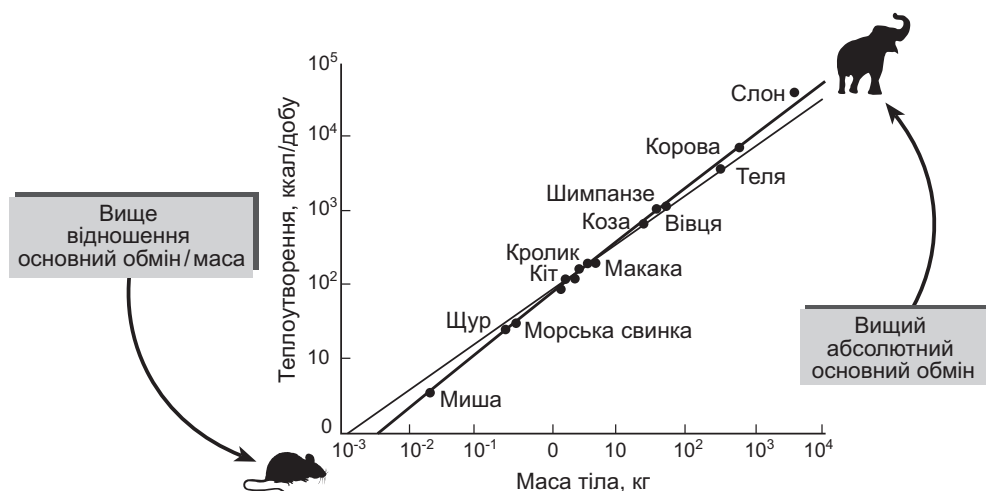


Рис. 1.6. Відхилення від закону поверхні тіла Рубнера: залежність теплоутворення від маси тіла описують прямою з коефіцієнтом 0,75 (товста лінія), а не з прогнозованим коефіцієнтом 0,67 (тонка лінія; відношення поверхні тіла у м² до його маси в кг у ізометричних тварин становить 2/3 або 0,67, а у алометричних трохи менше – 0,63)

У процесі індивідуального розвитку найвище відношення основного обміну до маси тіла припадає на дитячий вік, що пов'язано як з законом Рубнера, так і з вищою інтенсивністю метаболізму.

Зростання енергетичного обміну спостерігають не лише внаслідок фізичної праці, але й під час споживання їжі.

Зростання енергетичного обміну під час споживання їжі називають специфічно-динамічною дією їжі.

Під час вживання білкової їжі енергетичний обмін зростає на 30 %, а під час вживання змішаної їжі – на 6–15 %. Отже, головну роль у специфічно-динамічній дії їжі виконують її білки.

1.3. ЗАГАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТАБОЛІЗМУ

Метаболізм, або обмін речовин, – це сукупність хімічних реакцій, що відбуваються в живих організмах для підтримання життєдіяльності.

Метаболізм як сукупність усіх хімічних перетворень у клітині чи організмі здійснюється внаслідок перебігу послідовних ферментативних реакцій, що об'єднуються в окремі метаболічні шляхи. За перебігу кожної з послідовних стадій метаболічного шляху відбувається специфічне, незначне хімічне перетворення молекули – найчастіше втрата, перенесення чи приєднання певного атома чи функціональної групи. Продукти послідовних перетворень попередника мають назву проміжних метаболічних продуктів, або метаболітів. Обмін речовин нерозривно пов'язаний з обміном енергії.

Розрізняють два типи метаболічних процесів – катаболізм і анаболізм.

Катаболізм – це фаза метаболізму, у якій відбувається розщеплення поживних органічних молекул (вуглеводів, жирів і білків) до менших за розміром і простіших за будовою кінцевих продуктів (наприклад, O_2 чи NH_3). Катаболічні реакції супроводжуються вивільненням енергії хімічних зв'язків, певна частина якої запасється у формі АТФ або відновлених переносників електронів (НАДН, НАДФН і ФАДН₂), а решта розсіюється у вигляді тепла (рис. 1.7).

Анаболізм, або **біосинтез**, – це фаза метаболізму, у якій із невеликих за розміром та простих за будовою попередників синтезуються більші за розміром і складніші за будовою молекули, такі як жири, вуглеводи, білки й нуклеїнові кислоти. Анаболічні реакції потребують надходження енергії, джерелом якої є перенесення фосфатної групи АТФ або відновлені форми НАДН, НАДФН і ФАДН₂ (див. рис. 1.7).

Більшість метаболічних перетворень, які відбуваються у живій клітині, належать до одного з п'яти загальних класів реакцій:

- 1) окисно-відновні реакції;
- 2) реакції утворення або розщеплення міжкарбонових зв'язків;

- 3) реакції, що забезпечують внутрішні перебудови, ізомеризацію та видалення (елімінацію);
- 4) трансферазні реакції;
- 5) вільнорадикальні реакції.



Рис. 1.7. Роль хімічної енергії в інтегруванні катаболічних і анаболічних процесів у організмі

Ще однією формою запасання енергії у живих клітинах є генерування електрохімічних іонних градієнтів і електричних потенціалів плазматичної мембрани та мембран клітинних органелів. Ці градієнти можуть слугувати джерелом енергії для синтезу АТФ (функціонування АТФ-синтази) чи вторинно-активного транспорту іонів і метаболітів.

1.4. КЛАСИФІКАЦІЯ ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ ЗА СПОСОБОМ ОТРИМАННЯ ЕНЕРГІЇ ТА КАРБОНУ

Живі організми класифікують за способом отримання енергії та карбону. Залежно від джерела енергії виділяють фототрофи і хемотрофи (рис. 1.8). Фототрофи поглинають і використовують сонячне світло, а хемотрофи отримують енергію у процесі окислення поживних речовин.

Автотрофи отримують необхідний для життєдіяльності карбон із карбон діоксиду (карбон (IV) оксиду, CO_2), а гетеротрофи – з органічних поживних речовин, таких як глюкоза. До хемогетеротрофних організмів належать вищі тварини та більшість мікроорганізмів.

У біосфері Землі фототрофи та хемотрофи співіснують як учасники складного циклу, в якому вуглекислота, кисень і вода постійно циркулюють поміж фототрофним та хемотрофним світами, а рушійною силою цього процесу є енергія сонячного світла (рис. 1.8).

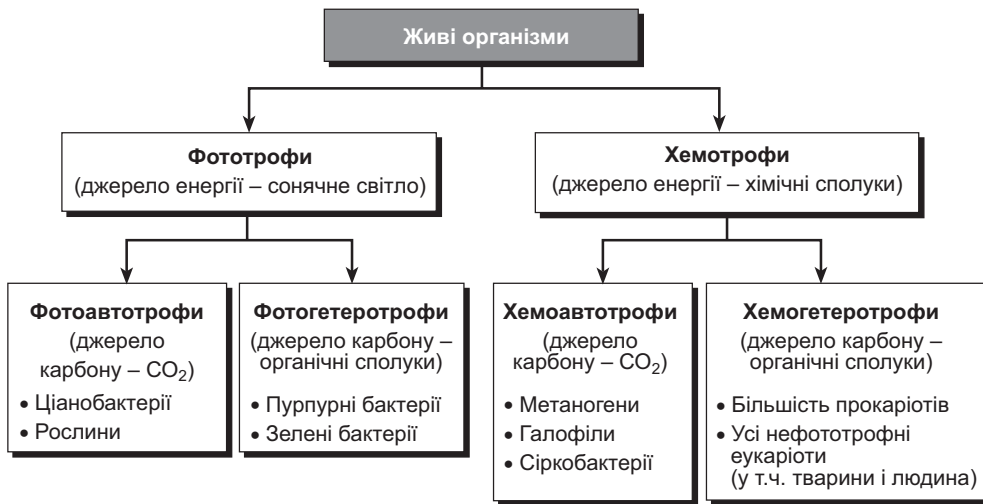


Рис. 1.8. Класифікація організмів за джерелами енергії та карбону, які вони використовують для своїх потреб

Світлова енергія Сонця є основним джерелом енергії на Землі. Фотосинтезуючі організми вловлюють сонячну енергію і використовують її для синтезу збагачених на енергію вуглеводів та інших органічних сполук, які згодом використовуються хемогетеротрофними організмами як джерело енергії та карбону. Зелені рослини (фотоавтотрофи) Земної кулі за рік утворюють близько 100 млрд т органічних речовин, у яких міститься близько $1,8 \times 10^{18}$ кДж енергії. За цих умов вони поглинають близько $1,7 \times 10^8$ т CO_2 і виділяють близько $11,5 \times 10^7$ т O_2 .

Метаболічні процеси, як і всі процеси перетворення енергії, супроводжуються втратою частини корисної енергії (вільної енергії хімічних зв'язків) і неминучим зростанням кількості енергії, яка не може бути засвоєна (тепла). Тому, на відміну від кругообігу речовин, обмін енергії у біосфері відбувається лише в одному напрямі. Живі організми не можуть регенерувати корисну енергію з недоступної енергії, розсіяної у вигляді тепла.

Далі ми зосередимося на енергетичних процесах переважно хемогетеротрофних організмів, до яких належать усі тварини і людина.

Підсумок 1. БІОЕНЕРГЕТИКА І ЗАГАЛЬНИЙ ОБМІН РЕЧОВИН

- Біоенергетика – це біологічна наука про отримання, перетворення та використання енергії в метаболічних процесах живих організмів.
- Живі організми постійно виконують роботу, використовуючи енергію для підтримання високого рівня своєї структурної організації, синтезу клітинних компонентів, генерації електричного струму, виконання зовнішньої роботи та багатьох інших процесів.
- Метаболізм, або обмін речовин, – це сукупність хімічних реакцій, що відбуваються в живих організмах для підтримання життєдіяльності.
- Катаболізм – це фаза метаболізму, у якій відбувається розщеплення органічних молекул і вивільнення енергії.
- Анаболізм – це фаза метаболізму, у якій із невеликих за розміром простих за будовою попередників синтезуються більші за розміром і складніші за будовою молекули.
- Обмін енергії у біосфері відбувається лише в одному напрямі, оскільки організми не можуть регенерувати корисну енергію з недоступної форми енергії у вигляді тепла.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. **Зміни дихального коефіцієнта за інтенсивної роботи.** Чим зумовлене зростання дихального коефіцієнта на початку і після зупинки роботи м'язів?
2. **Біоенергетика – це наука, що вивчає:**
 - 1) процеси перетворення енергії;
 - 2) механізми запасання енергії;
 - 3) механізми використання енергії;
 - 4) вплив різних видів енергії на організм.
3. **Виберіть правильні характеристики катаболічних процесів:**
 - 1) відбувається розщеплення поживних органічних молекул до менших за розміром і простіших за будовою кінцевих продуктів;

- 2) вивільняється енергія, певна частина якої запасється у формі АТФ або відновлених переносників електронів, а решта розсіюється у вигляді тепла;
- 3) потребують надходження енергії, джерелом якої є потенціал перенесення фосфорильної групи АТФ або відновний потенціал НАДН, НАДФН і ФАДН₂;
- 4) синтезуються органічні молекули, які є більшими і складнішими за початкові субстрати.

4. Виберіть правильні характеристики анаболічних процесів:

- 1) з невеликих і простих попередників синтезуються більші та складніші молекули;
- 2) потребують надходження енергії, джерелом якої є потенціал перенесення фосфорильної групи АТФ або відновний потенціал НАДН, НАДФН і ФАДН₂;
- 3) відбувається розщеплення органічних молекул до менших за розміром і простіших за будовою кінцевих продуктів;
- 4) вивільняється енергія, певна частина якої запасється у формі АТФ або відновлених переносників електронів, а решта розсіюється у вигляді тепла.

5. У якому калориметрі енергетичні процеси людини вимірюють за допомогою термометрів?

- 1) Етуотера–Бенедикта;
- 2) Дугласа;
- 3) Шатернікова;
- 4) Дугласа–Бенедикта.

6. Який респіраторний апарат дає можливість непрямой калориметрії тварин за газообміном організму і середовища?

- 1) Етуотера–Бенедикта;
- 2) Дугласа;
- 3) Шатернікова;
- 4) Дугласа–Бенедикта.

7. Відношення об'єму виділеного CO₂ до об'єму поглинутого O₂ за окиснення різних речовин – це:

- 1) дихальний коефіцієнт;
- 2) дихальний контроль;
- 3) основний обмін;
- 4) киснева заборгованість.

8. Кількість тепла, що вивільняється за поглинання 1 л кисню, називають:

- 1) калоричним еквівалентом кисню;
- 2) дихальним коефіцієнтом;
- 3) дихальним контролем;
- 4) кисневою заборгованістю.

9. Виберіть правильні характеристики фототрофів:

- 1) використовують атмосферний карбон діоксид як єдине джерело цього елемента, з якого вони і будують усі власні карбоновмісні біомолекули;
- 2) відносно самодостатні системи, які здатні забезпечити себе усім необхідним для життя;
- 3) використовують сонячне світло як джерело енергії;
- 4) не здатні засвоювати карбон діоксид з атмосфери.

10. Виберіть правильні характеристики хемотрофів:

- 1) не здатні засвоювати карбон діоксид з атмосфери і отримують карбон зі середовища у складі органічних молекул;
- 2) використовують хімічні сполуки як джерело енергії;
- 3) використовують сонячне світло як джерело енергії;
- 4) використовують атмосферний карбон діоксид як єдине джерело цього елемента.

**ВИКОРИСТАНА І ДОДАТКОВА ЛІТЕРАТУРА**

- Бабский Е.Б., Косицкий Г.И., Ходоров Б.И.* и др. Физиология человека / под ред. Г.И. Косицкого; 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: Медицина, 1985. – 544 с.
- Нельсон Д.Л., Кокс М.М.* Основы биохимии за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
- Рэкер Э.* Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. – Москва: Мир, 1979. – 216 с.
- Скулачев В.П.* Рассказы о биоэнергетике. – Москва: Молодая гвардия, 1984. – 191 с.
- Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. – Москва: Наука, 1989. – 564 с.
- Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О.* Мембранная биоэнергетика. – Москва: Изд-во Москов. ун-та, 2010. – 365 с.
- Уголев А.М.* Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. – Ленинград: Наука, 1985. – 544 с.
- Эккерт Р., Рэндалл Д., Огастин Д.* Физиология животных: механизмы и адаптации. Т. 2. – Москва: Мир, 1992. – 344с.
- Harris D.A.* Bioenergetics at a glance. – Oxford: Blackwell Science, 1995. – 120 p.
- Morovitz H.J.* Beginnings of cellular life: Metabolism recapitulates biogenesis. – New Haven: Yale University Press, 2004. – 208 p.
- Nicholls D.G., Ferguson S.J.* Bioenergetics. – 4th ed. – Cambridge: Academic Press, 2013. – 440 p.

БІОЕНЕРГЕТИКА І ТЕРМОДИНАМІКА

- Закони термодинаміки
- Термодинамічні показники змін енергії
 - Вільна енергія Гіббса
 - Ентальпія
 - Ентропія
- Адитивність змін вільної енергії послідовних хімічних реакцій
- Основи термодинаміки необоротних процесів

Перетворення біологічної енергії так само підлягають законам фізики, як і всі інші природні процеси. Розглянемо закони термодинаміки та кількісні взаємозв'язки між вільною енергією Гіббса, ентальпією і ентропією.

2.1. ЗАКОНИ ТЕРМОДИНАМІКИ

Перший закон термодинаміки постулює незмінність кількості енергії у Всесвіті.

Перший закон термодинаміки: енергія не створюється і не зникає, а перетворюється з одного виду в інший.

Наприклад, енергію Сонця зелені рослини використовують для синтезу органічних речовин. Енергію хімічних зв'язків цих речовин хемотрофні організми споживають для забезпечення своєї життєдіяльності. Частину цієї енергії хемотрофи використовують для підтримання своєї структурної організації і виконання зовнішньої роботи, а більша частина енергії розсіюється у вигляді тепла. Однак загальна кількість енергії у термодинамічній системі не змінюється.



"А зараз поговоримо
про другий закон термодинаміки..."

Другий закон термодинаміки стверджує, що ступінь неупорядкованості системи завжди зростає. Мірою неупорядкованості системи є **ентропія** (S). Чим більше неупорядкована система, тим більшою є ентропія. Якщо продукти реакції менш складні за будовою і більшою мірою неупорядковані, ніж вихідні речовини (субстрати реакції), то вважають, що така реакція супроводжується зростанням ентропії.

Другий закон термодинаміки:
будь-який природний процес супроводжується зростанням ентропії Всесвіту.

Живий організм – це сукупність молекул, які організовані у складні надмолекулярні комплекси. Рівень їхньої організованості є набагато вищим, ніж рівень організованості цих молекул за межами живого організму. Наприклад, молекули води у водоймі мають нижчий рівень організованості, ніж у цитоплазмі, оскільки не взаємодіють з органічними молекулами клітини.

Впорядкованість, якої досягає організм у своєму розвитку, з надлишком компенсується збільшенням ступеня неупорядкованості навколишнього середовища. Живі системи ніколи не досягають стану рівноваги з оточенням.

Живі організми – це термодинамічно відкриті системи.

Відкрита термодинамічна система – це система, яка постійно обмінюється з навколишнім середовищем матерією та енергією.

Живі організми зберігають внутрішній порядок, забираючи з навколишнього середовища вільну енергію сонячного світла чи поживних речовин і повертаючи в нього таку ж кількість енергії у вигляді тепла. Це пояснює, яким чином живі організми досягають внутрішньої впорядкованості, не заперечуючи другого закону термодинаміки.

2.2. ТЕРМОДИНАМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЗМІН ЕНЕРГІЇ

Є три термодинамічні показники, які дають змогу кількісно описати зміни енергії за перебігу хімічної реакції: вільна енергія Гіббса, ентальпія і ентропія.

Вільна енергія Гіббса (G) – це кількість енергії, яка може бути використана для виконання роботи за постійних значень температури і тиску.

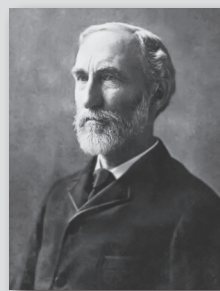
Якщо реакція супроводжується вивільненням енергії, та зміна вільної енергії Гіббса (ΔG) має від'ємне значення, і таку реакцію називають **екзергонічною**. У разі **ендергонічної** реакції ΔG є додатним числом. Розмірністю ΔG є Дж/моль.

Ентальпія (H) – це вміст тепла у реакційній системі. Цей показник відображає кількість і природу хімічних зв'язків у субстратах і продуктах реакції.

Хімічні реакції, які супроводжуються вивільненням тепла, називають **екзотермічними**, вміст тепла у продуктах такої реакції є нижчим, ніж у вихідних сполуках, а ΔH умовно має від'ємне значення. Реакційні системи, які поглинають тепло з навколишнього середовища, є **ендотермічними** і характеризуються додатним значенням ΔH . Розмірністю ΔH теж є Дж/моль.

Третім термодинамічним показником, який дає змогу описати зміни енергії у системі, є **ентропія**, що характеризує не лише ступінь неупорядкованості системи, але й ступінь розсіювання енергії. Зміна ентропії (ΔS) має розмірність Дж/моль \times К.

Свою найвідомішу монографію “Про рівновагу гетерогенних речовин” (*On the Equilibrium of Heterogeneous Substances*) Джозая Вільярд Гіббс написав, працюючи на неоплачуваній посаді професора Єльського університету в Нью-Гейвені, штат Коннектикут, США. Цю працю Гіббса сьогодні розглядають як одне з найбільших наукових досягнень XIX ст. і вважають фундаментальною працею в галузі фізичної хімії. Гіббс використав термодинаміку для пояснення фізико-хімічних явищ. Поза тим, значення праці Гіббса не відразу було оцінене сучасниками, в основному через математичні форми



Джозая В. Гіббс
(1839–1903)

і строгі дедуктивні методи, що утруднювали читання. Тільки після перекладу його статей на німецьку і французьку мову ідеї Гіббса отримали визнання у Європі. Джозая Гіббс у пам'яті друзів залишився скромним і благородним джентльменом зі здоровою поставою та здоровим кольором обличчя, доступним і доброзичливим до студентів. У своїй останній праці “Основні принципи статистичної механіки” (*Elementary Principles in Statistical Mechanics*) Гіббс повернувся до теми, тісно пов'язаної з предметом його ранніх публікацій. У ній він займався розвитком наслідків законів термодинаміки, що впливають з експериментальних даних.

Взаємозалежність вільної енергії, ентальпії та ентропії у реакціях, що відбуваються в біологічних системах за сталих температури і тиску, описують таким рівнянням:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (2.1)$$

де ΔG – зміна вільної енергії Гіббса, ΔH – зміна ентальпії, T – абсолютна температура, ΔS – зміна ентропії системи. У термодинамічно вигідних процесах, коли ентропія зростає, а система вивільняє тепло у навколишнє середовище, ΔG стає від’ємним.

Зміни вільної енергії Гіббса прийнято обчислювати за прийнятих ученими стандартних умов: $T = 25^\circ\text{C}$ (298 K), рН 7,0, концентрації субстратів і продуктів реакції 1 M, сталий тиск 760 мм рт. ст. Якщо реакція відбувається за участі Mg^{2+} (як і у більшості реакцій, де реагентом є АТФ), то стандартною вважають його концентрацію 1 mM. Зміни G за таких умов називають стандартними і позначають $\Delta G'^0$.

Зміна $\Delta G'^0$ безпосередньо залежить від константи рівноваги. Хімічний склад реакційної системи (суміші субстратів і продуктів) постійно змінюється, доки система не досягне стану рівноваги. У стані рівноваги концентрація субстратів і продуктів реакції, а також швидкість прямої та зворотної реакцій стають абсолютно однаковими, і подальші зміни в системі не відбуваються. Знаючи концентрацію субстратів і продуктів реакції у стані рівноваги, можна розрахувати константу рівноваги K_p .

Якщо у хімічну реакцію вступає k молекул А і l молекул В та утворюється m молекул С і n молекул D, то цю реакцію описують рівнянням:



Константа рівноваги такої загальної реакції становить:

$$K_p = \frac{[C]^m \times [D]^n}{[A]^k \times [B]^l}, \quad (2.3)$$

де $[A]$, $[B]$, $[C]$ і $[D]$ – молярні концентрації субстратів і продуктів реакції у стані рівноваги.

Якщо реакційна система неврівноважена, рушійною силою для досягнення стану рівноваги є зміна вільної енергії хімічної реакції ΔG . За цих умов зміну вільної енергії описують рівнянням:

$$\Delta G = \Delta G'^0 + RT \times \ln \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}, \quad (2.4)$$

де R – газова константа (8,31 Дж/моль \times K); T – абсолютна температура.

Зміна вільної енергії реакції не залежить від того, як відбувається реакція, а тільки від природи та концентрації субстратів і кінцевих продуктів реакції.

За стандартних умов $\Delta G = 0$, тому з формули (2.4):

$$\Delta G'^0 = -RT \times \ln \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}. \quad (2.5)$$

Підставивши у рівняння (2.5) значення константи рівноваги з формули (2.3), отримаємо:

$$\Delta G'^0 = -RT \times \ln K'_p, \quad (2.6)$$

де K'_p – константа рівноваги за стандартних умов.

$\Delta G'^0$ – це різниця між вільною енергією кінцевих продуктів реакції та вільною енергією субстратів за стандартних умов. Від'ємне значення $\Delta G'^0$ вказує на те, що вільна енергія продуктів реакції є нижчою, ніж вільна енергія вихідних продуктів, тому така реакція буде відбуватися спонтанно. Усі хімічні реакції йдуть у напрямі зниження вільної енергії системи. Додатне значення $\Delta G'^0$ означає, що вільна енергія продуктів реакції є вищою порівняно з вільною енергією субстратів і що така реакція не здійснюється за стандартних умов спонтанно. $\Delta G'^0 = \Delta G$ лише тоді, коли концентрація субстратів і продуктів є однаковою і становить 1 М.

Співвідношення між $\Delta G'^0$ та K'_p наведено у табл. 2.1.

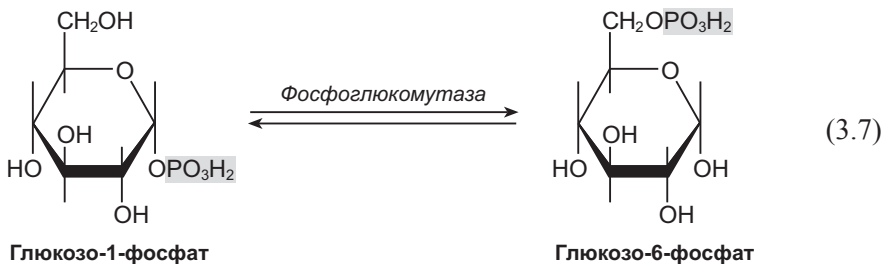
Таблиця 2.1

Співвідношення між K'_p , $\Delta G'^0$ та напрямом хімічних реакцій за стандартних умов

K'_p	$\Delta G'^0$	Вихідна концентрація компонентів реакції 1 М
< 1,0	Від'ємне	Реакції відбуваються у напрямі утворення продукту
1,0	0	Рівноважний стан
> 1,0	Додатне	Реакції відбуваються у зворотному напрямі

Якщо константа рівноваги певної хімічної реакції дорівнює 1, то зміна стандартної вільної енергії цієї реакції дорівнюватиме 0 (оскільки натуральний логарифм 1 дорівнює нулю; табл. 2.1). Якщо константа рівноваги реакції перевищує одиницю, то величина зміни стандартної вільної енергії $\Delta G'^0$ матиме від'ємне значення, а якщо константа рівноваги менша одиниці, то величина $\Delta G'^0$ матиме додатне значення.

Для прикладу можна розрахувати зміни стандартної вільної енергії у реакції, яку каталізує фермент фосфоглюкомутаза:



Хімічний аналіз показує, що незалежно від того, чи буде вихідна суміш містити глюкозо-1-фосфат у концентрації 20 мМ (у разі, коли глюкозо-6-фосфату немає) чи глюкозо-6-фосфат у концентрації 20 мМ (у разі, коли глюкозо-1-фосфату немає), склад кінцевої суміші у стані рівноваги за температури 25 °С

і рН 7,0 буде однаковим – 1 мМ глюкозо-1-фосфату і 19 мМ глюкозо-6-фосфату¹. Виходячи з цих даних, можна визначити константу рівноваги реакції:

$$K'_p = \frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}]}{[\text{глюкозо-1-фосфат}]} = \frac{19 \text{ мМ}}{1 \text{ мМ}} = 19. \quad (2.8)$$

Знаючи величину K'_p , можна розрахувати зміну стандартної вільної енергії відповідно до формули (2.6):

$$\Delta G'^0 = -RT \times \ln K'_p = -(8,3 \text{ кДж/моль} \times K) \times (298 \text{ К}) \times (\ln 19) = -7,3 \text{ кДж/моль}.$$

Оскільки зміна стандартної вільної енергії у цьому випадку є величиною від'ємною, то перетворення 1 моля глюкозо-1-фосфату на 1 моль глюкозо-6-фосфату за стандартної температури і рН та коли концентрація обох сполук підтримується на рівні 1 М, супроводжується втратою (вивільненням) вільної енергії. Значення $\Delta G'^0$ для зворотної реакції (перетворення глюкозо-6-фосфату на глюкозо-1-фосфат) буде таким самим за величиною, але протилежним за знаком.

У табл. 2.2 наведено величини зміни стандартної вільної енергії у деяких хімічних реакціях. Як видно, реакції гідролізу простих ефірів, амідів, пептидів і вуглеводів, так само, як і реакції елімінації або перебудови сполук, відбуваються з порівняно незначною зміною стандартної вільної енергії, тоді як гідроліз ангідридів кислот супроводжується порівняно великим зниженням стандартної вільної енергії. Повне окислення органічних молекул, таких як глюкоза або пальмітат, до CO_2 і H_2O , яке у клітині відбувається у кілька етапів, супроводжується значним зниженням стандартної вільної енергії. Однак зміни стандартної вільної енергії (як це наведено у табл. 2.2) є показником вивільненої у ході реакції енергії лише за *стандартних умов*. А для того, щоб визначити, скільки енергії вивільнюється за умов, що виникли у клітині, необхідно ввести поняття **дійсної зміни вільної енергії ΔG** .

Таблиця 2.2

Зміни стандартної вільної енергії деяких хімічних реакцій за рН 7,0 і 25 °С

Приклади реакції	$\Delta G'^0$, кДж/моль
Пальмітат + $23\text{O}_2 \rightarrow 16\text{CO}_2 + 16\text{H}_2\text{O}$	-9770
Глюкоза + $6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	-2840
АТФ + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АДФ} + \text{P}_\text{н}$	-30,5
Лактоза + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{глюкоза} + \text{галактоза}$	-15,9
Мальтоза + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{глюкоза}$	-15,5
Глутамін + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{глутамат} + \text{NH}_4^+$	-14,2
Глюкозо-6-фосфат + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{глюкоза} + \text{P}_\text{н}$	-13,8
Глюкозо-1-фосфат $\rightarrow \text{глюкозо-6-фосфат}$	-7,3
Фруктозо-6-фосфат + $\text{P}_\text{н} \rightarrow \text{фруктозо-1,6-дифосфат}$	-1,7
Фруктозо-6-фосфат $\rightarrow \text{глюкоза-6-фосфат}$	-1,7
Малат $\rightarrow \text{фумарат} + \text{H}_2\text{O}$	3,1

¹ Треба пам'ятати, що ферменти не змінюють точку рівноваги реакції, а лише прискорюють досягнення рівноважного стану

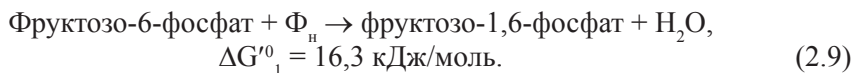
$\Delta G'^0$ та ΔG виражають ту **максимальну кількість енергії, яка теоретично може бути вивільнена у ході цієї реакції**, тобто ту кількість енергії, яка могла би бути використана для виконання роботи, якби якийсь надзвичайно ефективний пристрій вловлював або трансформував цю енергію. Насправді такого пристрою немає (певна частина вільної енергії завжди втрачається у вигляді ентропії за будь-якого перетворення), тому робота, виконана за перебігу реакції з постійними значеннями температури і тиску, завжди є меншою порівняно з теоретично розрахованою. Варто також відзначити, що **деякі термодинамічно вигідні реакції** (тобто ті, що характеризуються високим від'ємним значенням $\Delta G'^0$) **відбуваються зі швидкістю, яку неможливо виміряти**.

Якби у живих клітинах не було ферментів, реакції відбувалися б надзвичайно повільно. Біохімічні реакції прискорюються не внаслідок постачання допоміжної кількості тепла, а завдяки тому, що фермент знижує енергію активації реакції. Знижуючи енергію активації, фермент забезпечує перебіг реакції за альтернативним способом, енергія активації якого нижча, ніж енергія активації некаталітичного перетворення. Отже, ферменти не змінюють константу рівноваги реакції, але підвищують *швидкість* перебігу реакції у напрямі, який визначається законами термодинаміки.

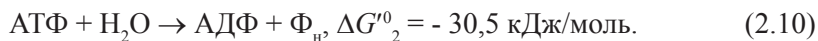
2.3. АДИТИВНІСТЬ ЗМІН ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ ПОСЛІДОВНИХ ХІМІЧНИХ РЕАКЦІЙ

Уявимо дві послідовні хімічні реакції $A \rightarrow B$ і $B \rightarrow C$, для кожної з яких відомі рівноважні константи й величини зміни стандартної вільної енергії $\Delta G'^0_1$ і $\Delta G'^0_2$. Оскільки ці реакції послідовні, ми можемо виключити компонент B та записати сумарну реакцію $A \rightarrow C$, яка матиме власну рівноважну константу. Якщо для цієї реакції розрахувати зміну стандартної вільної енергії $\Delta G'^0_{\text{сум}}$, то виявиться, що **величини $\Delta G'^0$ послідовних хімічних реакцій є адитивними**. Величина $\Delta G'^0_{\text{сум}}$ сумарної реакції $A \rightarrow C$ визначається як алгебраїчна сума змін стандартної вільної енергії за перебігу двох складових реакцій, тобто як сума величин $\Delta G'^0_1$ та $\Delta G'^0_2$: $\Delta G'^0_{\text{сум}} = \Delta G'^0_1 + \Delta G'^0_2$.

Цей принцип біоенергетики має важливе значення, оскільки дає можливість зрозуміти, чому навіть термодинамічно не вигідна (ендергонічна) реакція може відбуватися до кінця, якщо вона поєднана з високо екзергонічною реакцією через спільний проміжний продукт. Наприклад, реакція утворення фруктозо-1,6-дифосфату з фруктозо-6-фосфату, що каталізується фосфофруктокіназою-1:



Додатне значення величини $\Delta G'^0$ вказує, що за стандартних умов ця реакція не зможе відбуватися спонтанно у вказаному напрямі. Інша клітинна хімічна реакція, а саме гідроліз АТФ до АДФ та Φ_n , є високо екзергонічною:



У цих двох реакціях є спільні проміжні продукти – Φ_{H} та H_2O , тому сумарну реакцію можна записати у такій послідовності:



Сумарну зміну стандартної вільної енергії можна розрахувати як алгебраїчну суму величин $\Delta G'^0$ двох послідовних реакцій:

$$\Delta G'^0_{\text{сум}} = \Delta G'^0_1 + \Delta G'^0_2 = 16,3 \text{ кДж/моль} + (-30,5 \text{ кДж/моль}) = -14,2 \text{ кДж/моль}.$$

Отже, сумарна реакція є екзергонічною. У цьому разі енергія, накопичена у зв'язках молекули АТФ, використовується для синтезу фруктозо-1,6-фосфату, хоча реакція утворення цієї сполуки з фруктозо-1,6-фосфату і Φ_{H} є ендергонічною. Перенесення фосфатної групи від АТФ на фруктозо-6-фосфат відрізняється від двох наведених вище реакцій (2.9) і (2.10), однак кінцевий результат є таким самим, як і у разі поєднання цих реакцій. Як бачимо, визначальним у термодинамічних розрахунках є стан системи на початку процесу і стан системи після його завершення, і немає значення, яким саме способом відбувається перехід з початкового стану в кінцевий.

Зміна вільної енергії реакції залежить не від того, яким способом відбувається реакція, а тільки від природи та концентрації субстратів і кінцевих продуктів реакції.

Як вже було зазначено вище, $\Delta G'^0$ – це спосіб вираження константи рівноваги реакції. У разі наведеної вище реакції (2.9):

$$K'_{\text{p1}} = \frac{[\text{фруктозо-1,6-фосфат}]}{[\text{фруктозо-6-фосфат}][\Phi_{\text{H}}]} = 1,27 \times 10^{-3} \text{ М},$$

а константу рівноваги реакції гідролізу АТФ (2.10) визначають зі співвідношення:

$$K'_{\text{p2}} = \frac{[\text{АДФ}][\Phi_{\text{H}}]}{[\text{АТФ}]} = 2 \times 10^5 \text{ М}.$$

Константа рівноваги двох спряжених реакцій відтак дорівнює:

$$K'_{\text{p3}} = \frac{[\text{фруктозо-1,6-фосфат}][\text{АДФ}][\Phi_{\text{H}}]}{[\text{фруктозо-6-фосфат}][\text{АТФ}]} = (K'_{\text{p1}}) \times (K'_{\text{p2}}) = 2,54 \times 10^2 \text{ М}.$$

Отже, константи рівноваги є величинами мультиплікативними.

Стратегію поєднання кількох реакцій через спільний проміжний продукт використовують усі живі організми для синтезу метаболітів та інших клітинних інгредієнтів. Однак така стратегія є вигідною тільки тоді, коли клітини забезпечені джерелами енергії, наприклад, АТФ.

Величини $\Delta G'^0$ двох реакцій, із яких складається сумарна реакція, є адитивними, проте величину K'_p сумарної реакції розраховують як добуток величин K'_p кожної з реакцій.

Для полегшення розв'язання завдань і відповідей на питання у цьому підручнику наводимо таблицю фізичних констант і одиниць, які використовують у термодинаміці:

Таблиця 2.3

Фізичні константи й одиниці, які використовують у термодинамічних розрахунках

• Число Авогадро	$N = 6,022 \times 10^{23} \text{ моль}^{-1}$
• Константа Больцмана	$K = 1,382 \times 10^{-23} \text{ Дж / К}$
• Газова константа	$R = 8,315 \text{ Дж / моль} \times \text{К}$
• Константа Фарадея	$F = 96\,485 \text{ Дж / (В} \times \text{моль)}$
• ΔG та ΔH	Дж / моль
• ΔS	Дж / моль \times К
• 1 кал = 4,184 Дж	
• Абсолютна температура Т – Кельвін, К	
• $25^\circ\text{C} = 298,15 \text{ К}$	
• Добуток $R \times T = 2,479 \text{ кДж/моль (} 25^\circ\text{C)}$	

2.4. ОСНОВИ ТЕРМОДИНАМІКИ НЕОБОРОТНИХ ПРОЦЕСІВ

У загальному випадку фізичні та біофізичні об'єкти не перебувають у стані рівноваги. Процеси, що відбуваються у таких системах, є необоротними. Термодинаміка необоротних процесів ґрунтується на таких положеннях і поняттях як лінійні співвідношення, виробництво ентропії, стаціонарний стан, теорема Пригожина та ін.

Закон лінійних співвідношень визначає залежність між термодинамічними системами і потоками (зміними) у них. Лінійний закон узагальнює багато емпіричних принципів, наприклад, закон Фіка (залежність перенесення речовини від концентраційного градієнта) чи закон Ома (залежність перенесення електричного заряду від градієнта електричного потенціалу) та ін.

Кожна окремо взята зміна у системі може викликати тільки зменшення її вільної енергії та підвищення ентропії. Однак інші зміни у цій системі можуть відбуватися так, що підвищення ентропії за однієї зміни компенсуються її зменшенням за іншої зміни. Наприклад, транспорт іонів крізь плазматичну мембрану за концентраційним градієнтом призводить до зменшення ентропії системи, яке, однак, компенсується гідролізом АТФ, коли ентропія системи збільшується.

Стан термодинамічної системи називають стаціонарним, якщо величина ентропії не змінюється у часі та не є максимальною. Основна характеристика стаціонарного стану визначається теоремою Пригожина, згідно з якою виробництво ентропії у стаціонарному стані є мінімальним. Теорема пояснює стійкість стаціонарних станів у відкритих системах. Якщо система виходить із цього стану самостійно, то відбувається збільшення ентропії. У результаті в системі виникають процеси, які намагаються повернути її у стаціонарний стан. Прикладом такого процесу може бути терморегуляція організму, в якому стала температура підтримується завдяки балансу теплопродукції і тепловіддачі. Теорема Пригожина – теорема термодинаміки нерівноважних процесів, коли стаціонарному стану лінійної нерівноважної системи відповідає мінімальна продукція ентропії. Теорема була доведена І. Пригожином у 1947 р. зі співвідношення Онсагера і є справедливою, якщо кінетичні коефіцієнти у цих співвідношеннях залишаються сталими.

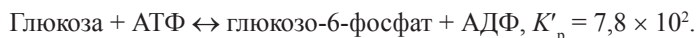
Підсумок 2. БІОЕНЕРГЕТИКА І ТЕРМОДИНАМІКА

- Три основних термодинамічних показники (вільна енергія, ентальпія та ентропія), які об'єднані у рівнянні $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, дають змогу кількісно описати зміни енергії за перебігу хімічної реакції.
- Величина стандартної зміни вільної енергії ΔG^0 – це фізична константа, яка є характерною для певної реакції та яку можна розрахувати за константою рівноваги цієї реакції згідно з рівнянням $\Delta G^0 = -RT \times \ln K'_p$.
- Зміна вільної енергії ΔG за реальних умов залежить від значення ΔG^0 , концентрацій субстратів і продуктів реакції згідно з рівнянням $\Delta G = \Delta G^0 + RT \times \ln ([\text{продукти}] / [\text{субстрати}])$.
- Якщо ΔG є значною і від'ємною, реакція буде прямою і екзергонічною; якщо величина ΔG є значною, але додатною, то реакція буде зворотною або ендергонічною. Якщо ж величина ΔG дорівнює нулю, то система перебуває у стані рівноваги.
- Зміна вільної енергії не залежить від того, в який спосіб відбувається хімічна реакція. Вона залежить лише від природи та концентрації субстратів і продуктів реакції.
- Зміни вільної енергії є адитивні – зміна вільної енергії сумарної хімічної реакції, що відбувається у кілька послідовних реакцій з утворенням проміжного продукту, який є субстратом наступної реакції, дорівнює сумі величин ΔG окремих реакцій.
- У термодинамічній системі за сталих зовнішніх параметрів швидкість утворення ентропії у стаціонарному стані є мінімальною і стабільною, а нестаціонарний стан буде змінюватися, доки виробництво ентропії не сягне найменшого значення.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

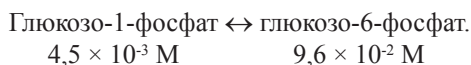
1. Обчислити значення величини $\Delta G'^0$ реакції, що каталізується гексокіназою за рН 7,0 та 25 °С, використовуючи константу рівноваги рівняння²:



2. Обчислити константу рівноваги за величиною $\Delta G'^0$ реакції, що каталізується β -галактозидозою за рН 7,0 та 25 °С, використовуючи дані табл. 2.2.



3. Експериментальне визначення K'_p і $\Delta G'^0$ за перетворення глюкозо-1-фосфату (0,1 М) на глюкозо-6-фосфат. У рівноважному стані концентрація компонентів цієї реакції, яка каталізується фосфоглюкомутазою, буде такою:



4. Відмінність між $\Delta G'^0$ та ΔG . Розгляньте таку оборотну гліколітичну реакцію:



А) Якою є $\Delta G'^0$ для цієї реакції за 25 °С?

Б) Якщо концентрація фруктозо-6-фосфату = 1,5 М, а глюкозо-6-фосфату – 0,5 М, то якою буде ΔG ?

В) Чому значення $\Delta G'^0$ та ΔG відрізняються?

5. Обчислити дійсну зміну вільної енергії ΔG для екзергонічної реакції гідролізу крефтинфосфату до креатину, яка відбувається у саркоплазмі міоциту щура за таких умов: 25 °С, концентрація креатинфосфату 28 мМ, креатину 1,4 мМ, АДФ – 0,93 мМ, АТФ – 8,05 мМ.

6. Вплив рН на гідроліз АТФ. $\Delta G'^0$ за гідролізу АТФ у стандартних умовах (рН 7,0) дорівнює -30,5 кДж/моль. Як вплине на кількість вивільненої енергії зменшення рН до 5,5?

7. Виберіть правильне формулювання першого закону термодинаміки:

- 1) енергія не створюється і не зникає, а перетворюється з одного виду в інший;
- 2) енергія не створюється, а перетворюється з одного виду в інший;
- 3) теплота не може самовільно переходити від менш нагрітого тіла до більш нагрітого;
- 4) енергія, отримана тілом, витрачається на виконання механічної роботи.

8. Виберіть правильні формулювання другого закону термодинаміки:

- 1) енергія не створюється і не зникає, а перетворюється з одного виду в інший;
- 2) енергія не створюється, а перетворюється з одного виду в інший;
- 3) ступінь неупорядкованості системи, мірою якої є ентропія, завжди зростає;
- 4) будь-який природний процес супроводжується зростанням ентропії Всесвіту.

² Для розв'язання цього та інших завдань можна скористатися даними із табл. 2.3

9. Ентропія (ΔS) – це:

- 1) кількісний показник ступеня неупорядкованості або хаотичності системи;
- 2) вміст тепла у реакційній системі, що відображає кількість і природу хімічних зв'язків у субстратах і продуктах реакції;
- 3) кількість енергії, необхідної для виконання роботи у ході реакції при постійних значеннях температури і тиску.

10. Якщо реакція супроводжується вивільненням енергії, а величина зміни вільної енергії ΔG має від'ємне значення, таку реакцію називають:

- 1) екзергонічною; 2) ендергонічною; 3) футильною; 4) нейтральною.

11. Від чого залежить зміна вільної енергії реакції?

- 1) від того, яким шляхом відбувається реакція;
- 2) від природи та концентрації субстратів реакції;
- 3) від природи та концентрації кінцевих продуктів реакції.

12. Якщо продукти реакції менш складні за будовою і менше впорядковані, ніж субстрати, то вважають, що така реакція супроводжується:

- 1) зростанням ентропії;
- 2) зменшенням ентропії;
- 3) незмінною ентропією;
- 4) зменшенням ентальпії.

13. Виберіть правильні характеристики екзотермічних реакцій.

- 1) супроводжуються вивільненням тепла;
- 2) вміст тепла у продуктах такої реакції є нижчим, ніж у субстратах;
- 3) характеризуються від'ємним значенням ентальпії;
- 4) поглинають тепло з навколишнього середовища.

**ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

- Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основы биохимии за Ленинджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
Деякі приклади розрахунків термодинамічних показників узяті з цього підручника.
- Осипов А.И. Термодинамика вчера, сегодня, завтра. Ч. 1. Равновесная термодинамика // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 4. – С. 79–85.
- Пригожин И., Кондепуди Д. Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур. – Москва: Мир, 2002. – 464 с.
- Рубин А.Б. Термодинамика биологических процессов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 77–83.
- Atkins P.W. The Second Law. – New York: Scientific American Books, 1984. – 216 p.
- Bergethon P.R. The Physical Basis of Biochemistry. – New York: Springer Verlag, 1988. – 137 p.
- Harold F.M. The Vital Force: A study of Bioenergetics. – New York: W.H. Freeman and Company, 1986. – 577 p.
- Harris D.A. Bioenergetics at a Glance: an Illustrated Introduction. – Chichester: John Wiley & Sons, 2009. – 115 p.

БУДОВА І ФУНКЦІЇ МІТОХОНДРІЙ

- Розподіл і локалізація мітохондрій у клітині
- Розміри, форма й ультраструктура мітохондрій
- Взаємозв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикулулом
- Мітохондріальна ДНК

3.1. РОЗПОДІЛ І ЛОКАЛІЗАЦІЯ МІТОХОНДРІЙ У КЛІТИНІ

Мітохондрія (від грец. *μῖτος* – нитка та *κονδρίον* – гранула, тобто ланцюг намистин) – двомембранна органела, наявна у більшості клітин еукаріот. Термін “мітохондрія” придумав у 1898 р. Карл Бенда (Carl Benda). Бенджамін Ф. Кінгсбурі (Benjamin F. Kingsbury) у 1912 р. уперше пов’язав мітохондрії з клітинним диханням на підставі морфологічних спостережень, а у 1957 р. Філіп Сікевич (Philip Siekevitz) назвав їх “силовими станціями клітини”.

Відповідно до ендосимбіотичної гіпотези, мітохондрії походять з вільноживучих прокаріот, близьких до сучасних протеобактерій, наприклад, до *Rickettsia prowazekii* (рис. 3.1). Відповідно до цієї гіпотези, мітохондрії з’явилися у результаті того, що гіпотетична анаеробна прокаріотична клітина, яка не могла використовувати (чи неефективно використовувала) кисень для окиснення органічних речовин і отримання енергії, фагоцитувала, але не перетворила аеробну бактерію, яка перетворилася на мітохондрію. У процесі розвитку такого внутрішнього симбіозу (ендосимбіозу) аеробна бактерія передала частину своїх генів ядру нової, тепер вже еукаріотичної клітини. Тому сучасні мітохондрії не є самостійними організмами. Хоча їхній геном кодує деякі власні білки, переважна кількість білків, необхідних для функціонування мітохондрій, кодуються ядерною ДНК, синтезуються у клітині, а потім транспортуються до органел.

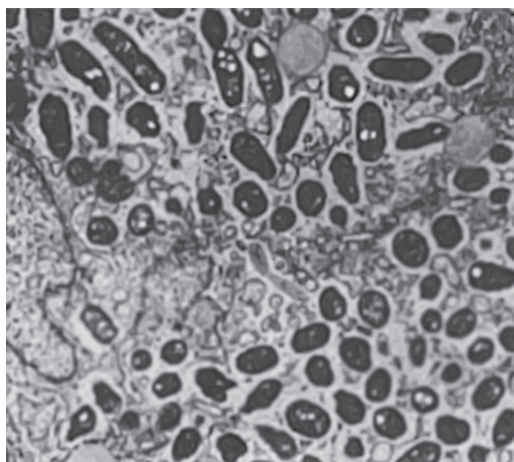


Рис. 3.1. Бактерії *Rickettsia prowazekii* (чорного кольору) у цитоплазмі фібробласта ембріона курчати ($\times 13\,600$)

Rickettsia prowazekii – патогенні бактерії, збудники епідемічного висипного тифу. За роки Першої та Другої світових воєн *R. prowazekii* інфікували близько 30 млн осіб [Andersson et al., 1998] і продовжують залишатись небезпечними для здоров'я людей. Клітини *R. prowazekii* містять інтрацитоплазматичні вп'ячування плазматичної мембрани, подібні до крист мітохондрій. Інвазія *R. prowazekii* в людську клітину-хазяїна (найчастіше фагоцита) відбувається у три етапи: приєднання (через OmpA білок і рецептор клітини-хазяїна), проникнення у клітину і завчасний вихід із фагосоми до лізосомального розщеплення [Yu & Walker, 2005]. *R. prowazekii* має добре проникну плазматичну мембрану. Інтермедіати гліколізу і деякі важливі метаболіти (наприклад, ацетил-КоА) надходять від клітини-хазяїна. Подібно до мітохондрій ці бактерії продукують власну АТФ за допомогою ферменту АТФ-ази [Yu & Walker, 2005].

Мітохондрії, очевидно, походять із вільноживучих аеробних прокаріот, які вступили у тісний симбіоз (ендосимбіоз) із анаеробною прокаріотичною клітиною, втративши значну частину своїх генів. Сучасні мітохондрії не є самостійними організмами.

Мітохондрії наявні в цитоплазмі практично всіх аеробних еукаріотів¹. Їхня кількість у клітині більш-менш постійна і характерна для певного типу клітин, однак може змінюватися на різних стадіях розвитку клітини та її функціональної активності. Поділ мітохондрій відбувається після завершення поділу клітини. Типова еукаріотична клітина містить близько 1–2 тис. мітохондрій, які

¹ Мітохондрій немає у зрілих еритроцитах ссавців, основним джерелом енергії у яких є гліколіз. Їх немає також у деяких найпростіших, зокрема, у представників *Archamoebae* (група аміб родів *Entamoeba* і *Endolimax*) і *Metamonada* (група безмітохондріальних джгутикових), серед яких є внутрішні паразити, коменсали та вільноживучі

займають приблизно одну п'яту її об'єму. Наприклад, у печінці на частку мітохондрій припадає 22 % об'єму клітини. Проте кількість мітохондрій у різних організмах суттєво відрізняється. Так, одноклітинні зелені водорості (евглена, хлорела, політомела) і трипаносомі мають лише одну гігантську мітохондрію, тоді як ооцити й амеба *Chaos chaos* містять 300 000 і 500 000 мітохондрій відповідно.

Часто мітохондрії утворюють доволі розгалужену сітку, яка забезпечує їхню кооперативну роботу і трапляється як в одно-, так і в багатоклітинних організмах. Особливо складно вона облаштована у м'язах (рис. 3.2), де групи мітохондрій зв'язані між собою за допомогою міжмітохондріальних контактів. Останні утворюються щільно прилеглими зовнішніми мембранами мітохондрій.

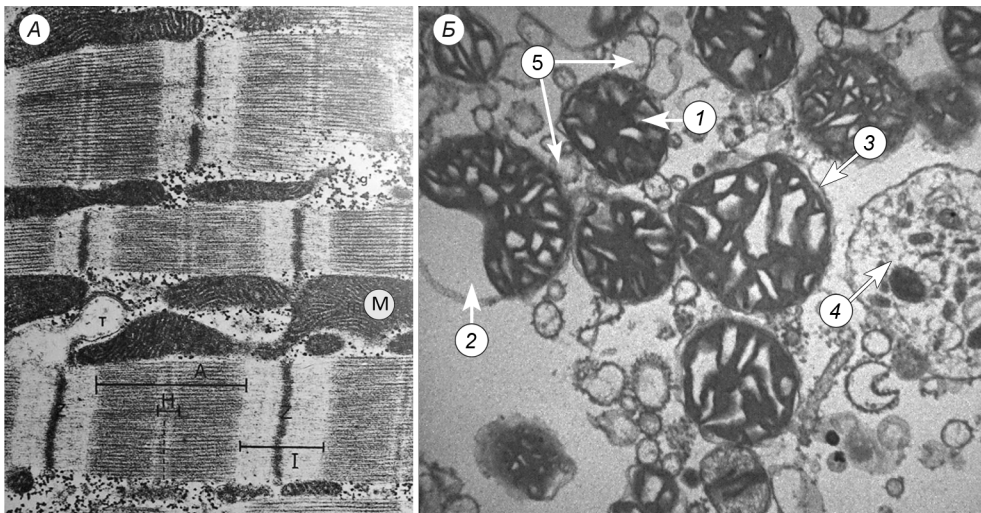


Рис. 3.2. Електронні мікрофотографії мітохондрій: А – добре розвинута мітохондріальна сітка (М) навколо серцевих міофібрил і Т-трубочок (Т). $\times 32\,000$ [Moravcs, 1981]; Б – ізольовані мітохондрії печінки миші. $\times 10\,000$. 1 – зрілі мітохондрії; 2 – старі мітохондрії; 3 – зовнішня мембрана мітохондрій; 4 – автофагосома; 5 – асоційовані з мітохондріями мембрани [Гренюх та ін., 2015]

Мітохондрії часто розташовані безпосередньо біля структур, які потребують АТФ, або біля джерел енергетичного “палива”, в якому вони мають потребу. У клітинах літальних м’язів комах мітохондрії розміщені правильними рядами уздовж міофібрил. Це скорочує відстань для транспорту АТФ до м’язових протофібрил. В епітеліальних секреторних клітинах локалізація мітохондрій узгоджується з напрямком руху секрету, для утворення якого необхідна АТФ: органели зазвичай концентруються в місцях синтезу зимогенів, а далі уздовж шляхів транспорту секреторних гранул у напрямку апікальної мембрани. Часто мітохондрії розташовуються біля цитоплазматичних жирових крапель, що містять жирні кислоти, які використовуються клітиною як енергетичні субстрати. Мітохондрії можуть відносно вільно переміщатись у цитоплазмі (як, наприклад, у печінці) або займати фіксоване положення (у м’язових клітинах).

3.2. РОЗМІРИ, ФОРМА Й УЛЬТРАСТРУКТУРА МІТОХОНДРІЙ

Розміри та форма мітохондрій змінюються залежно від типу клітин. У дріжджів їхня форма сферична, у печінці – видовжена, у нирках – циліндрична, у фібробластах і дендритах нейронів – ниткоподібна. Довжина типової мітохондрії печінки становить 2 мкм, а ширина – 1 мкм. Але її розміри та форма можуть змінюватись у різних метаболічних станах клітини. Часто мітохондрії утворюють цілі агрегати, з'єднуючись у ниткоподібні структури. Трапляються пластинчасті й зірчасті мітохондрії.

Мітохондрії містять зовнішню та внутрішню мембрани, міжмембранний простір і мітохондріальний матрикс.

Зовнішню мембрану мітохондрій можна відділити від внутрішньої (рис. 3.3). Зокрема, внаслідок обробки мітохондрій спеціальним детергентом вона відокремлюється від внутрішньої мембрани і може бути виділена центрифугуванням у градієнті густини сахарози у вигляді суспензії порожніх оболонок. Зовнішня мембрана завтовшки 7 нм не має складок і вигинів. На неї припадає 7 % від площі поверхні усіх мембран внутрішньоклітинних органел. Основними функціями зовнішньої мембрани є ізолювання мітохондрії від цитоплазми та забезпечення вибіркового проникнення деяких речовин.

До складу зовнішньої мембрани мітохондрій входять фосфоліпіди і білки у такому ж співвідношенні, як і у плазматичній мембрані еукаріот (приблизно 1:1 за масою). Особливо важливим для плазматичної мембрани є каналотворюючий білок **порин**. Він формує пору діаметром 2–3 нм, крізь яку можуть вільно проникати молекули й іони молекулярною масою до 5 кДа. Більші молекули можуть проникати крізь зовнішню мембрану мітохондрій завдяки активному транспорту за допомогою інших транспортних білків. Під час такого транспортування білкових молекул вони приєднуються своїми N-терміналами до великих мультимолекулярних мембранних комплексів – транслоказ, які й транспортують їх крізь мембрану. Пошкодження зовнішньої мембрани дає змогу білкам міжклітинного простору (наприклад, цитохрому c) витікати у цитоплазму, що спричиняє смерть клітини через апоптоз.

Маркерним ферментом¹ зовнішньої мембрани мітохондрій є моноаміноксидаза. Характерними ферментами цієї мембрани є також ацил-КоА-синтаза і фосфоліпаза A2. Зовнішня мембрана містить також ферменти, залучені в подовження ланцюгів жирних кислот, окислення адреналіну і біодеградацію триптофану. Вона може взаємодіяти з ендоплазматичним ретикулулом, утворюючи

¹ Маркерним ферментом називають такий фермент, який притаманний певній мембрані (органелі) і який можна використати для ідентифікації цієї мембрани чи визначення ступеня чистоти/забруднення препарату, отриманого диференційним центрифугуванням після гомогенізації тканини

спеціальні мембранні структури, які відіграють важливу роль у Ca^{2+} -сигналізації і транспортуванні ліпідів між мембранами ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій.

Міжмембранний простір розташований між зовнішньою і внутрішньою мембранами мітохондрій (рис. 3.3). Його ширина становить 10–20 нм. Оскільки зовнішня мембрана є проникною для низькомолекулярних сполук (зокрема, цукрів) та іонів, їхня концентрація в міжмембранному просторі є такою, як і в цитоплазмі. Навпаки, великі білки не можуть вільно проникнути з міжмембранного простору в цитоплазму і навпаки. Одним із білків міжмембранного простору мітохондрій є цитохром *c* – компонент дихального ланцюга, який слугує маркером цього компартменту мітохондрій.

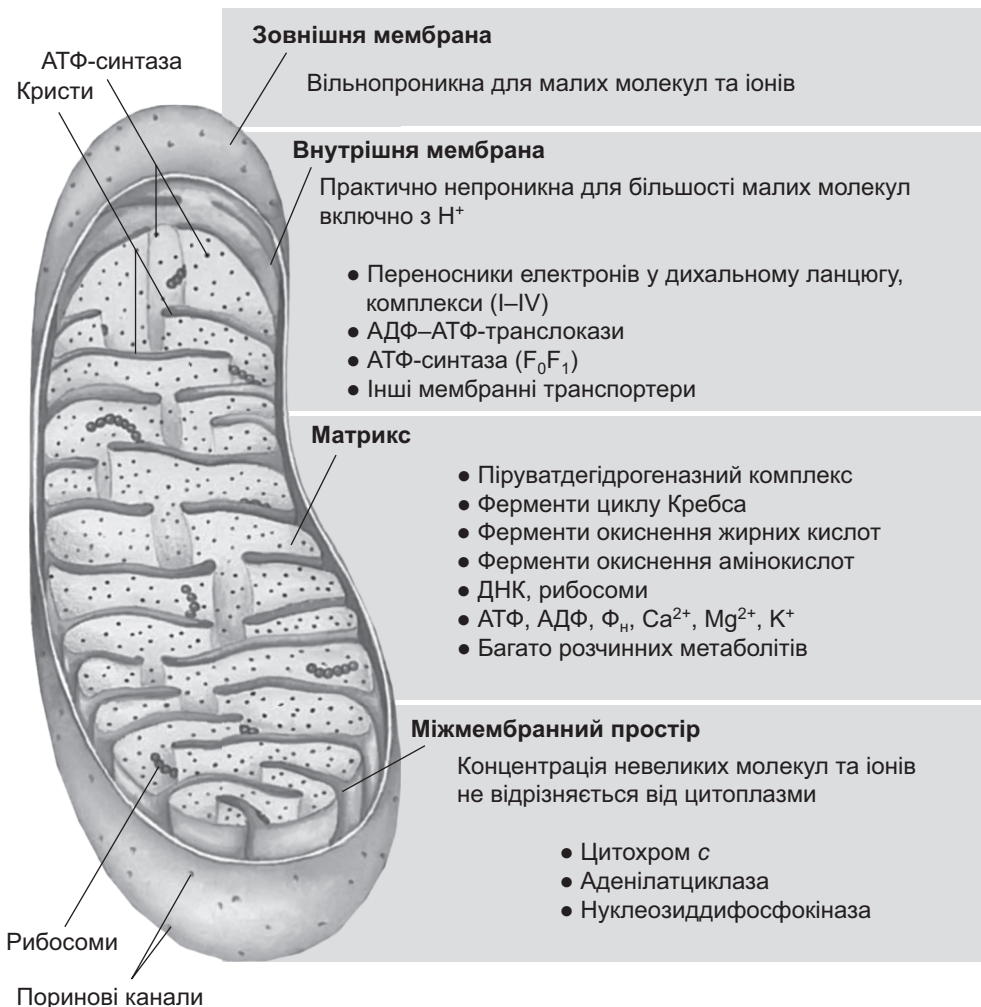


Рис. 3.3. Структурно-функціональна будова мітохондрії

На відміну від зовнішньої мембрани, внутрішня мембрана мітохондрій не містить поринів. Для транспортування іонів і молекул є спеціальні мембранні транспортні системи. Наприклад, для транспорту білків функціонують транслокази, зокрема, транслоказа внутрішньої мембрани (TIM) або пороутворювальна транслоказа (Oxa-1). Внутрішня мембрана містить також білки дихального ланцюга, які генерують мембранний потенціал (протонний градієнт), а також АТФ-синтазні комплекси. У кожній мітохондрії печінки налічують до 5 000, а в серці – до 20 000 дихальних ланцюгів. Маркером внутрішньої мембрани мітохондрій є фермент цитохромоксидаза.

Матрикс мітохондрій – це обмежений внутрішньою мембраною простір (рис. 3.3). У матриксі є ферментні системи окиснення пірувату, жирних кислот і три- та дикарбонових кислот (субстратів циклу Кребса). Маркерними ферментами матриксу є малатдегідрогеназа та глутаматдегідрогеназа. Крім того, тут розташовані мітохондріальні рибосоми, ДНК, РНК і власний білоксинтезувальний апарат. Матрикс містить 2/3 загального білка цієї органели.

3.3. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІТОХОНДРІЙ З ЕНДОПЛАЗМАТИЧНИМ РЕТИКУЛУМОМ

Останнім часом інтенсивно досліджують **асоційовані з мітохондріями мембрани ендоплазматичного ретикулу** (mitochondria-associated ER membrane, MAM) – структурні елементи, що забезпечують структурний і функціональний зв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикуломом (рис. 3.5). Такі структури відіграють важливу роль у фізіологічних процесах клітини, зокрема – у Ca^{2+} -сигналізації. Досить ґрунтовно структура і функції МАМ описані Джоною Ванс [Jean E. Vance, 2014]. Уперше вони були виявлені як “забруднення” фракції ендоплазматичного ретикулу, отриманої методом диференційного центрифугування, а згодом – на електронних і флюоресцентних фото.

Разом із ендоплазматичним ретикуломом мітохондрії можуть утворювати комплекс, який відіграє важливу роль у синтезі мембранних ліпідів і Ca^{2+} -сигналізації у клітині.

Відстань між мембраною ендоплазматичного ретикулу і зовнішньою мембраною мітохондрії, які зв'язані між собою специфічним (tethering) білковим комплексом, є 10–25 нм. МАМ збагачені ферментами біосинтезу ліпідів. З'ясовано, що до 20 % зовнішньої мембрани мітохондрій можуть бути залучені до формування контактів з ендоплазматичним ретикуломом, у тому числі та завдяки якірним білкам родини MFN (мітофузини). Міжмембранні контакти відіграють важливу роль у регулюванні структури та функції мітохондрій і життєздатності клітин. Оскільки мітохондрії постійно змінюють свою форму (то набухають, то зморщуються), вони потребують добре регульованої системи переміщення фосfolіпідів від ендоплазматичного ретикулу і назад. На думку Дж. Ванс, у клітинах ссавців власне контакти між ендоплазматичним ретикуломом і мітохондріями

залучені в імпорт фосфатидилсерину з ендоплазматичного ретикулуму. Такий транспорт залежить від МАМ, які опосередковують пересування ліпідних інтермедіатів між органелами. Це необхідно не тільки для декарбоксилювання до фосфатидилетаноламіну, але й для транспорту проміжних сполук і продуктів синтезу, а також для підтримання катаболізму цераміду і холестеролу й анаболізму гліко-сфінголіпідів (рис. 3.5).

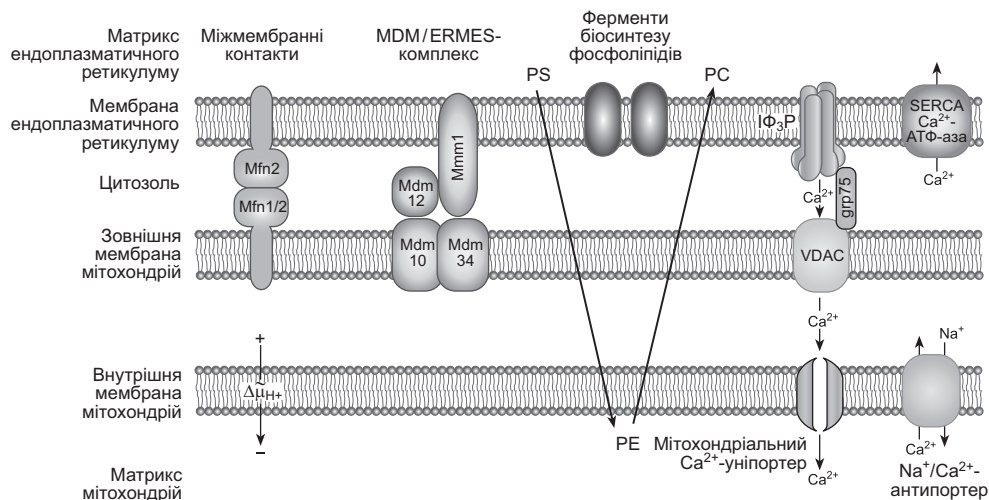


Рис. 3.5. Структурний і функціональний зв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикулумом через асоційовані з мітохондріями мембрани (ММ): PS – фосфатидилсерин; PC – фосфатидилхолін; PE – фосфатидилетаноламін; VDAC – потенціалозалежний аніонний канал; Grp75 – регульований глюкозою білок; IP₃Р – інозитол-3-фосфатчутливий рецептор; MCU – мітохондріальний кальцієвий уніпортер; MFN – мітофузини

Важливе значення у транспортуванні ліпідів між ендоплазматичним ретикулумом і мітохондріями відіграє перескакування фліп-флоп (flipping) ліпідів із протилежних бішарів ліпідного матриксу мембрани. Це енергозатратний процес, який, тим не менше, відбувається без АТФ завдяки мультибілковій природі **контактної структури ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій** (*ER-mitochondria encounter structure*, або *ERMES*). Поки що незрозуміло, чи ця структура безпосередньо сприяє транспорту ліпідів, чи знижує енергетичний бар'єр для переміщення ліпідів фліп-флоп. ММ може відігравати роль також у секреції як проміжна ланка між ендоплазматичним ретикулумом і апаратом Гольджі, коли утворюються ліпопротеїни низької щільності.

Важливою є участь ММ у Ca²⁺-сигналізації клітин, оскільки у просторі між двома наближеними ділянками мембран (ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій) виникають передумови для виникнення Ca²⁺-мікродомів із підвищеною його концентрацією. Це сприяє транспорту Ca²⁺, вивільненого з ендоплазматичного ретикулуму, у матрикс мітохондрій. Така можливість є наслідком того, що у мембрані ендоплазматичного ретикулуму є IP₃-чутливі Ca²⁺-канали (inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP₃Rs), а в зовнішній мембрані мітохондрій – потенціалозалежні аніонні канали (voltage dependent anion channels, VDAC),

для яких характерна висока проникність для катіонів Ca^{2+} (рис. 3.5). У внутрішній мембрані мітохондрій розташований Ca^{2+} -уніпортер. Локальне зростання концентрації Ca^{2+} внаслідок активації IF_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів є достатнім для активації Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій. Здатність мітохондрій акумулювати Ca^{2+} визначається **протонним електрохімічним градієнтом**¹, що генерується дихальним ланцюгом і робить тунелювання цих катіонів екзергонічним процесом. VDAC також запобігає надмірному навантаженню мітохондрій катіонами Ca^{2+} , оскільки провідність цього каналу залежить від величини мембранного потенціалу мітохондрій: за низького значення мембранного потенціалу він є непроникним для них.

За принципом зворотного негативного зв'язку МАМ також координують роботу IF_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів і Ca^{2+} -помп ендоплазматичного ретикулуму (sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA). Отже, МАМ допомагає регулювати обмін Ca^{2+} між ендоплазматичним ретикулумом і мітохондріями. Це важливо ще й тому, що в циклі Кребса функціонують Ca^{2+} -залежні ферменти. Помірне зростання Ca^{2+} у матриксі мітохондрій стимулює їх, а відтак і підвищує мембранний потенціал мітохондрій. Якщо ж рівень Ca^{2+} зросте вище певного критичного значення, то це, навпаки, ініціює колапс мембранного потенціалу мітохондрій і розвиток апоптозу. Встановлено, що антиапоптозний фактор Bcl-2 взаємодіє із IF_3 -чутливими Ca^{2+} -каналами для зменшення вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму, що приводить до запобігання перевантаженню мітохондрій катіонами Ca^{2+} і колапсу потенціалу. Не дивно, що порушення Ca^{2+} -акумулюючої функції мітохондрій спостерігають під час кількох нейродегенеративних хвороб, а каталог ракових супресорів включає деякі компоненти МАМ. Ушкодження МАМ може бути причетне до розвитку деяких вірусних інфекцій, порушення гомеостазу глюкози та інсулінової резистентності.

3.4. МІТОХОНДРІАЛЬНА ДНК

Мітохондрії мають свою власну ДНК – мтДНК і системи для синтезу мРНК та білків. Найбільш подібний геном мітохондрій до геному мікроорганізму *Rickettsia prowazekii*. Мітохондріальна ДНК кодує кілька мітохондріальних білків, які органела використовує поряд із білками, що кодуються ДНК клітинного ядра (рис. 3.6).

Мітохондрії мають свій власний генетичний матеріал і системи для обмеженого виробництва РНК та білків. Мітохондрії використовують також білки, що кодуються генами клітинного ядра.

¹ Електрохімічний градієнт — градієнт електрохімічного потенціалу іона, який може проникати крізь мембрану. Електрохімічний градієнт складається з градієнта концентрації (різниця концентрацій речовини по обидва боки мембрани) та мембранного градієнта потенціалу (градієнт електричного поля у мембрані)

У людини мтДНК має вигляд замкнутої кільцевої двоспиральної молекули, що містить 16 569 нуклеотидних пар у довжину. Це у 105 разів менше, ніж довжина ядерної ДНК. Одна некодуюча частина мтДНК, яку називають D-петлею, має додатковий короткий ланцюг ДНК з константою седиментації 7S. Мітохондріальна ДНК має лише 37 генів, які кодують 13 субодиниць дихального ланцюга (сім субодиниць НАДН-дегідрогенази, три субодиниці цитохромоксидази, дві субодиниці АТФ-синтетази й одну субодиницю убіхінол-цитохром-с-редуктази), дві рибосомальні РНК (рРНК) і 22 транспортні РНК (тРНК). Отже, мітохондрії не забезпечують навіть половини білків свого дихального ланцюга.

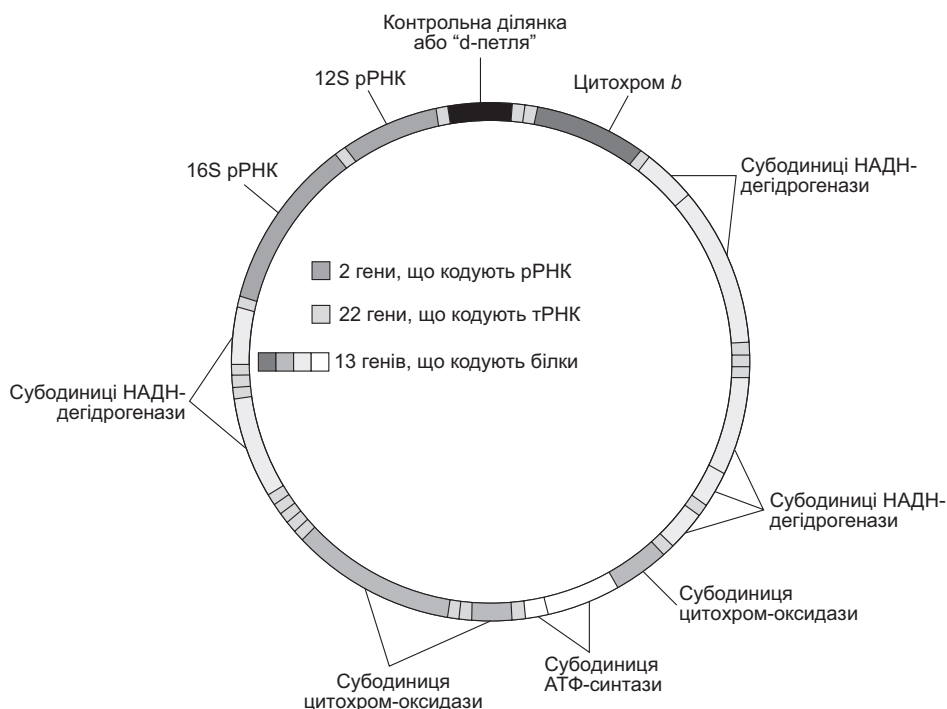


Рис. 3.6. Структурно-функціональна організація мітохондріальної ДНК

Мітохондріальна ДНК реплікується в інтерфазі клітинного циклу, що частково синхронізовано з реплікацією ДНК у ядрі. Під час клітинного циклу мітохондрії діляться навпіл перетяжкою, яка започатковується кільцевою борозенкою на внутрішній мембрані мітохондрій.

У ДНК мітохондрій тварин і грибів нерідко спостерігають відхилення від універсального генетичного коду. Так, у мітохондріях людини кодон ТАТ замість ізолейцину в стандартному коді кодує амінокислоту метіонін, а кодони ТСТ і ТСС, які зазвичай кодують аргінін, є стоп-кодонами. Окрім власного генетичного апарату, мітохондрії мають і свою білоксинтезуючу систему. Рибосоми мітохондрій є меншими (константа седиментації 55 S) за цитоплазматичні (80 S для еукаріот).

Встановлено, що мтДНК у людей успадковується незмінною від покоління в покоління по материнській лінії, тоді як мітохондрії сперматозоїда руйнуються після запліднення. мтДНК не є висококонсервативною і має вищу швидкість мутації, тому є хорошим об'єктом для дослідження філогенії (еволюційної спорідненості) живих організмів. Для цього визначають послідовності мтДНК у різних видів і за допомогою комп'ютерних програм отримують філогенетичне (еволюційне) дерево. Дослідження мтДНК у популяціях людини дало змогу вчислити своєрідну "мітохондріальну Єву", гіпотетичну прародительку всіх людей, які живуть на Землі. У 1987 р. Ребекка Канн (Rebecca Cann) з колегами розрахували, що "мітохондріальна Єва" могла жити десь між 140 тис. і 280 тис. років тому у Східній Африці (рис. 3.7). За найдревнішого розподілу предкової популяції людей утворилося чотири головних гаплогрупи – L0, L1, L2 і L3. Із них перша переважає у бушменів, друга – у пігмеїв. Дві останні також існують у африканських народів, але тільки від гаплогрупи L3 походять макрогрупи M і N, носії яких мігрували з Африки до Євразії.



Рис. 3.7. Міграції людини і мітохондріальні гаплогрупи

Підсумок 3. БУДОВА І ФУНКЦІЇ МІТОХОНДРІЙ

- Мітохондрії відіграють важливу роль в енергетичному забезпеченні більшості клітин.
- Згідно з ендосимбіотичною теорією, мітохондрії походять з вільноживучих клітин прокаріот. Із нині живучих бактерій мітохондрії філогенетично найближчі до *Rickettsia prowazekii*. Сучасні мітохондрії не є самостійними організмами.

- Мітохондрії часто розташовуються безпосередньо біля структур, які потребують АТФ, або біля джерел енергетичного “палива”, в якому вони мають потребу.
- Структуру мітохондрій поділяють на зовнішню та внутрішню мембрани, міжмембранний простір і матрикс. Кожний компартмент мітохондрій має свій набір маркерних ферментів.
- Разом із ендоплазматичним ретикуломом мітохондрії можуть утворювати комплекс, який відіграє важливу роль у синтезі мембранних ліпідів і Ca^{2+} -сигналізації у клітині. Важливу роль у формуванні цього зв'язку відіграють асоційовані з мітохондріями мембрани ендоплазматичного ретикулуму.
- Мітохондрії мають власний генетичний матеріал і системи для синтезу РНК та білків. У людини мтДНК має вигляд замкнутої кільцевої двоспіральної молекули і кодує незначну частину мітохондріальних білків. Мітохондріальну ДНК успадковують незмінною від покоління до покоління по материнській лінії.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Відповідно до ендосимбіотичної теорії мітохондрії походять:**
 - 1) із вільноживучих клітин прокаріот, родичів сучасних протеобактерій;
 - 2) із ендоплазматичного ретикулуму;
 - 3) із *Rickettsia prowazekii*;
 - 4) із *E. coli*.
- Вибрати клітини, у яких немає мітохондрій:**
 - 1) еритроцити;
 - 2) ооцити;
 - 3) амеба *Chao chaos*;
 - 4) дизентерійна амеба (*Entamoeba histolytica*).
- Виберіть ферменти-маркери матриксу мітохондрій:**
 - 1) моноамінооксидаза;
 - 2) цитохромоксидаза;
 - 3) малатдегідрогеназа;
 - 4) глутаматдегідрогеназа.
- Субодиниці яких ферментів і переносників електронів кодує мтДНК?**
 - 1) цитохром *b*;
 - 2) НАДН-дегідрогеназа;
 - 3) цитохромоксидаза;
 - 4) сукцинатдегідрогеназа.

5. **Виберіть фермент-маркер зовнішньої мембрани мітохондрій:**
 - 1) моноамінооксидаза;
 - 2) цитохромоксидаза;
 - 3) малатдегідрогеназа;
 - 4) глутаматдегідрогеназа.
6. **Який білок розташований у міжмембранному просторі мітохондрій і є одним із компонентів дихального ланцюга?**
 - 1) аденілатциклаза;
 - 2) нуклеозиддифосфокіназа;
 - 3) убіхінон;
 - 4) цитохром *c*.
7. **Назвіть правильні характеристики фосфоліпиду кардіоліпіну:**
 - 1) розміщений у зовнішній мембрані мітохондрій;
 - 2) містить чотири жирні кислоти;
 - 3) робить мембрану практично непроникною для протонів;
 - 4) типовий для плазматичної мембрани еукаріотів.
8. **Чому мтДНК є зручним об'єктом для дослідження еволюційної спорідненості живих організмів?**
 - 1) успадковується незмінною від покоління в покоління по материнській лінії;
 - 2) мітохондрії сперматозоїда руйнуються після запліднення;
 - 3) має високу швидкість мутації;
 - 4) усі відповіді правильні.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Гренюх В.П., Луцик М.Д., Стойка Р.С., Бабський А.М. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly та печінки миші // *Studia Biologica*. – 2015. – Vol. 9, N 2. – P. 39–50.
- Andersson G.E., Zomorodipour A., Andersson J.O. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria // *Nature*. – 1998. – Vol. 396. – P. 133–143.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution // *Nature*. – 1987. – Vol. 325, N 6099. – P. 31–36.
- Emelyanov V.V. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell // *Eur. J. Biochem.* – 270, N8. – P. 1599–1618.
- Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., Su T.P. MAM: more than just a housekeeper // *Trends Cell Biol.* – 2009. – Vol. 19, N 2. – P. 81–88.
- Henze K., Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria // *Nature*. – 2003. – Vol. 426, N 6963. – P. 127–128.
- Kopach O., Kruglikov I., Pivneva T. et al. Functional coupling between ryanodine receptors, mitochondria and Ca^{2+} ATPases in rat submandibular acinar cells // *Cell Calcium*. – 2008. – Vol. 43, N 5. – P. 469–481.

- McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S.* Mitochondria: more than just a powerhouse // *Curr. Biol.* – 2006. – Vol.16, N 14. – P. R551–560.
- Moravec J., Moravec M., Hatt P.Y.* Rate of pyridine nucleotide oxidation and cytochrome oxidase interaction with intracellular oxygen in hearts from rats with compensated volume overload // *Pflügers Arch.* – 1981. – Vol. 392, N 2. – P. 106–114.
- Vance J.E.* MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1841, N 4. – P. 595–609.
- Osman C., Voelker D.R., Langer T.* Making heads or tails of phospholipids in mitochondria // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 192, N 1. – P. 7–16.
- Pizzo P., Pozzan T.* Mitochondria–endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics // *Trends Cell Biol.* – 2007. – Vol. 17, N 10. – P. 511–517.

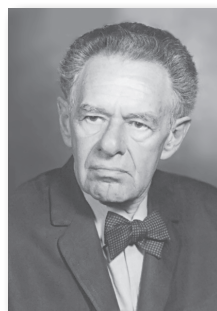
АТФ ЯК ДЖЕРЕЛО ЕНЕРГІЇ

- Скільки АТФ утворюється в організмі?
- Зміна стандартної вільної енергії у реакції гідролізу АТФ
- Постачання енергії від АТФ способом перенесення групи
- Енергетична та регуляторна роль аденілаткінази й АМФ-залежної кінази
- Інші макроергічні сполуки

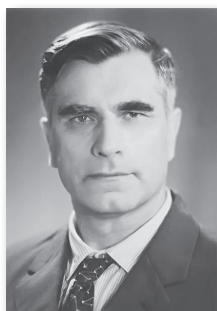
Визначальні дослідження, що постулювали роль АТФ як основного джерела енергії, були проведені у 30–40-х рр. ХХ ст. Відомий біохімік Фріц Ліпман висловив гіпотезу, що різні реакції вивільнення енергії спряжені зі синтезом АТФ із його попередників – АДФ і неорганічного фосфату (P_i , або HPO_4^{2-}). З іншого боку, реакції розщеплення (гідролізу) АТФ до АДФ і P_i спряжені, за Ліпманом, зі здійсненням різних типів корисної роботи. Іншими словами, утворення АТФ є універсальним механізмом накопичення енергії, а розщеплення АТФ – універсальним механізмом постачання енергії.

Ще до публікації гіпотези Ф. Ліпмана академік АН СРСР Володимир Енгельгардт і відомий український біохімік академік АН УРСР Володимир Бєлицер встановили, що внутрішньоклітинне дихання, тобто окиснення гідрогену карбонових кислот киснем, спряжене зі синтезом АТФ. Утворення АТФ відбувається також за анаеробного гліколізу (розщеплення вуглеводів до молочної кислоти за анаеробних умов).

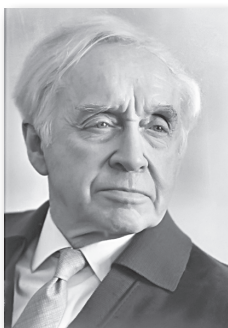
У той самий час було описано численні випадки енергозабезпечення роботи клітини завдяки гідролізу АТФ. Виявилося, що синтез білків, жирів, вугле-



Ф. Ліпман
(1899–1986)



В.О. Бєлицер
(1906–1988)



В.О. Енгельгардт
(1894–1984)

водів і нуклеїнових кислот із відповідних мономерів “оплачується” енергією АТФ. Володимир Енгельгардт і Міліца Любімова виявили розщеплення АТФ скорочувальним м'язовим білком міозином. Це відкриття дало змогу зрозуміти, яким чином робота м'яза забезпечується енергією. Альберт Сент-Дьйорді (Albert Szent-Gyorgyi) встановив, що за взаємодії актину з міозином утворюється комплекс – актоміозин, ферментна активність якого майже у 10 разів вища від активності міозину. На сьогодні безсумнівною є причетність АТФ також і до інших процесів, що використовують енергію. Сайрес Фіске (Cyrgus Fiske) та Єлапраґада Суббароу (Yellapragada Subbarow) розробили метод визначення вмісту фосфору в біологічних рідинах і тканинах організму.

4.1. СКІЛЬКИ АТФ УТВОРЮЄТЬСЯ В ОРГАНІЗМІ?

АТФ відіграє особливу роль в обміні енергії, у поєднанні реакцій катаболізму й анаболізму та у виконанні зовнішньої роботи. Хемогетеротрофні організми отримують енергію, розщеплюючи поживні речовини – вуглеводи, білки і жири до мономерів та окиснюючи їх. Цю енергію вони використовують для синтезу АТФ з АДФ і P_n . У свою чергу, вивільнена енергія внаслідок розщеплення АТФ до АДФ і P_n використовується у клітині для здійснення таких ендергонічних процесів, як синтез проміжних метаболітів і макромолекул, транспортування речовин крізь мембрани проти їхнього електрохімічного чи концентраційного градієнта, механічний рух секреторних везикул, протофібр-

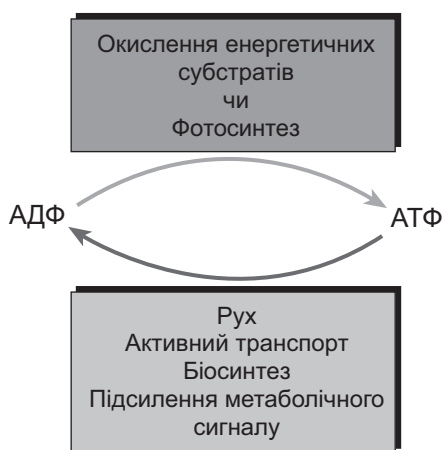


Рис. 4.1. Роль АТФ в обміні енергії та у поєднанні реакцій катаболізму й анаболізму

рил, джгутиків, війок, псевдоподій та інших клітинних органел (рис. 4.1). Як правило, АТФ виконує роль донора енергії, вступаючи у реакцію, яку треба активувати, та розщеплюючись у ході такої реакції на АДФ та P_n або, у деяких випадках, на АМФ та PP_n .

Варто зазначити, що АТФ використовується у клітині не лише як джерело енергії, але і як субстрат деяких реакцій. Зокрема, він є донором фосфатної групи у кіназному шляху трансдукції сигналу (реакції фосфорилювання білків і ліпідів), а також субстратом аденілатциклази (реакція синтезу цАМФ), ДНК-полімерази (процеси реплікації ДНК) і РНК-полімерази (процеси транскрипції).

Доросла здорова людина масою 70 кг, займаючись сидячою роботою, має споживати протягом дня їжі енергетичною цінністю приблизно 9 600 кДж. Беручи до уваги, що коефіцієнт ефективності перетворення енергії харчових продуктів на енергію макроергічного зв'язку АТФ становить приблизно 50 %, а за гідролізу АТФ до АДФ у фізіологічних умовах вивільняється 50 кДж/моль енергії¹, визначили, що за добу утилізується приблизно 120 моль (або 60 кг) АТФ. Ця кількість АТФ характеризує не його загальну кількість в організмі, яка становить лише приблизно 50 г, а швидкість обороту перетворення АТФ ↔ АДФ. Кожна молекула АТФ розпадається і знову ресинтезується 1,2–2,5 тисячі разів за добу, тому середня тривалість її життя менша за 1 хв.

Синтез АТФ із АДФ та Φ_n здійснюється двома способами – окисним і субстратним фосфорилюванням. У більшості клітин переважає окисне фосфорилювання. Підтримання постійної концентрації АТФ у м'язових і нервових клітинах здійснюється також завдяки креатинфосфату.

Концентрацію аденінових нуклеотидів, неорганічного фосфату і креатинфосфату в різних тканинах наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Концентрація аденінових нуклеотидів, неорганічного фосфату і креатинфосфату (мМ) в деяких клітинах

Клітини	АТФ	АДФ	АМФ	Φ_n	Креатинфосфат
Міоцити щура	8,1	0,93	0,04	8,1	28
<i>Escherichia coli</i>	7,9	1,0	0,82	7,9	0
Гепатоцити щура	3,4	1,3	0,29	4,8	0
Нейрони щура	2,6	0,73	0,06	2,7	4,7
Еритроцити людини	2,3	0,25	0,02	1,7	0

Для більшості типів клітин наведено концентрацію сполук у всьому внутрішньоклітинному просторі, хоча концентрація в цитозолі та мітохондріях аденінових нуклеотидів є різною. Для еритроцитів наведено концентрацію сполук у цитозолі (еритроцити ссавців не мають ядра та мітохондрій). Як видно, найвища концентрація АТФ є у міоцитах, бактерії *Escherichia coli* і гепатоцитах. У міоцитах також є висока концентрація креатинфосфату.

¹ Ця величина зміни дійсної вільної енергії гідролізу АТФ (ΔG) відрізняється від зміни стандартної вільної енергії ($\Delta G^0 = -30,5$ кДж/моль), оскільки ΔG^0 розрахована для стандартних умов (у т.ч. стандартних концентрацій субстратів і продуктів реакції), які відрізняються від умов у живій клітині

4.2. ЗМІНА СТАНДАРТНОЇ ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ У РЕАКЦІЇ ГІДРОЛІЗУ АТФ

Низка чинників робить свій внесок у процес вивільнення великої кількості енергії за гідролізу макроергічних сполук.

Електростатичне відштовхування, фактор конкурентного резонансу та виділення протонів – основні чинники, які забезпечують вивільнення великої кількості енергії за гідролізу АТФ.

1. **Електростатичне відштовхування.** За рН 7,0 молекула АТФ дисоціює на АТФ^{4-} і чотири протони (рис. 4.2). Відштовхування внутрішньомолекулярних однойменних (від'ємних) зарядів призводить до виникнення електростатичного напруження в молекулі АТФ, особливо в ділянці фосфоангідридного зв'язку (P-O-P). Коли зв'язок розривається, електростатичне напруження зникає завдяки просторовому розведенню від'ємно заряджених продуктів гідролізу АДФ^{3-} і HPO_4^{2-} .

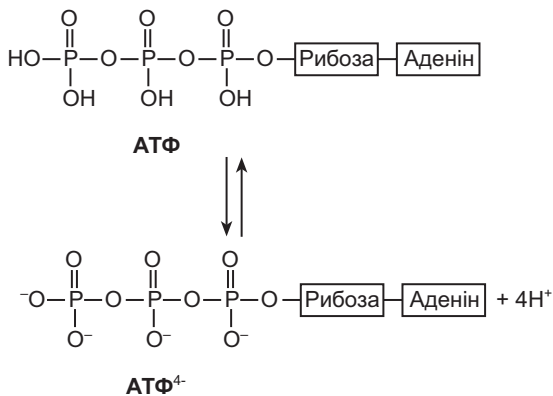
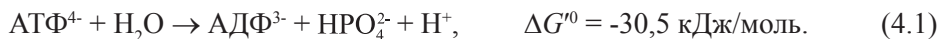


Рис. 4.2. Дисоціація молекули АТФ

2. **Фактор конкурентного резонансу.** Два продукти гідролізу – АДФ^{3-} і HPO_4^{2-} є резонансними гібридами, тобто такими структурними формами, що мають підвищену стійкість, бо частина їхніх електронів перебуває в конфігураціях із нижчими енергетичними рівнями, ніж в АТФ^{4-} .
3. **Виділення протонів.** Сумарне рівняння гідролізу АТФ має такий вигляд:



Зв'язування протона з компонентами буферного середовища (за рН 7,0) зсуває цю реакцію вправо, що робить додатковий внесок у зміну вільної енергії.

Оскільки концентрація продуктів гідролізу АТФ у клітині є значно нижчою, ніж рівноважні концентрації, згідно з законом діючих мас, рівновага

гідролізу АТФ у клітині значно зміщується у напрямку завершення реакції. Етапи гідролізу АТФ і хімічна основа зміни вільної енергії за цих умов наведені на рис. 4.3.

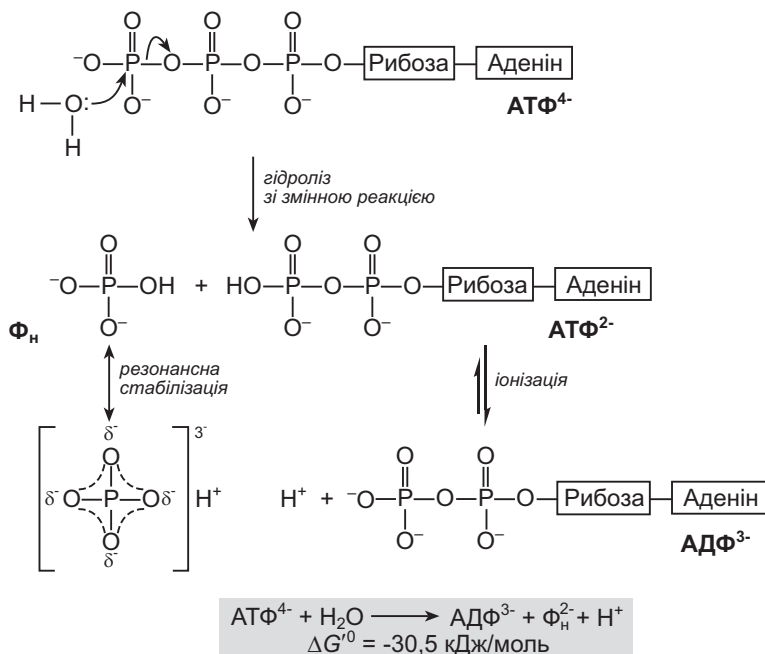


Рис. 4.3. Гідроліз АТФ

Дійсна вільна енергія гідролізу АТФ у живій клітині – величина змінна, оскільки концентрації АТФ, АДФ і P_i відрізняються між собою і є значно нижчими (табл. 4.1), ніж стандартна одномолярна концентрація. Більше того, молекули АТФ і АДФ утворюють у цитозолі комплекси з катіонами Mg^{2+} і власне Mg-ATP^{2-} є справжнім субстратом у більшості ферментативних реакцій, які здійснюються за участі АТФ як донора фосфатної групи. Тому насправді варто розраховувати ΔG° гідролізу Mg-ATP^{2-} . Величину ΔG гідролізу АТФ в інтактних клітинах називають потенціалом фосфорилування і позначають ΔG_p ; вона є набагато від’ємнішою порівняно з ΔG° і лежить у межах від -50 до -65 кДж/моль.

У табл. 4.2 наведено величини змін стандартної вільної енергії гідролізу деяких інших фосфорильованих сполук. За гідролізу деяких фосфорильованих сполук (фосфоенолпірувату, 1,3-дифосфогліцерату і креатинфосфату) ΔG° є навіть більшою, ніж за гідролізу АТФ. Однак ці сполуки передають свої фосфатні групи саме на молекулу АДФ за ресинтезу АТФ.

Таблиця 4.2

Стандартна вільна енергія гідролізу фосфорилюваних сполук

[Frey P.A., Arabshahi A., 1995]

Реакції	$\Delta G'^0$ кДж/моль
Фосфоенолпіруват \rightarrow піруват + Φ_H	-61,9
1,3-дифосфогліцерат \rightarrow 3-фосфогліцерат + Φ_H	-49,3
Креатинфосфат \rightarrow креатин + Φ_H	-43,0
АДФ \rightarrow АМФ + Φ_H	-32,8
АТФ \rightarrow АДФ + Φ_H	-30,5
АТФ \rightarrow АМФ + $\Phi\Phi_H$	-45,6
АМФ \rightarrow аденозин + Φ_H	-14,2
$\Phi\Phi_H \rightarrow 2\Phi_H$	-19
Глюкозо-1-фосфат \rightarrow глюкоза + Φ_H^*	-20,9
Глюкозо-6-фосфат \rightarrow глюкоза + Φ_H^{**}	-13,8
Гліцерол-1-фосфат \rightarrow гліцерол + Φ_H^{***}	-9,2

Примітки: * – реакція відбувається у печінці (але не у м'язах) опосередковано через перетворення глюкозо-1-фосфату на глюкозо-6-фосфат за участі фосфоглюкомутази;

** – реакція відбувається за участю глюкозо-6-фосфатази лише у тканині печінки й нирок;

*** – реакція опосередковується гліцерол-1-фосфатазою

4.3. ПОСТАЧАННЯ ЕНЕРГІЇ ВІД АТФ СПОСОБОМ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГРУПИ

Участь АТФ у реакціях зображують, як правило, схематично, за допомогою стрілки, яка вказує, що АТФ перетворюється на АДФ і Φ_H або на АМФ і $\Phi\Phi_H$ (пірофосфат). У такому разі можна подумати, що активація АТФ-залежної реакції відбувається внаслідок гідролізу АТФ, у процесі якого молекула АТФ зазнає простого розщеплення із заміщенням Φ_H або $\Phi\Phi_H$ у її складі на протон. Насправді гідроліз АТФ у більшості випадків відбувається у два етапи.

Зазвичай спряження процесів вивільнення енергії АТФ та її використання для ендергонічного перетворення субстратів відбувається внаслідок трансферазного перенесення фосфатної, пірофосфатної або аденільної групи від АТФ на субстрат або молекулу ферменту.

Прикладом двоетапності гідролізу АТФ може слугувати реакція утворення аспарагіну з аспартату, яка каталізується АТФ-залежною аспарагінсинтазою (рис. 4.4). Спочатку, на першому етапі частина молекули АТФ, а саме АМФ, ковалентно зв'язується з молекулою аспартату з утворенням проміжного продукту β -аспартил-АМФ, що приводить до підвищення вільної енергії гідролізу. На другому етапі перенесена фосфатвмісна група молекули аспартил-АМФ заміщується на аміногрупу NH_2 , яка надходить після гідролізу глутаміну до

глутамату. Новоутворена молекула аспарагіну має нижчу вільну енергію гідролізу. Отже, енергія АТФ насправді витрачається на утворення ковалентного зв'язку між аспартилом і аміногрупою.

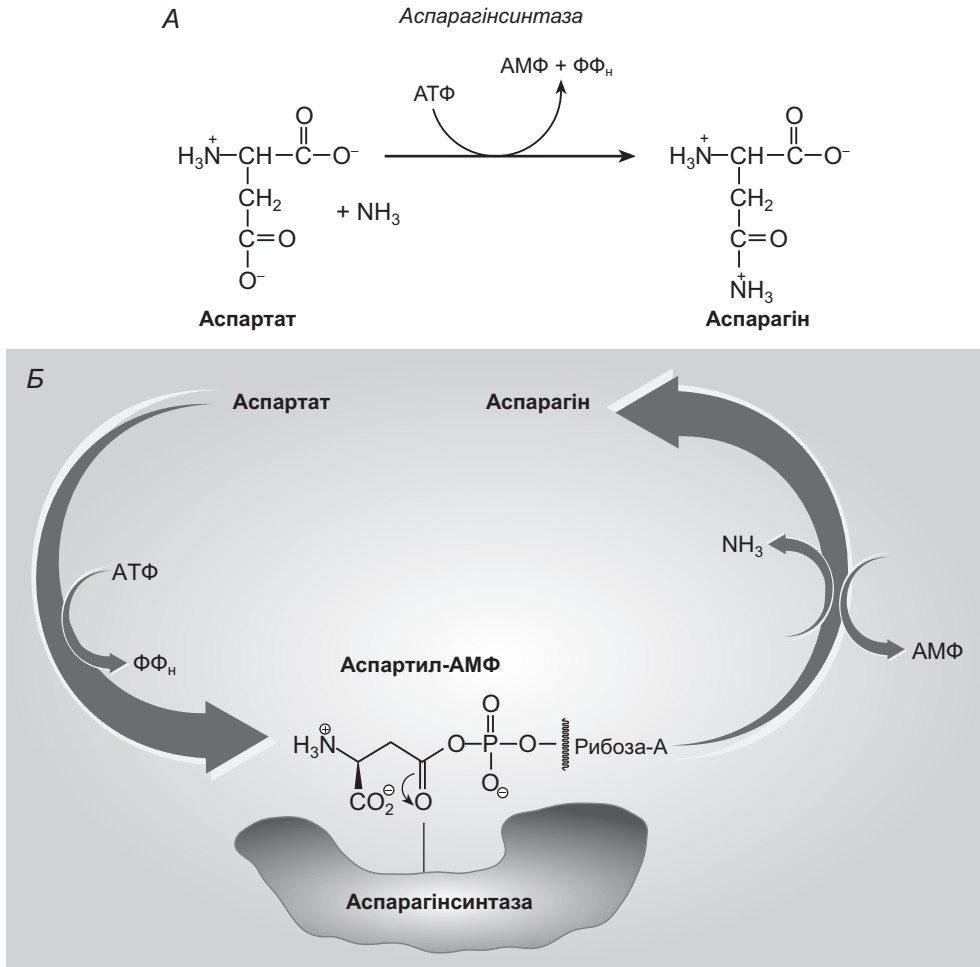


Рис. 4.4. Два етапи гідролізу АТФ у реакції, що каталізується АТФ-залежною аспарагісинтазою: А – одноетапна схема реакції; Б – дійсна двохетапна реакція. Інші пояснення в тексті

Проте деякі процеси у клітині справді супроводжуються використанням енергії гідролізу АТФ безпосередньо на виконання зовнішньої роботи. Наприклад, процес гідролізу молекули АТФ, нековалентно зв'язаної з нуклеотидзв'язувальним сайтом головки міозину, до АДФ і P_i забезпечує енергією перехід головки з одного конформаційного стану в інший, що лежить в основі скорочення м'язів. Ні АТФ, ні продукти гідролізу в цьому разі не утворюють ковалентного зв'язку з молекулою міозину. Таким самим чином енергія АТФ використовується під час переміщення ферментів уздовж нитки ДНК чи рибосом уздовж мРНК.

Трохи інший механізм передачі енергії характерний для транспортних АТФ-аз Р-класу, які забезпечують транспорт іонів крізь біологічні мембрани проти їхнього електрохімічного градієнта. Після нековалентного зв'язування АТФ із нуклеотидзв'язувальним сайтом молекули ферменту відбувається фосфорилування амінокислотного залишку аспартату відповідного сайту (тобто утворення ковалентного зв'язку). Енергія гідролізу утвореного аспартилфосфату використовується для конформаційних змін і транспортування іонів проти електрохімічного градієнта.

Термін “високоенергетичний фосфатний зв'язок” для позначення розщеплюваного у гідролітичних реакціях зв'язку Р~О наводить на думку, що енергія міститься у самому зв'язку. Насправді розщеплення будь-якого хімічного зв'язку стає можливим лише за умови надходження енергії. Такої значної кількості енергії, що вивільняється за гідролітичного розщеплення деяких фосфатних сполук, насправді немає у розщеплюваному зв'язку. Реакція гідролізу супроводжується значним зниженням вільної енергії тільки тому, що продукти реакції містять менше вільної енергії, ніж вихідні сполуки. Тому в тих випадках, коли мова йтиме про АТФ або інші фосфорильовані сполуки, для яких характерне високе від'ємне значення стандартної вільної енергії гідролізу, доречніше використовувати термін “високоенергетична фосфатна сполука”.

Фосфорильовані сполуки, виявлені у складі живих організмів, можна досить умовно поділити на дві групи, залежно від величини стандартної вільної енергії їхнього гідролізу (рис. 4.5). Ті сполуки, величина ΔG^0 гідролізу яких перевищує -25 кДж/моль, називають “високоенергетичними”. До “низькоенергетичних” належать сполуки з нижчим значенням ΔG^0 . Згідно з цим критерієм, така сполука як АТФ, величина ΔG^0 гідролізу якої становить $-30,5$ кДж/моль, належить до високоенергетичних сполук, а глюкозо-6-фосфат, величина ΔG^0 гідролізу якого становить $-13,8$ кДж/моль, – до низькоенергетичних. За потенціалом перенесення фосфатної групи молекула АТФ займає проміжне положення на шкалі фосфорильованих сполук, а значить, може переносити енергію від високоенергетичних фосфорильованих сполук, утворених у ході катаболічних реакцій, до таких сполук як глюкоза, перетворюючи їх на більш реакційноздатні.

АТФ виконує функцію універсального переносника енергії в усіх живих клітинах. Це енергетична валюта живої клітини.

Визначальна роль АТФ у метаболізмі зумовлена ще однією важливою хімічною особливістю цієї молекули. Хоча у водних розчинах молекула АТФ *термодинамічно* нестабільна і тому легко віддає фосфатну групу, з *кінетичної* точки зору АТФ є доволі стабільною молекулою. Це пов'язано з тим, що для некаталітичного розщеплення фосфоангідридних зв'язків у її складі необхідно прикласти дуже значну енергію активації ($200\text{--}400$ кДж/моль). Отже, спонтанного перенесення фосфатної групи від АТФ на сотні потенційних молекул-акцепторів

усередині клітини не відбувається. Таке перенесення можливе лише за наявності специфічних ферментів, які знижують енергію активації реакції. Тому клітина може контролювати перерозподіл енергії, яка міститься в АТФ, регулюючи активність різноманітних ферментів, що діють на цю молекулу.

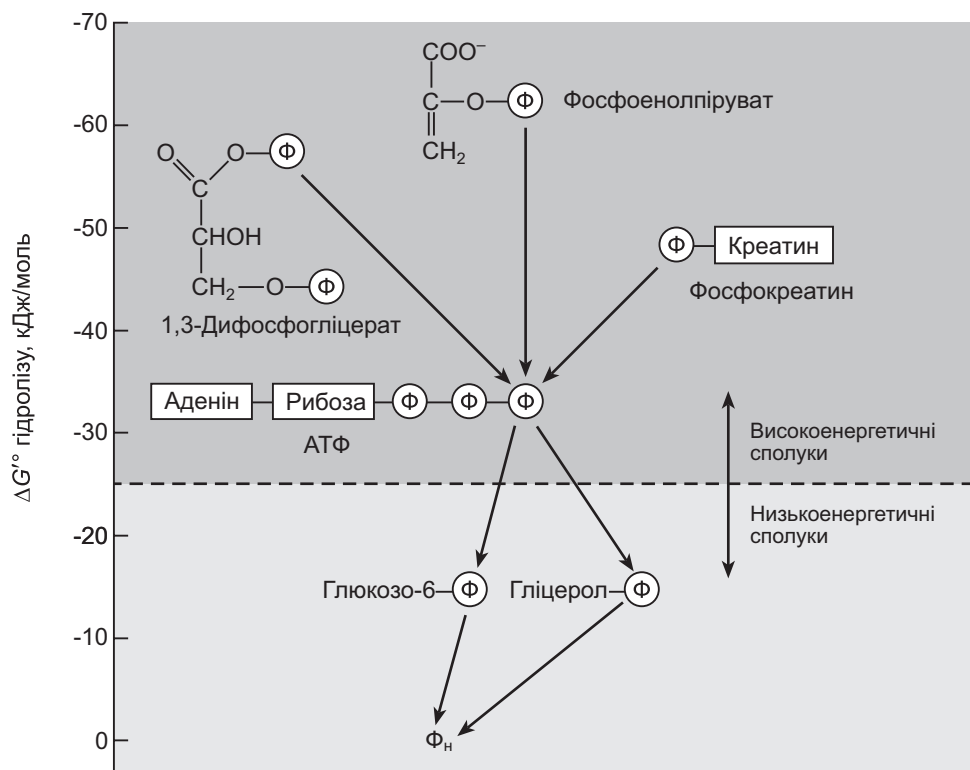


Рис. 4.5. Розподіл біологічних фосфатних сполук за величиною стандартної вільної енергії гідролізу: показано перенесення фосфатних груп (Ф) від високоенергетичних фосфорильованих донорів через АТФ на акцепторні молекули (глюкоза та гліцерол), які перетворюються на низькоенергетичні фосфорильовані похідні. Таке перенесення фосфатних груп усередині клітини каталізується ферментами кінзами і завжди супроводжується загальною втратою вільної енергії. За гідролізу низькомолекулярних фосфорильованих сполук вивільнюється неорганічний фосфат P_i , для якого властивий ще нижчий потенціал перенесення фосфатних груп

Біолоюмінесценція: яскрава роль АТФ

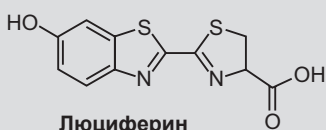
Біолоюмінесценція досить поширена у природі та виконує такі біологічні функції, як приваблення здобичі або партнерів, комунікація, попередження або погроза, відлякування або відволікання тощо. Світіння багатьох організмів, зокрема, морських безхребетних і риб, зумовлюється наявністю фотобактерій. На Чорному морі влітку деколи можна спостерігати світіння води вночі, яке зумовлене біолоюмінесценцією одноклітинного організму – ночесвітки (*Noctiluca miliaris*). Світіння трухлявої

деревини – це прояв біолоюмінесценції грибниці опеньків чи інших грибів. Проте найбільш відомим прикладом біолоюмінесценції є світіння комах-світляків.



Родина комах Світлякові (*Lampyridae*) об'єднує приблизно 2 000 видів. Органи, що випромінюють світло, зазвичай розташовані в задній частині черевця. Кожен такий орган утворений групою клітин-фотоцитів, обплетених трахеями та нервами. Енергія хімічного окислення в цьому органі вивільняється у вигляді світла. Хвильовий діапазон доволі широкий і залежить від виду комах. Світля-

ки можуть випромінювати жовте, зелене, блакитне та червоне світло. Реакції біолоюмінесценції відбуваються за участі кисню й АТФ. Вільям Мак Елрой та ін. з університету Джона Гопкінса в Балтіморі (США) ви-



ділив зі світляків два основних біохімічних компоненти біолоюмінесценції: карбонову кислоту люциферин і фермент люциферазу. Для генерації світлових спалахів необхідно, щоб люциферин спочатку був акти-

вований у реакції з АТФ. На цій стадії пірофосфат відщеплюється від АТФ і утворюється люцифериладенілат (люциферил-АМФ). Потім за наявності кисню та люциферази люциферин декарбоксилується з вивільненням АМФ і утворенням оксилюциферину. Саме ця реакція, яка проходить через кілька проміжних продуктів, супроводжується світловими спалахами. Спектр люмінесцентного світла світляків різних видів розрізняється і залежить від структури люциферази. Завершується цикл низкою реакцій, у яких із оксилюциферину знову утворюється люциферин.

Очищені люциферин і люциферазу світляків використовують у лабораторних умовах для визначення дуже малих кількостей АТФ за інтенсивністю люмінесценції. У такий спосіб вдається виміряти пікомолярні (10^{-12} М) концентрації АТФ.

4.4. ЕНЕРГЕТИЧНА ТА РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ АДЕНІЛАТКІНАЗИ Й АМФ-ЗАЛЕЖНОЇ КІНАЗИ

У м'язах (скелетних і серцевому) є ще один механізм, який забезпечує більш повне використання енергії АТФ – за допомогою **аденілаткіназної реакції**:



Каталізує цю реакцію фермент мітохондрій аденілаткіназа, яку також називають міокіназою.

Константа рівноваги аденілаткіназної реакції становить приблизно 1, а ΔG^0 реакції близька до нуля. Отже, ця реакція є майже рівноважною і її напрям залежить від функціонального стану клітини.

Аденілаткіназна реакція може підвищити рівень АТФ у саркоплазмі. З іншого боку, швидкість окисного фосфорилування визначається рівнем АДФ. Отже, мітохондрії здатні підтримувати високий рівень АТФ у результаті інтенсифікації окисного фосфорилування й аденілаткіназної реакції. Коли потреба в АТФ зменшується, аденілаткіназа каталізує зворотний процес – утворення АДФ з АТФ і АМФ. Але основне значення цього ферменту є регуляторне і полягає в підвищенні концентрації АМФ у цитозолі.

У м'язах різних видів хребетних і безхребетних концентрація АТФ є зазвичай у 7–10 разів вищою, ніж АДФ, і більш ніж у 100 разів вищою, ніж АМФ (див. табл. 4.1). Тому концентрація АМФ у цитоплазмі є точнішим показником енергетичного обміну, ніж АТФ.

У процесі скорочення м'яза, коли [АТФ] зменшується, а [АДФ] зростає на 10 %, завдяки аденілаткіназній реакції [АМФ] може зрости на 5 %. Оскільки вихідний рівень АМФ є на два порядки нижчий, то навіть таке зростання є значно суттєвішим, ніж зменшення [АТФ]. Тому багато регуляторних процесів залежить, насамперед, від змін рівня АМФ у саркоплазмі. Відомо, що АМФ є позитивним ефектором фосфофруктокінази-1, а відтак за підвищення його концентрації швидкість гліколізу зростає.

Ще одним важливим посередником регуляторного впливу АМФ є 5'-АМФ-залежна протеїнкіназа (АМФК), яка у відповідь на збільшення рівня АМФ фосфорилує ключові метаболічні ферменти, регулюючи їхню активність. Тобто АМФК – це клітинна кіназа, яка контролює енергетичний баланс клітини. Вона виявлена в усіх еукаріот і активується за суттєвих енерговитрат. Після активації АМФК клітина переходить в енергозберігаючий стан.

АМФК є гетеродимерним комплексом, що утворений із трьох субодиниць: α -субодиниці, яка є власне кіназою, і двох регуляторних субодиниць – β і γ . Описані ядерна та цитоплазматична форми АМФК. Перша з них здатна напряму регулювати експресію генів, тоді як друга регулює функції цитозольних і мембранних білків. Коли рівень АТФ зменшується, а АМФ, відповідно, зростає, АМФ приєднується до регуляторної γ -субодиниці АМФК, що активує каталітичну α -субодиницю.

В активованому стані АМФК стимулює катаболічні процеси. Наприклад, у серці та скелетних м'язах вона активує окиснення жирних кислот, поглинання глюкози, гліколіз і окисно-відновні процеси у мітохондріях (рис. 4.6). Активация АМФК у гіпоталамусі у відповідь на низький рівень глюкози чи лептину спричиняє активацію споживання їжі організмом.

З іншого боку, АМФК інгібує синтетичні процеси, що потребують АТФ. Наприклад, у печінці знижується синтез глюкози, холестеролу та жирних кислот, у жировій тканині – синтез жирних кислот, а у підшлунковій залозі – секреція інсуліну (рис. 4.6).

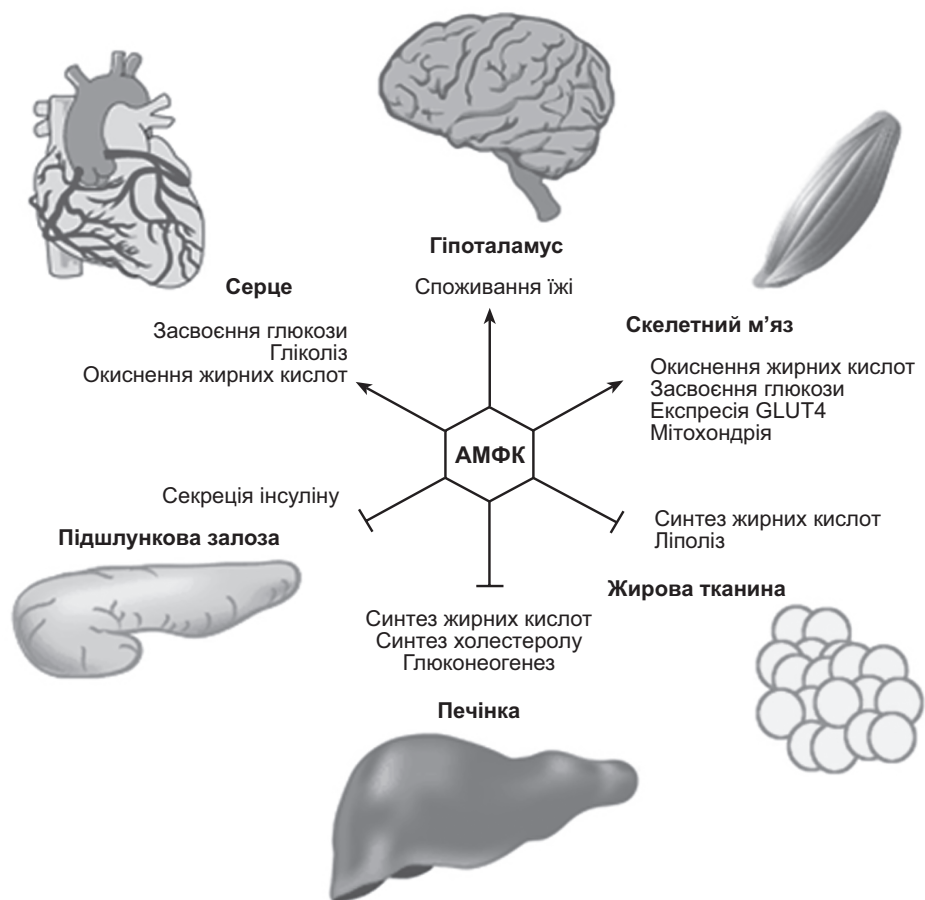


Рис. 4.6. Роль АМФ-активованої протеїнкінази (АМФК) у регуляції енергетичного балансу на рівні організму: стрілки вказують на активуючі, а лінії з планкою – на інгібуючі ефекти [Hardie, 2004]

У ракових клітинах чинники, які знижують рівень внутрішньоклітинного АТФ і спричиняють збільшення співвідношення АМФ/АТФ, активують АМФК за участі пухлинного супресора LKB1 (liver kinase B1; рис. 4.7). Інші чинники, які вивільняють із внутрішньоклітинних депо іони Ca^{2+} , можуть активувати САМКК β (Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase kinase β), а та, у свою чергу, – АМФК.

Активация АМФК у ракових клітинах призводить до зупинки клітинного циклу через ген-супресор TSC2 (tuberous sclerosis protein 2), сприяє відновленню рівня АТФ і блокує глюконеогенез опосередковано через IRS-1 (insulin receptor substrate 1), який передає сигнал від рецептора інсуліноподібного фактора росту (IGF-1) на регуляторний шлях PI_3K / АКТ [Shawa, 2006]. Отже, АМФК функціонує як своєрідний енергетичний сенсор, що контролює метаболічні процеси, пристосовуючи їх до потреб організму.

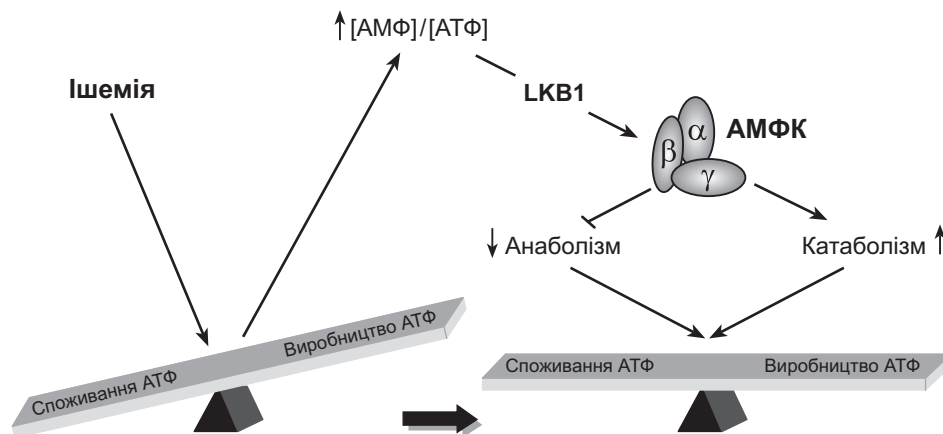


Рис. 4.7. АМФК як енергетичний сенсор. LKB1 – протеїнкіназа родини САМКL, раковий супресор, що допомагає контролювати клітинний цикл, апоптоз і енергетичний гомеостаз

4.5. ІНШІ МАКРОЕРГІЧНІ СПОЛУКИ

Гідроліз деяких фосфорильованих сполук і тіоефірів супроводжується вивільненням більшої кількості енергії, ніж за гідролізу АТФ. Це стосується, зокрема, фосфоенолпірувату, 1,3-дифосфогліцерату, креатинфосфату й ацетил-КоА.

У клітинах є метаболіти, які мають вище від'ємне значення величини вільної енергії гідролізу, ніж АТФ.

У складі фосфоенолпірувату (рис. 4.8, А) є фосфоефірний зв'язок, який може зазнавати гідролітичного розщеплення з утворенням енольної форми пірувату. Цей безпосередній продукт гідролізу відразу зазнає таутомеризації і перетворюється на більш стійку кетоформу пірувату. Оскільки вихідна сполука (фосфоенолпіруват) може існувати лише в одній формі (енолу), а утворений продукт (піруват) – у двох формах, продукт реакції є стійкішим, ніж субстрат. Ця особливість і зумовлює високе значення стандартної вільної енергії гідролізу фосфоенолпірувату – $\Delta G^0 = -61,9$ кДж/моль.

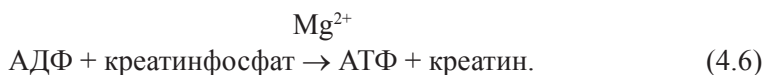
Як впливає з принципу адитивності змін вільної енергії у послідовних реакціях (див. підрозділ 2.3), синтез фосфорильованої сполуки має бути спряжений із розщепленням іншої фосфорильованої сполуки, стандартна вільна енергія гідролізу якої є більшою. Оскільки за відщеплення Φ_n від фосфоенолпірувату вивільняється більше енергії, ніж потрібно для синтезу АТФ, термодинамічно вірогідним є пряме перенесення фосфатної групи від фосфоенолпірувату на АДФ:





Інша трикарбонова сполука – **1,3-дифосфогліцерат** (рис. 4.8, *Б*) містить ангідридний зв'язок між карбоксильною групою та залишком фосфорної кислоти. Для гідролізу цього ацилфосфату також є характерним високе від'ємне значення зміни стандартної вільної енергії ($\Delta G'^0 = -49,3 \text{ кДж/моль}$), що пояснюється особливостями субстрату і продуктів реакції. У разі приєднання H_2O до ангідридного зв'язку 1,3-дифосфогліцерату один із утворюваних продуктів, а саме 3-фосфогліцеринова кислота, відразу втрачає протон і набуває форми карбоксилатного іона – 3-фосфогліцерату, який може бути у вигляді двох однаково вірогідних резонансних форм (рис. 4.8, *Б*). Швидке перетворення структури прямого продукту реакції (3-фосфогліцеринової кислоти) на структуру резонансно-стабілізованого іона сприяє перебігу прямої реакції до кінця.

Креатинфосфат є ще однією сполукою, гідроліз якої супроводжується вивільненням значної кількості енергії. Фермент креатинкіназа каталізує реакцію перенесення Φ_{H} від креатинфосфату на АДФ:



Унаслідок гідролізу зв'язку Р-Н у складі креатинфосфату (рис. 4.8, *В*) утворюються вільний креатин і Φ_{H} . Вивільнення Φ_{H} зі складу молекули та резонансна стабілізація креатину сприяють перебігу реакції зліва направо до кінця. Величина зміни стандартної вільної енергії у реакції гідролізу креатинфосфату також є високою і становить -43 кДж/моль .

Креатинфосфат виконує роль доступного депо фосфатних груп, необхідних для забезпечення швидкого синтезу АТФ з АДФ. Концентрація креатинфосфату в скелетних м'язах становить приблизно 30 мМ (тобтодесь у шістьдесят разів перевищує концентрацію АТФ), а в гладеньких м'язах, мозку та нирках коливається в межах 5–10 мМ. Багато креатинфосфату є також у клітинах сітківки ока і сперматозоїдах.

Коли у період гострої потреби в енергії запаси АТФ у клітині вичерпуються, саме креатинфосфат використовується для відновлення рівня АТФ, причому швидкість утворення АТФ у цьому разі значно перевищує швидкість синтезу АТФ у катаболічних реакціях. Коли потреба в енергії знижується, клітина використовує синтезований у катаболічних реакціях АТФ для поповнення запасів креатинфосфату способом обернення креатинкіназної реакції.

У м'язах багатьох безхребетних організмів роль резервної форми фосфатних груп виконують інші, подібні до креатинфосфату сполуки, які мають загальну назву фосфагени.

У клінічній практиці креатинфосфат використовують у неврології для лікування порушень мозкового кровообігу. Показами до використання кретин-

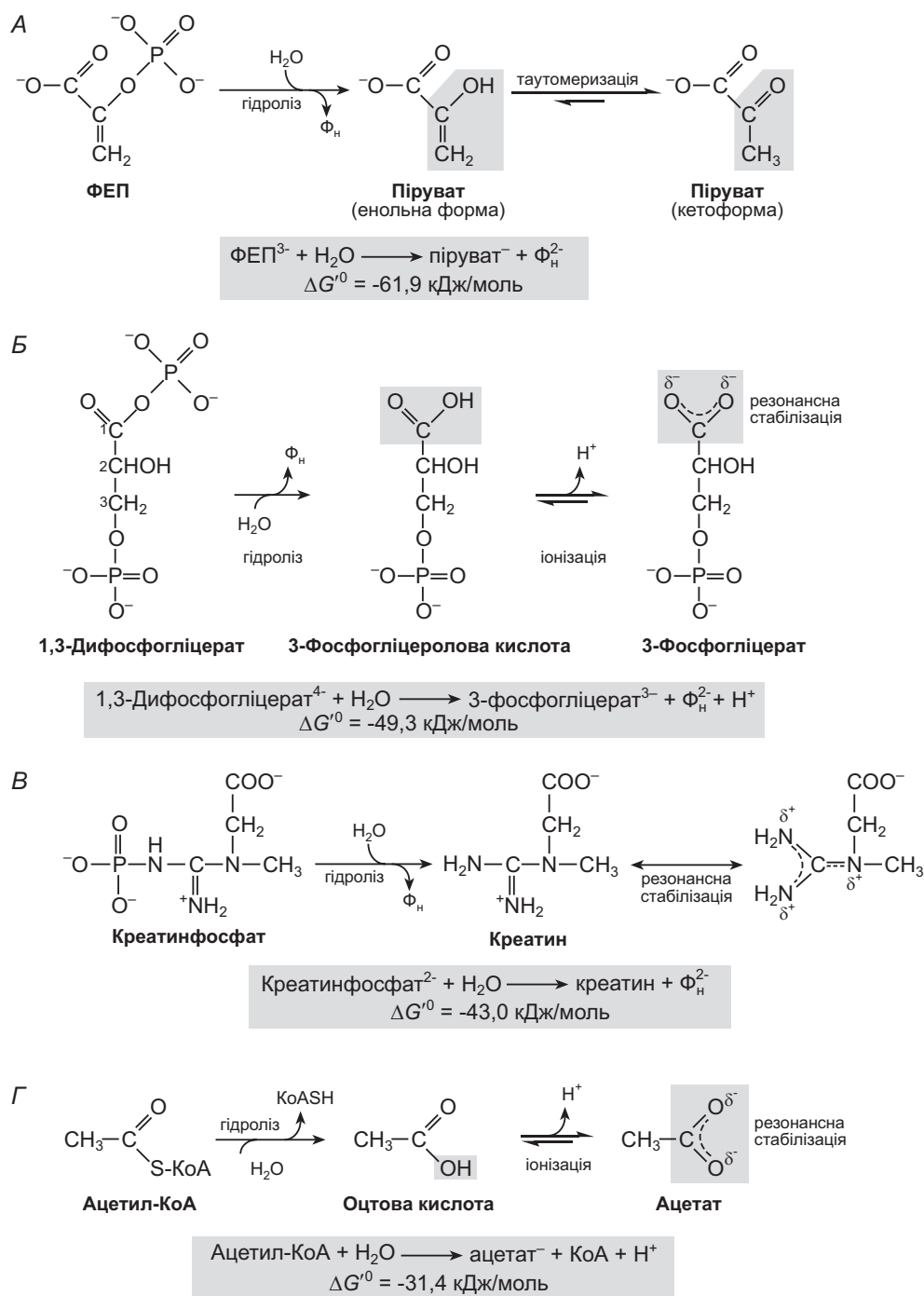


Рис. 4.8. Гідроліз фосфоенолпірувату (А), 1,3-дифосфогліцерату (Б), креатинфосфату (В) й ацетил-КоА (Г)

фосфату є також гострий інфаркт міокарда, інтраопераційна ішемія міокарда, хронічна серцева недостатність, гостре порушення мозкового кровообігу. За одноразового внутрішньовенного введення креатинфосфату максимальну концентрацію препарату в крові реєструють уже через 1–3 хв. У крові креатинфосфат інактивується значно повільніше, ніж АТФ.

Медичний препарат креатинфосфату покращує метаболізм міокарда та скелетних м'язів, забезпечує внутрішньоклітинне транспортування енергії, сповільнює зниження скорочувальної здатності серцевого м'яза за ішемії. У спортивній медицині креатинфосфат використовують для профілактики розвитку синдрому фізичного перенапруження та покращення адаптації до екстремальних фізичних навантажень. Він вибірково нагромаджується у тканинах із несприятливими наслідками фізичного перенапруження.

Тіоефіри, у складі яких кисень ефірного зв'язку заміщений на атом сульфуру, також характеризуються високим від'ємним значенням стандартної вільної енергії гідролізу. **Ацетил-КоА** є одним із багатьох тіоефірів, які відіграють важливу роль у метаболічних процесах. Ацильна група у складі цих сполук активована і бере участь у реакціях трансацилювання, конденсації та окиснення-відновлення. Ацетил-КоА також належить до високоенергетичних сполук.

Тіоефіри менше піддаються резонансній стабілізації, ніж продукти їхнього гідролізу (рис. 4.8, Г). Гідроліз тіоефіру також супроводжується утворенням карбоксильної групи, яка може іонізуватись та існувати у вигляді кількох стійких резонансних форм. Разом ці фактори і зумовлюють високе від'ємне значення $\Delta G'^0$ (–31 кДж/моль) гідролізу ацетил-КоА.

Отже, у реакціях гідролізу, які супроводжуються значним зниженням стандартної вільної енергії, утворюються продукти, що є стійкішими, ніж вихідні субстрати. Це пояснюється такими причинами:

- 1) електростатичне напруження всередині субстрату послаблюється внаслідок просторового роз'єднання однаково заряджених груп, як це має місце у разі гідролізу АТФ;
- 2) продукти реакції стабілізуються внаслідок іонізації, як у реакціях гідролізу АТФ, ацилфосфатів і тіоефірів;
- 3) продукти реакції також стабілізуються завдяки ізомеризації (таутомеризації), як у разі гідролізу фосфоенолпірувату;
- 4) продукти реакції можуть мати вигляд резонансних форм, як, наприклад, креатин, що вивільняється зі складу креатинфосфату, або карбоксилатний іон, що вивільняється зі складу ацилфосфатів і тіоефірів, чи фосфат, що вивільняється після розщеплення ангідридних або ефірних зв'язків.

Підсумок 4. АТФ ЯК ДЖЕРЕЛО ЗАПАСАННЯ ЕНЕРГІЇ

- АТФ відіграє особливу роль в обміні енергії, у поєднанні реакцій катаболізму й анаболізму та у виконанні зовнішньої роботи. Це енергетична валюта живої клітини. Екзергонічні реакції гідролізу АТФ спряжені з багатьма ендергонічними реакціями і процесами.
- Зазвичай спряження процесів вивільнення енергії АТФ та її використання для ендергонічного перетворення субстратів відбувається внаслідок трансферазного перенесення фосфатної, пірофосфатної чи аденільної групи від АТФ на субстрат або молекулу ферменту. Однак деякі процеси у клітині супроводжуються використанням енергії гідролізу АТФ безпосередньо на виконання зовнішньої роботи – наприклад, на м'язове скорочення чи транспорт іонів проти електрохімічного градієнта.
- Окрім АТФ, у клітинах наявні й інші метаболіти, які характеризуються високим від'ємним значенням величини вільної енергії гідролізу, такі як фосфоенолпіруват, 1,3-дифосфогліцерат і креатинфосфат. Ці високоенергетичні сполуки, як і АТФ, мають високий потенціал перенесення фосфатних груп. Високе значення величини вільної енергії гідролізу характерне також для тіоестерів, зокрема, для ацетил-КоА.

**ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

- Розрахунок величин ΔG^0 для реакцій за участю АТФ. На підставі даних табл. 4.1 обчисліть ΔG^0 для таких реакцій:**
 А) АТФ + фруктоза \rightarrow АДФ + фруктозо-6-фосфат;
 Б) Креатинфосфат + АДФ \rightarrow креатин + АТФ.
- Добова утилізація АТФ в організмі дорослої людини.**
 А) За умов, коли доросла людина масою 68 кг щодоби отримує з їжею 8 360 кДж енергії, розрахувати кількість АТФ, яка утилізується в організмі людини упродовж 24 год. Варто зауважити, що ефективність перетворення енергії харчових продуктів на енергію АТФ становить 50 %. Який відсоток маси тіла становить ця кількість АТФ?
 Б) В організмі людини щодня синтезується значна кількість АТФ, але маса тіла, його будова та склад упродовж цього періоду суттєво не змінюються. Як пояснити цей факт?
- Швидкість обміну γ - та β -фосфатних груп АТФ.** Якщо до дріжджового екстракту додати незначну кількість АТФ, міченого ізотопом у положенні γ -фосфатної групи – $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, то вже за кілька хвилин половина мітки буде виявлена у складі $\Phi_{\text{н}}$, але концентрація АТФ не зміниться. Поясніть цей факт. Якщо проводити такий експеримент, але з використанням АТФ, міченого ізотопом у положенні β -фосфатної групи $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, то виявити ^{32}P у складі $\Phi_{\text{н}}$ через такий короткий час не вдасться. Чому?

4. Розщеплення АТФ до АМФ і ФФ_н. Синтез активованої форми ацетату (ацетил-КоА) відбувається у такій реакції:



А) ΔG° за гідролізу ацетил-КоА до ацетату і КоА становить -32,2 кДж/моль, а за гідролізу АТФ до АМФ і ФФ_н - 30,5 кДж/моль. Обчислити значення ΔG° для АТФ-залежного синтезу ацетилКоА.

Б) Фермент неорганічна пірофосфатаза функціонує майже в усіх клітинах і каталізує гідроліз ФФ_н до Ф_н. Як цей фермент впливає на синтез ацетил-КоА?

5. Виберіть фосфорильовані сполуки, що мають більшу вільну енергію гідролізу, ніж АТФ:

1) фосфоенолпіруват; 2) 1,3-дифосфогліцерат; 3) мальтоза; 4) ацетил-КоА.

6. Гідроліз якого макроерга характеризується зміною стандартної вільної енергії на -43 кДж/моль?

1) креатинфосфат;
2) АТФ;
3) АДФ;
4) 1,3-дифосфогліцерид.

7. Виберіть аденілаткіназну реакцію:

1) $2\text{АДФ} \leftrightarrow \text{АТФ} + \text{АМФ}$;
2) $\text{АТФ} \rightarrow \text{АДФ} + \text{Ф}_{\text{н}}$;
3) $\text{АДФ} + \text{Ф}_{\text{н}} \rightarrow \text{АТФ}$;
4) $2\text{АМФ} + \text{Ф}_{\text{н}} \rightarrow \text{АТФ}$.

8. У якій формі, крім АТФ, ще може зберігатись енергія?

1) у вигляді протонного потенціалу;
2) у вигляді натрієвого потенціалу;
3) у вигляді калієвого потенціалу;
4) немає інших форм зберігання енергії.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основи біохімії за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
- Daval M., Foufelle F., Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue // J. Physiol. – 2006. – Vol. 574, Pt 1. – P. 55–62.
- Frey P.A., Arabshahi A. Standard free energy change for the hydrolysis of the α , β -phosphoanhydride bridge in ATP // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34. – P. 11307–11310.
- Kornberg A. Inorganic phosphates: a molecule of many functions // Annu. Rev. Biochem. – 1999. – Vol. 69. – P. 89–125.
- Hanson R.W. The role of ATP in metabolism // Biochem. Educ. – 1989. – Vol. 17. – P. 86–92.
- Hardie G.H. AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 114. – P. 465–468.
- Shawa R.J. Glucose metabolism and cancer // Curr. Opin. Cell Biol. – 2006. – Vol. 18. – P. 598–608.
- Westheimer F.H. Why nature chose phosphates? // Science. – 1987. – Vol. 335. – P. 1173–1178.

ОКИСНО-ВІДНОВНІ РЕАКЦІЇ У БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

- Окисно-відновні пари
- Способи передачі електронів у окисно-відновних реакціях
- Стандартний окисно-відновний потенціал
- Роль піридинових і флавінових нуклеотидів у окисно-відновних реакціях

Важливу роль в енергетичних процесах у клітині відіграє не лише перенесення фосфатних груп за участю молекули АТФ, а й перенесення електронів у окисно-відновних реакціях. За перебігу таких реакцій одні сполуки втрачають електрони і внаслідок цього окислюються, а інші – приєднують електрони і відновлюються.

5.1. ОКИСНО-ВІДНОВНІ ПАРИ

У хемогетеротрофів джерелом електронів для окисно-відновних реакцій є відновлені хімічні сполуки, що входять до складу поживних речовин, а у фотоавтотрофів – відновлені хімічні сполуки, синтезовані з використанням світлової енергії. У реакціях окислення у клітинах електрони переміщуються від цих речовин чи їхніх проміжних метаболітів (від донорів електронів) до спеціалізованих переносників електронів. Переносники, у свою чергу, віддають електрони акцепторам, спорідненість яких до електронів є вищою, ніж у переносників, і таке перенесення супроводжується вивільненням енергії.

У клітинах функціонують окисно-відновні ланцюги з елементів, які відрізняються за спорідненістю до електронів. Електрони спонтанно переміщуються уздовж такого ланцюга під дією сили, величина якої пропорційна різниці спорідненості донорів і акцепторів до електронів – так званої **електрорушійної сили**. У разі ферментативного окислення глюкози вивільнені електрони спонтанно переміщуються від одного проміжного переносника електронів до іншого і, зрештою, переносяться на O_2 . Така реакція перенесення електронів є екзергонічною, оскільки O_2 має набагато вищу спорідненість до електронів, ніж проміжні переносники електронів.

Молекулу, атом або іон, які віддають електрони в окисно-відновній реакції, називають донором, відновлювальним агентом, або відновником. Відповідно, молекулу, атом чи іон, які приєднують електрони від відновника, називають акцептором, окиснювальним агентом, або окисником.

Хімічні речовини, які утворюють систему з окисненої та відновленої форми, є спряженою окисно-відновною парою, або редокс-парою.

Наприклад, якщо в розчині містяться катіони феруму в окисненому (Fe^{3+}) і відновленому (Fe^{2+}) станах, то вони формують редокс-пару $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$. Характеристикою спряженої пари є окисно-відновний потенціал. Спряжені окисно-відновні пари відіграють важливу роль, зокрема, у функціонуванні дихального ланцюга мітохондрій.

5.2. СПОСОБИ ПЕРЕДАЧІ ЕЛЕКТРОНІВ У ОКИСНО-ВІДНОВНИХ РЕАКЦІЯХ

У живих клітинах є чотири способи передачі електронів від однієї молекули (донора) на іншу молекулу (акцептор).

Передача електронів від донора до акцептора може відбуватися за безпосереднього перенесення електронів, перенесення електронів у складі атомів гідрогену, у складі гідрид-іона та способом прямої взаємодії донора з киснем.

1. Безпосереднє перенесення електронів. Наприклад, окисно-відновна пара $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ може передавати електрон парі $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ згідно з реакцією:



Іони купруму відновлюються завдяки електронам, виділеним унаслідок окиснення іонів феруму.

2. Перенесення електронів у складі атомів гідрогену. Атом гідрогену складається з протона (H^+) і одного електрона (e^-). У цьому разі відбуваються такі реакції:



де AH_2 – донор гідрогену (або електронів) у відновленій формі, A , B – окислені форми речовин; BH_2 – відновлена форма речовини B . AH_2 і A разом становлять спряжену окисно-відновну пару (A/AH_2), яка може відновлювати іншу сполуку B (або іншу пару – B/BH_2) способом перенесення атомів гідрогену.

3. Перенесення електронів у складі гідрид-іона. Гідрид-іон має на орбіталі два електрони (:H^-). Таке перенесення є, наприклад, у реакціях, які каталізуються НАД-залежними дегідрогеназами.

4. Перенесення електронів способом прямої взаємодії відновника з киснем. У цьому разі кисень ковалентно зв'язується з відновником. Прикладом такої взаємодії є окиснення метильної групи органічної речовини з утворенням спирту:



де R-CH_3 – донор електронів; O_2 – акцептор електронів.

Оскільки в усіх чотирьох випадках відбувається транспорт електронів, для позначення уніфікованого електронного еквівалента, який бере участь у реакції окиснення–відновлення, використовують нейтральний термін **відновлювальний еквівалент**.

5.3. ОКИСНО-ВІДНОВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ

Прикладом найпростішої окисно-відновної системи є процес окислення двовалентного феруму до тривалентного. У цій реакції один електрон передається з донора (Fe^{2+}) на акцептор (Fe^{3+}):



Така система, що одночасно містить окиснену і відновлену форму сполуки, характеризується **окисно-відновним потенціалом**. Величину окисно-відновного потенціалу ($E_{\text{ов}}$) розраховують за формулою Нернста:

$$E_{\text{ов}} = E'^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}, \quad (5.6)$$

де E'^0 – стандартний окисно-відновний потенціал, який експериментально визначають у стандартних умовах, зокрема, за pH 7; R – універсальна газова стала; T – абсолютна температура; F – константа Фарадея; n – число електронів, задіяних у реакції, а $[\text{Ox}]$ і $[\text{Red}]$ – концентрації сполуки в окисленій та відновленій формі відповідно.

Коли концентрації окисленої та відновленої форм сполук дорівнюють 1 М, співвідношення $[\text{Ox}] / [\text{Red}]$ дорівнює одиниці. За таких умов і вимірюють стандартний окисно-відновний потенціал E'^0 експериментально (рис. 5.1) і виражають його у вольтах (В).

Як абсолютний стандарт для вимірювання E'^0 використовують стандартний водневий електрод за pH 0¹, електрорушійну силу якого за всіх значень температури приймають за 0,00 В. На рис. 5.1 стандартний водневий електрод

¹ Коли концентрація протонів у середовищі дорівнює 1 М, то pH (від'ємний десятковий логарифм концентрації протонів) дорівнює нулю

поміщений у ліву посудину. У правій посудині є розчин з окисненою та відновленою формами відповідної сполуки, наприклад, $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$, в який занурено інертний платиновий електрод. Дві посудини сполучені між собою соляним містком (насичений розчин KCl). Платина в цих випадках не бере участі в реакції, а є тільки переносником електронів. Якщо іони у правій посудині є кращим окисником, ніж стандартний водневий електрод, то частина з них відновиться за рахунок електронів від платинового електрода. Тоді заряд платинового електрода у правій посудині стане додатним щодо заряду стандартного водневого електрода. Якщо іони у розчині є кращим відновником, ніж стандартний водневий електрод, то частина іонів окислиться, віддавши електрони платиновому електроду. Заряд платинового електрода у досліджуваному розчині правої посудини за цих умов стане від'ємним щодо стандартного водневого електрода. Фактично потенціал цього електрода і є окисно-відновним потенціалом розчину.

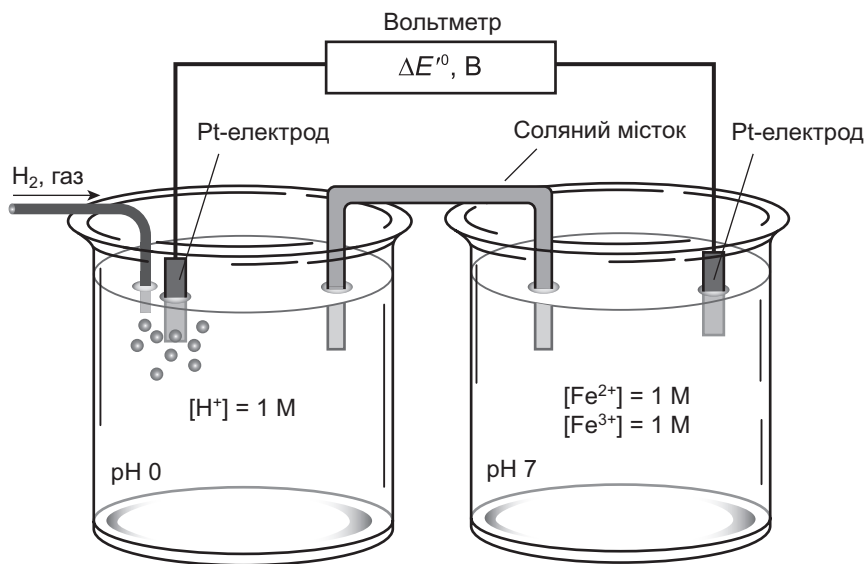


Рис. 5.1. Вимірювання стандартного окисно-відновного потенціалу. У лівій посудині розміщений стандартний водневий електрод – занурений у розчин з одномолярною концентрацією протонів платиновий електрод, який омивається газоподібним H_2 за тиску 101,3 кПа. У правій посудині – досліджувана окисно-відновна пара. Інші пояснення в тексті

У разі однакових (одномолярних) початкових концентрацій окисненої та відновленої форм таким способом і визначають стандартний окисно-відновний потенціал спряжених окисно-відновних пар. Для пари $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ стандартний окисно-відновний потенціал становить +0,771 В, а для пари $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ – +0,170 В.

У табл. 5.1 наведено значення стандартних окисно-відновних потенціалів низки окисно-відновних пар у біологічних реакціях.

Таблиця 5.1

**Стандартні окисно-відновні потенціали деяких важливих біологічних реакцій
за pH 7 та 25 °C**

Реакція	E^0 (В)
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	0,816
$\text{Fe}^{3+} + \bar{e} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	0,771
$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	0,421
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + \bar{e} \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	0,360
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0,295
Цитохром с (Fe^{3+}) + $\bar{e} \rightarrow$ цитохром с (Fe^{2+})	0,254
Убіхінон + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ убіхінол + H_2	0,045
Фумарат ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ сукцинат ²⁻	0,031
$\text{Cu}^{2+} + \bar{e} \rightarrow \text{Cu}^+$	0,170
Оксалоацетат ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ малат ²⁻	-0,166
Піруват + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ лактат	-0,185
Ацетальдегід + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ етанол	-0,197
ФАД + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ ФАДН ₂	-0,219*
Глутатіон + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ 2 глутатіон відновлений	-0,230
$\text{S} + 2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	-0,243
Ліпоева кислота + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ дигідроліпоева кислота	-0,290
НАД + $\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ НАДН	-0,320
НАДФ + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ НАДФН	-0,324
Ацетоацетат + $2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow$ β -гідроксибутират	-0,346
α -Кетоглутарат + $\text{CO}_2 + 2\text{H} + 2\bar{e} \rightarrow$ ізоцитрат	-0,380
$2\text{H}^+ + 2\bar{e} \rightarrow \text{H}_2$	-0,414
Ферредоксин (Fe^{3+}) + $\bar{e} \rightarrow$ ферредоксин (Fe^{2+})	-0,432

Примітка: * це значення E^0 для вільного ФАД

Знаючи величину стандартного окисно-відновного потенціалу і концентрації сполуки в окисненій і відновленій формі, за формулою (5.6) можна розрахувати окисно-відновний потенціал будь-якої реальної системи.

Якщо в одному розчині містяться дві окисно-відновні пари, то окисно-відновна пара з меншим потенціалом (наприклад, $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$), переходячи в окиснену форму, спонтанно віддає електрони окисно-відновній парі з більшим потенціалом ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$), яка при цьому переходить у відновлену форму. Тобто іони феруму відновлюються завдяки електронам, виділеним за окислення іонів купруму¹. Вірогідність такої реакції залежить від відносної спорідненості акцептора електронів у складі кожної з окисно-відновних пар до електронів. Реакція відбувається доти, поки не зрівняються окисно-відновні потенціали кожної з пар.

¹ За умови, що початкові концентрації усіх чотирьох іонів є однаковими. За певних початкових співвідношень можуть відбуватися протилежні окисно-відновні реакції

У біохімічних реакціях окисно-відновний потенціал також залежить і від рН середовища. Тоді формула (5.6) набуває такого вигляду:

$$E_{\text{ов}} = E'^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} + \frac{RT}{F} \ln [H^+]. \quad (5.7)$$

З використанням величини стандартного окисно-відновного потенціалу можна розрахувати зміну вільної енергії хімічної реакції за формулою:

$$\Delta G'^0 = -nF\Delta E'^0. \quad (5.8)$$

За допомогою цього рівняння, використовуючи наведені в табл. 5.1 значення E'^0 та беручи до уваги концентрацію окисників і відновників, які беруть участь у реакції, ми можемо розрахувати зміну вільної енергії для будь-якої окисно-відновної реакції.

Зміна стандартної вільної енергії в окисно-відновній реакції прямо пропорційна окисно-відновному потенціалу спряжених окисно-відновних пар.

5.4. РОЛЬ ПІРИДИНОВИХ І ФЛАВІНОВИХ НУКЛЕОТИДІВ У ОКИСНО-ВІДНОВНИХ РЕАКЦІЯХ

Багато ферментів, які каталізують реакції окиснення у клітинах, скеровують потік електронів від сотень субстратів на кілька типів універсальних переносників. У багатьох метаболічних реакціях, де відбувається перенесення електронів, роль водорозчинних коферментів, здатних оборотно окислюватись і відновлюватись, відіграють нуклеотиди НАД, НАДФ, ФМН і ФАД.

Коферментами багатьох дегідрогеназ є піридинові нуклеотиди НАД і НАДФ, які вільно переміщуються від одного ферменту до іншого, та флавінові нуклеотиди ФАД і ФМН, які міцно зв'язані у флавопротеїнах і відіграють роль простетичної групи.

До складу НАД і його структурного аналога НАДФ входять два нуклеотиди, з'єднані фосфоангідридним зв'язком (рис. 5.2). Оскільки кільце нікотинаміду подібне до піридинового кільця, ці динуклеотиди також називають піридиновими нуклеотидами. В окисненому стані НАД^+ має вузьку смугу поглинання в ультрафіолетовій частині спектра з максимумом за довжини хвилі 260 нм. У відновленому стані виникає друга смуга за 340 нм і одночасно зменшується інтенсивність смуги за 260 нм.

Кільце нікотинаміду у складі цих коферментів може зворотно відновлюватися (рис. 5.2). Так, у ході реакції окислення молекула субстрату втрачає два атоми гідрогену, а піридиновий нуклеотид (НАД^+ або НАДФ^+) приєднує

гідрид-іон (H^-) і переходить з окисненої форми у відновлену. Другий відщеплений від субстрату протон вивільняється у водне середовище:



За відновлення НАД^+ або НАДФ^+ конфігурація кільця нікотинамід у змінюється з бензеноїдної (атом нітрогену несе додатний заряд) на хіноїдну (атом нітрогену не заряджений). Знак плюс у скорочених назвах НАД^+ і НАДФ^+ вказує на те, що нікотинамідне кільце перебуває в окисненому стані, а остання літера “Н” у скорочених назвах НАДН та НАДФН – у відновленому стані.

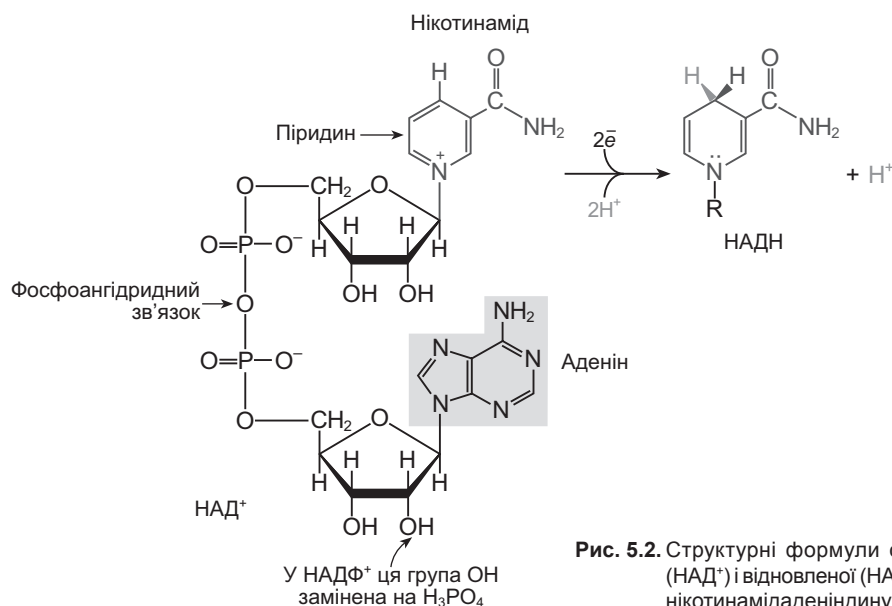


Рис. 5.2. Структурні формули окисненої (НАД^+) і відновленої (НАДН) форм нікотинамідаденіндинуклеотиду

Сумарна концентрація НАД^+ і НАДН у клітинах більшості тканин становить приблизно 10^{-5} M , тоді як сумарна концентрація НАДФ^+ і НАДФН є у 10 разів нижчою.

Співвідношення окисненої до відновленої форми НАД усередині клітини підтримується на високому рівні, завдяки чому створюються сприятливі умови для перенесення гідрид-іона від субстрату на НАД^+ . Навпаки, вміст у клітині відновленого НАДФН є, як правило, вищим, ніж окисненого НАДФ^+ , що сприяє перенесенню гідрид-іона від НАДФН на субстрат. Такі відмінності у внутрішньоклітинному вмісті піридинових коферментів двох типів відображають їхню специфічну роль у метаболізмі.

НАД^+ зазвичай бере участь в окисненні як компонент катаболічної реакції, а НАДФН – у відновленні як компонент анаболічної реакції.

Реакції за участі цих коферментів у еукаріотичній клітині розділені просторово та відбуваються в різних компартментах: окиснення таких субстратів як піруват, жирні кислоти й похідні амінокислот здійснюються переважно в мітохондріях, тоді як реакції відновлення, наприклад, синтез жирних кислот, – у цитозолі.

НАД і НАДФ виконують роль розчинних переносників електронів, взаємодіючи з дегідрогеназами. Дегідрогенази є підкласом ферментів, які називають оксиредуктазами. Оксиредуктази каталізують окисно-відновні реакції, і більшість серед них є дегідрогеназами, тобто ферментами, які забезпечують окислення субстрату, переносячи один чи більш гідрид-іонів на акцептор електронів. Таким акцептором електронів для більш, ніж 200 дегідрогеназ є НАД і НАДФ. Отже, НАД⁺ і НАДН виконують важливу функцію зв'язування циклу Кребса з процесами окисного фосфорилування (рис. 5.3). Відтак, НАД-залежними називають ті субстрати циклу Кребса (піруват, ізоцитрат, α -кетоглутарат, малат та інші), які віддають свої електрони на НАД⁺ (і далі на перший комплекс дихального ланцюга мітохондрії).

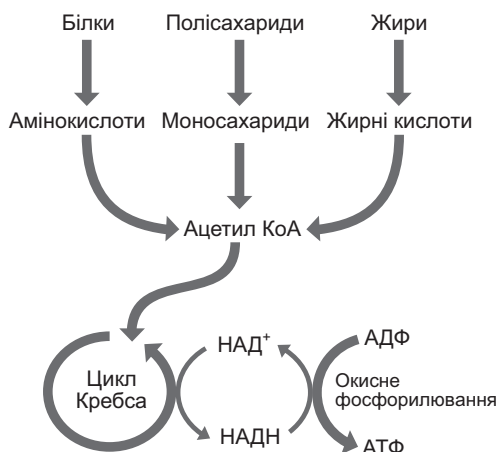
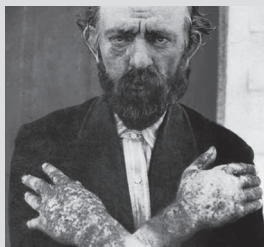


Рис. 5.3. Роль НАД⁺ і НАДН у зв'язуванні циклу Кребса й окисному фосфорилуванні

Джерелом нікотинаміду для побудови нікотинамідвмісних нуклеотидів є ніацин (вітамін В₃), який синтезується з триптофану. Нестача В₃ стає особливо відчутною, коли харчовий раціон людини бідний на триптофан



Пелагра у людини
(з італ. "шорстка шкіра")

(наприклад, коли основним продуктом харчування є кукурудза, у білках якої вміст триптофану низький). Нестача ніацину позначається на функціонуванні всіх НАД- і НАДФ-залежних дегідрогеназ, призводячи до розвитку тяжкого захворювання – пелагри у людей та до подібного захворювання на "чорний язик" у собак. Для цієї хвороби характерні три "д": дерматит, діарея, деменція, і в багатьох випадках вона закінчується смертю. У південних штатах США, де бідні люди харчувалися

переважно кукурудзою, пелагра з 1912 по 1916 рр. забрала життя кожного десятого зі 100 тис. хворих на цю недугу. У 1920–30-х роках було встановлено причину захворювання і знайдено спосіб її лікування ніацином. Проте цей спосіб лікування пелагри неефективний для алкоголіків, у яких всмоктування ніацину в кишечнику послаблене.



“Чорний язик” у собаки

Флавопротеїни – це ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції, використовуючи як кофермент ФМН або ФАД (рис. 5.4). Ці коферменти, які мають назву флавінові нуклеотиди, походять з вітаміну B_2 (рибофлавін). Він бере участь у процесах росту, пластичному обміні; регулює стан центральної нервової системи, процеси в рогівці та кришталіку ока; позитивно впливає на стан шкіри і слизових оболонок, функцію печінки та кровотворення.

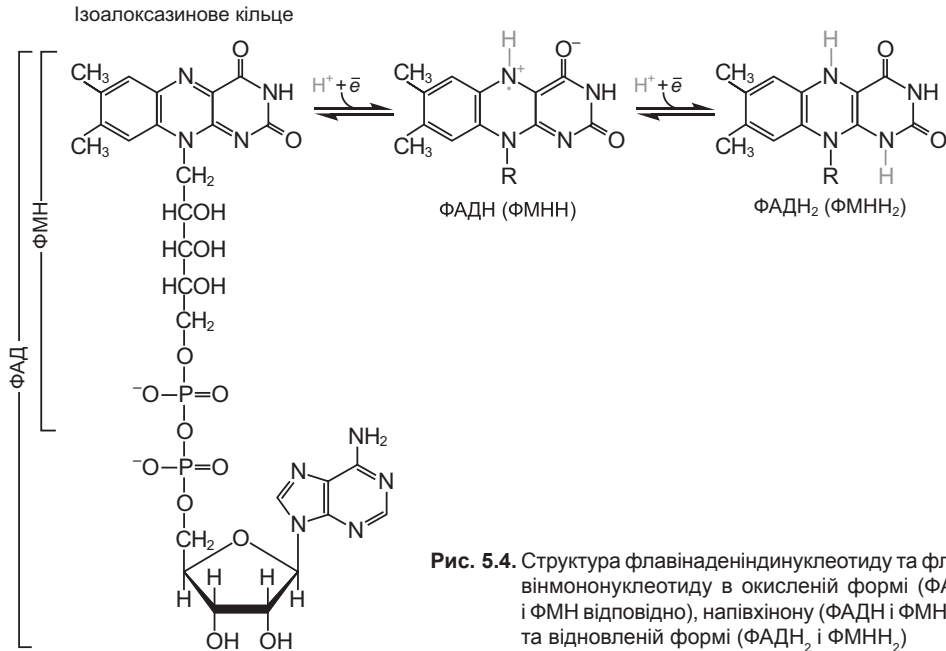


Рис. 5.4. Структура флавінаденіндинуклеотиду та флавінмононуклеотиду в окисненій формі (ФАД і ФМН відповідно), напівхінону (ФАДН і ФМНН) та відновленій формі (ФАДН₂ і ФМНН₂)

Гнучка структура ізоалоксазинового кільця флавінових нуклеотидів зазнає оборотного відновлення, приєднуючи один або два електрони у складі одного або двох атомів гідрогену, які відщеплюються від субстрату. Коли окиснений флавіновий нуклеотид одночасно акцептує два атоми гідрогену (два електрони і два протони), обидва атоми виявляються у системі флавінового кільця, і нуклеотид переходить у повністю відновлену форму. Коли на ФАД або ФМН переноситься тільки один атом гідрогену, утворюється семіхінон (напівхінон) – стабільний вільний радикал. Повністю відновлені флавінові нуклеотиди позначають у скороченому вигляді як ФАДН₂ і ФМНН₂.

Оскільки флавопротеїни можуть брати участь у реакціях як одно-, так і двохелектронного перенесення, флавінові дегідрогенази залучені до каталізу більш широкого спектра реакцій, ніж піридинзалежні дегідрогенази. До ферментів, коферментами яких є ФАД, також належать ацил-КоА-, дигідроліпоїл- і гліцерол-3-фосфат-дегідрогенази, тіоредоксинредуктаза, а ФМН – НАДН- і гліколат-дегідрогенази.

Відновлення флавінових нуклеотидів, так само як і відновлення піридино-вих нуклеотидів, супроводжується змінами у спектрі оптичного поглинання. У більшості флавопротеїнів флавіннуклеотид зв'язаний з білковою частиною досить міцно, а в сукцинатдегідрогеназі вони з'єднані ковалентним зв'язком. Кофермент, який міцно зв'язаний з ферментом, називають простетичною групою. Простетична група не переміщається від одного ферменту до іншого, переносючи електрони, а забезпечує тимчасове утримання електронів флавопротеїном упродовж часу, необхідного для перенесення електронів від субстрату на акцептор.

Одною з важливих характерних рис флавопротеїнів є варіабельність величини стандартного E'^0 зв'язаного флавінового нуклеотиду. Завдяки тому, що білкова та простетична групи у складі флавопротеїнів міцно з'єднані, величина відновлювального потенціалу флавінового кільця набуває значення, характерного саме для цього флавопротеїну, і часто відрізняється від величини окисно-відновного потенціалу вільного флавінового нуклеотиду. Наприклад, величина E'^0 для ФАД, зв'язаного з сукцинатдегідрогеназою, становить близько 0,0 В, а для вільного ФАД вона дорівнює -0,219 В (табл. 6.1).

Серед флавопротеїнів часто трапляються складні за будовою ферменти, деякі з них містять, окрім флавінового нуклеотиду, ще й міцно зв'язані неорганічні іони (наприклад, катіони феруму або молібдену), які також беруть участь у перенесенні електронів.

Підсумок 5. ОКИСНО-ВІДНОВНІ РЕАКЦІЇ У БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

- Передача електронів від донора до акцептора може відбуватися за безпосереднього перенесення електронів, перенесення електронів у складі атомів водню, у складі гідрид-іона та способом прямої взаємодії донора з киснем.
- Зміна стандартної вільної енергії у окисно-відновній реакції прямо пропорційна окисно-відновному потенціалу спряжених окисно-відновних пар: $\Delta G'^0 = -nF\Delta E'^0$.
- Багато реакцій біологічного окиснення є реакціями дегідрогенізації, у ході яких один або два атоми водню ($H^+ + e^-$) переносяться від субстрату на акцептор. У клітині окисно-відновні реакції відбуваються за участі спеціалізованих переносників електронів.

- Коферментами багатьох дегідрогеназ є піридинові нуклеотиди НАД і НАДФ, які вільно переміщуються від одного ферменту до іншого. Відновлюючись, НАД⁺ і НАДФ⁺ приєднують два електрони й один протон.
- Флавінові нуклеотиди ФАД і ФМН виконують роль простетичної групи, міцно зв'язаної з білковою частиною флавопротеїнів. Ці нуклеотиди можуть приєднувати як один, так і два електрони.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Стандартний відновний потенціал E'^0** будь-якої редокс-пари разраховують за такою напівреакцією: окиснювальний агент + кількість електронів (n) → відновний агент. E'^0 для спряжених окисно-відновних пар НАД⁺/НАДН і піруват/лактат дорівнює -0,32 та -0,19 В відповідно.
 - Яка зі спряжених пар має більшу здатність віддавати електрони?
 - Який із агентів є сильнішим окисником?
 - Якою буде зміна стандартної вільної енергії E'^0 у реакції перетворення пірувату на лактат? Якою буде константа рівноваги K'_p для цієї реакції?
 - У якому напрямі відбуватиметься ця реакція: піруват + НАДН + H⁺ ↔ лактат + НАД⁺ за pH 7,0, якщо концентрація субстратів і продуктів досягне 1 М?
- Спорідненість сполук до електронів.** Розташуйте наведені сполуки за зростанням їхньої здатності приєднувати електрони:
 - α-кетоглутарат + CO₂ (з утворенням ізоцитрату);
 - оксалоацетат;
 - O₂;
 - НАДФ⁺.
- Напрямок окисно-відновних реакцій.** Яка з наведених нижче реакцій відбуватиметься в заданому напрямі за стандартних умов та наявності ферменту в кількості, достатній для каталізу?
 - малат + НАД⁺ → оксалоацетат + НАДН + H⁺;
 - ацетоацетат + НАДН + H⁺ → β-гідроксибутират + НАД⁺;
 - піруват + НАДН + H⁺ → лактат + НАД⁺;
 - малат + піруват → оксалоацетат + лактат.
- Який спосіб перенесення електронів має місце у реакціях, які каталізуються НАД-залежними дегідрогеназами?**
 - безпосереднє перенесення електронів;
 - перенесення електронів у складі атомів гідрогену;
 - перенесення електронів у складі гідрид-іона;
 - перенесення електронів способом прямої взаємодії відновника з киснем.
- Вибрати правильні характеристики E'^0 :**
 - дає змогу оцінити відносну спорідненість акцептора електронів у складі кожної з окисно-відновних пар;

- 2) виражають у вольтах (В);
- 3) дає змогу безпосередньо оцінити зміну стандартної вільної енергії;
- 4) виражають у кДж/моль.

6. Виберіть правильні характеристики НАД⁺ у клітині:

- 1) концентрація приблизно у 10 разів вища за НАДФ⁺;
- 2) співвідношення НАД⁺ (окисленого) до НАДН (відновленого) підтримується на високому рівні;
- 3) співвідношення НАД⁺ (окисленого) до НАДН (відновленого) підтримується на низькому рівні;
- 4) концентрація є вищою у мітохондріях, ніж у цитоплазмі.

7. Виберіть правильні характеристики НАДФ⁺ у клітині:

- 1) концентрація близько 10^{-6} М;
- 2) концентрація вища за НАД⁺;
- 3) вміст НАДФН (відновлений) вищий за НАДФ⁺ (окиснений);
- 4) концентрація вища у мітохондріях, ніж у цитоплазмі.

8. Високе співвідношення НАД⁺/НАДН:

- 1) сприяє перенесенню гідрид-іона від НАДН на субстрат;
- 2) сприяє перенесенню гідрид-іона від субстрату на НАД⁺;
- 3) запобігає перенесенню гідрид-іона від НАДН на субстрат;
- 4) сприяє перенесенню протона від НАДН на субстрат.

9. Зазначте повністю відновлені флавінові нуклеотиди:

- 1) ФАДН₂;
- 2) ФМНН₂;
- 3) ФМНН;
- 4) НАДФН.

10. Виберіть НАД-залежні субстрати:

- 1) ізоцитрат;
- 2) α -кетоглутарат;
- 3) малат;
- 4) сукцинат.

11. Максимуми спектра поглинання НАДН становлять такі кількості нм:

- 1) 260 і 340;
- 2) тільки 260;
- 3) тільки 340;
- 4) 360 і 400.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Богач П.Г., Клевець М.Ю., Рибальченко В.К. Основи електрофізіології. – Київ: Вища школа, 1984. – 253 с.
- Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основи біохімії за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
- Belenky P., Bogan K.L., Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. – Trends Biochem. Sci. – 2007. – Vol. 32, N1. – P. 12–19.
- Metzler D.E. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells. – 2nd ed. – Harcourt, San Diego, 2001. – 1165 p.
- Pollak N., Dolle C., Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. – Biochem. J. – 2007. – Vol. 402, N 2. – P. 205–218.

ГЛІКОЛІЗ І ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ

- Гліколіз
 - Загальна характеристика
 - Перша стадія
 - Друга стадія
 - Енергетичний баланс гліколізу
- Глікоген як форма зберігання глюкози
- Глюконеогенез
- Пентозофосфатний шлях

Енергетичні процеси у клітині можна поділити на три основних етапи (рис. 6.1). На першому з них продукти розщеплення полісахаридів, жирів і білків – глюкоза, жирні кислоти й деякі амінокислоти – окислюються до дикарбонових молекул ацетил-КоА. На другому етапі ацетильні групи декарбоксилюються, а в чотирьох реакціях циклу лимонної кислоти електрони відновлюють молекули НАД чи ФАД. На третьому етапі ці відновлені переносники електронів окиснюються у дихальному ланцюгу мітохондрій за участі кінцевого акцептора електронів – кисню. На всіх етапах відбувається акумулювання енергії у формі АТФ (етапи 1, 2 і 3), відновлених переносників електронів (НАДН чи ФАДН₂, етапи 1 і 2) чи трансмембранного градієнта іонів гідрогену (етап 3). У наступних розділах будуть розглянуті особливості й механізми утворення, акумулювання та приклади використання метаболічної енергії на всіх трьох етапах.

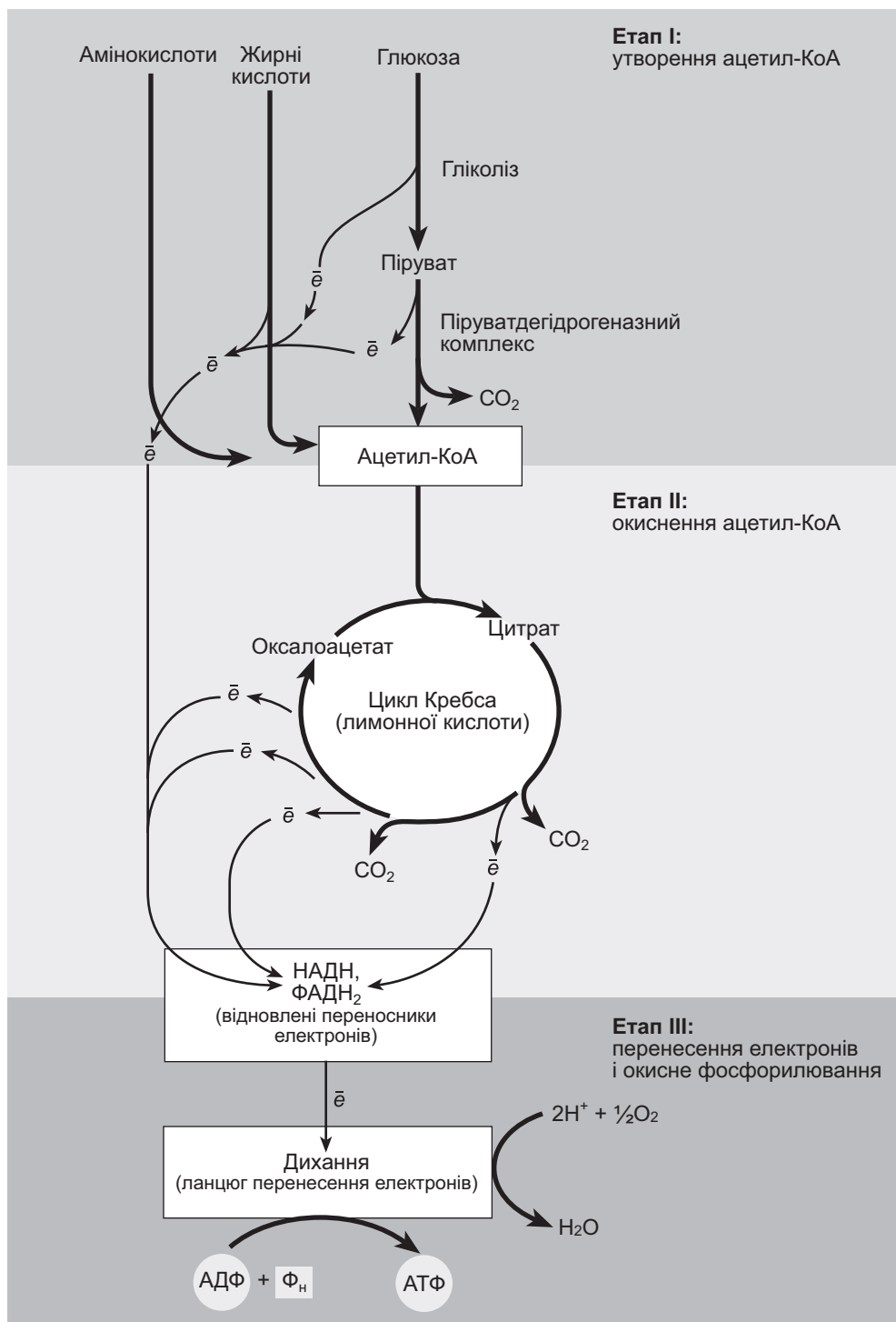


Рис. 6.1. Три основних етапи енергетичних процесів у клітині [за Нельсон, Кокс, 2015]

6.1. ГЛІКОЛІЗ

6.1.1. Загальна характеристика

Молекула глюкози, яка є основним паливом для більшості організмів, посідає центральне місце у процесах метаболізму. Глюкозу характеризує відносно високе значення потенційної хімічної енергії. Повне окиснення глюкози до карбон діоксиду та води супроводжується вивільненням значної частини енергії. Тому, зберігаючи глюкозу у вигляді такого високомолекулярного полімеру, як крохмаль чи глікоген, клітина може накопичувати значну кількість енергії¹. Як тільки в організмі виникає потреба в енергії (АТФ), з внутрішньоклітинного резервного полімеру (глікогену чи крохмалю) швидко вивільнюється гексоза (глюкоза), яка у процесі гліколізу розщеплюється на дві тріози (пірувату) або ж окислюється до пентози через утворення пентозофосфату (фосфоглюконату), а вивільнена енергія використовується для синтезу АТФ. Крім того, глюкоза – не тільки паливо, але й універсальний попередник багатьох органічних речовин, завдяки якому біосинтетичні реакції забезпечуються найрізноманітнішими проміжними метаболітами.

Гліколіз – це послідовність ферментативних реакцій, наслідком яких є розщеплення молекули глюкози до двох молекул пірувату. За перебігу послідовних реакцій гліколізу значна частина вивільненої енергії акумулюється у формі АТФ або НАДН. Перші біохімічні дослідження реакцій гліколізу були виконані на екстрактах дріжджів і м'язів Едуардом Бухнером у 1897 р. (Нобелівська премія з хімії, 1907 р.). Реакції гліколізу на різних етапах також досліджували Густав Ембден, Отто Мейєргоф (Нобелівська премія з фізіології та медицини, 1922 р.), Яків Парнас, Вільям Янг, а також Ганс фон Ейлер-Хельпін і Артур Гарден (Нобелівська премія з хімії, 1927 р.) та ін. Інша назва гліколізу – цикл Ембдена–Мейєргофа–Парнаса.

Яків Парнас народився у с. Мокряни біля Дрогобича. Засновник Львівської біохімічної школи. Особливий внесок у дослідження гліколізу Я. Парнас і його колеги (П. Остерн, Т. Манн та ін.) зробили, вивчаючи третю (фосфофруктокіназну) і десятую (піруваткіназну) реакції процесу. До безперечних заслуг Парнаса належить також дослідження перенесення окремих хімічних груп з молекули на молекулу без стадії “вільного існування”. Такі “трансреакції” (трансфосфорилування, трансамінування, трансметилування) дають змогу здійснюватися реакціям без теплової деградації хімічного потенціалу. Яків Парнас у 1942 р. обраний

¹ Нагромадження глікогену суттєво не змінює осмолярності цитозолу, оскільки його молекули є значно більшими за глюкозу



Проф. Я. Парнас (сидить у центрі) серед співробітників кафедри фізіологічної хімії Львівського університету. Львів, 1929 р.



Яків Парнас у львівський період життя. 1920-ті роки

академіком АН СРСР, а у 1944 р. – академіком АМН СРСР. У 1949 р. репресований у “Справі лікарів” і загинув “від інфаркту” під час допиту в московській тюрмі МДБ СРСР.

Гліколіз – метаболічний шлях перетворення глюкози на цитозолі, в результаті якого утворюється дві молекули пірувату, а вивільнена енергія зберігається у формі АТФ і НАДН.

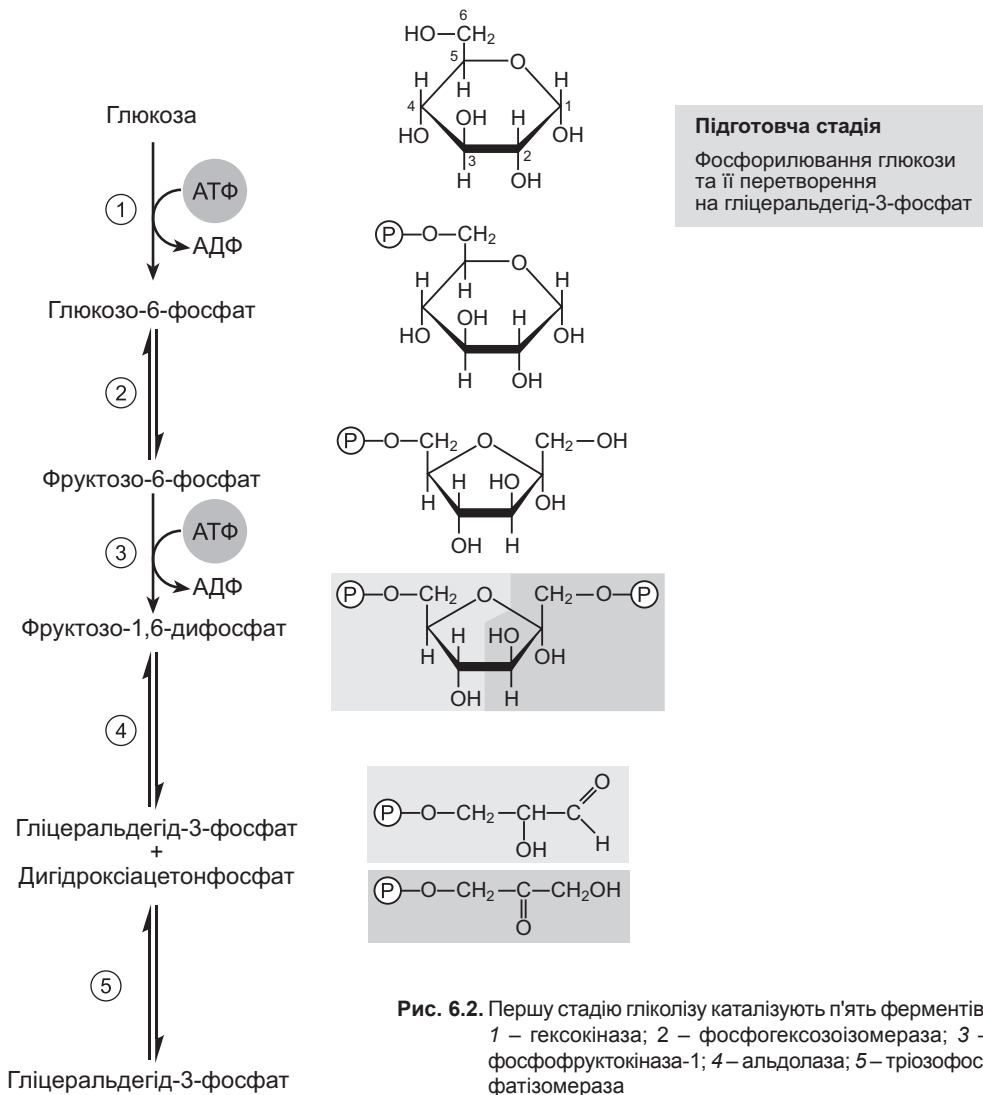
Гліколіз є дуже важливим процесом розщеплення глюкози, завдяки якому в більшості клітин обмінюється значна кількість карбону. Гліколіз може відбуватись як в анаеробних, так і в аеробних умовах. Гліколітичне розщеплення глюкози – це єдине або головне джерело отримання метаболічної енергії у деяких тканинах і клітинах ссавців (еритроцити, сперма, мозковий шар нирок, ембріональні тканини), рослин (бульби картоплі) чи більшості анаеробних мікроорганізмів. Глюкоза є основним енергетичним субстратом для головного мозку. Мозок людини споживає понад 120 г глюкози за добу, що становить більше половини запасів глюкози у формі глікогену в печінці та м'язах.

Процес гліколізу за анаеробних умов є чи не найдревнішим біологічним механізмом отримання енергії в поживних органічних молекулах, з огляду на те, що живі організми вперше виникли у безкисневій атмосфері. Послідовність гліколітичних реакцій, амінокислотна послідовність і третинна структура гомологічних ферментів повністю збереглися в ході еволюції як у хребетних, так і у рослин чи дріжджів. Однак розщеплення глюкози у різних видів відрізняється способами регуляції та метаболічними перетвореннями пірувату, який є кінцевим продуктом гліколізу.

6.1.2. Перша стадія

Розщеплення шестикарбонової глюкози на дві молекули трикарбонового пірувату відбувається у десяти послідовних реакціях гліколізу, перші п'ять із яких називають першою, або підготовчою, стадією (рис. 6.2).

На підготовчій стадії гліколізу одна молекула глюкози розщеплюється з утворенням двох молекул тріозофосфату і витрачається енергія двох молекул АТФ.



На початку цього метаболічного шляху фосфорилується гідроксильна група глюкози (реакція 1). Утворений глюкозо-6-фосфат перетворюється на фруктозо-6-фосфат (реакція 2), який знову фосфорилується з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату (реакція 3). У наступній реакції фруктозо-1,6-дифосфат розщеплюється на дві молекули, кожна з яких містить три карбони, – дигідроксіацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат (реакція 4). Це і є “лізис” глюкози, тобто розщеплення, від якого має назву цей метаболічний шлях. Унаслідок ізомеризації дигідроксіацетонфосфату утворюється ще одна молекула гліцеральдегід-3-фосфату (реакція 5), і на цьому перша стадія гліколізу завершується.

Більш детально розглянемо реакції 1 і 3, в яких енергія АТФ витрачається.

Реакція 1. У першій реакції гліколізу внаслідок фосфорилування глюкози у положенні С-6 відбувається її активація – утворення глюкозо-6-фосфату. Реакцію фосфорилування, яка здійснюється всередині клітини¹ і є необоротною, каталізує фермент **гексокіназа**. Як і дев’ять інших ферментів гліколізу, гексокіназа – це розчинний цитозольний білок. Роль акцептора фосфатної групи у реакції, яку каталізує гексокіназа, виконує D-глюкоза. Донором фосфатних груп у цій реакції слугує АТФ. Гексокіназа, як і більшість інших кіназ, потребує наявності Mg^{2+} для виявлення активності, тому що справжнім субстратом для ферменту є не АТФ⁺, а комплекс $MgATP^{2-}$.

У людини виявлено чотири ізоформи гексокінази (I–IV), що відрізняються своїми регуляторними та кінетичними властивостями. Константа Міхаеліса–Ментен (K_m) гексокінази II скелетних м’язів становить 0,1 мМ, що в 40–50 разів менше за вміст глюкози у крові. Гексокіназа II алостерично й оборотно інгібується продуктом своєї реакції – глюкозо-6-фосфатом. У печінці переважає гексокіназа IV, яку ще називають **глюкокіназою**. Її кількість у клітині збільшується, коли зростають енергетичні потреби, наприклад, за зростання співвідношення АМФ/АТФ.

Глюкокіназа має низьку спорідненість до глюкози ($K_m = 10$ мМ), що приблизно удвічі перевищує нормальний вміст глюкози у крові. Її активність у печінці не пригнічується глюкозо-6-фосфатом, а регулюється спеціальним білком. Такі властивості глюкокінази дають їй змогу ефективно регулювати рівень глюкози у крові. Якщо він не перевищує норми (5 мМ), глюкокіназа неактивна, бо зв’язана з регуляторним білком у ядрі. У результаті печінка не конкурує з іншими органами за глюкозу, а новоутворені у глюконеогенезі молекули можуть вільно виходити в кров. Коли ж рівень глюкози у крові зростає, вона швидко транспортується специфічним переносником GLUT2 у гепатоцити, викликає відщеплення інгібіторного білка від ферменту, після чого глюкокіназа може каталізувати реакцію фосфорилування.

¹ Це має важливе значення, оскільки глюкозні транспортери плазматичної мембрани не можуть транспортувати глюкозо-6-фосфат із цитоплазми у позаклітинне середовище; завдяки цій реакції, фактично, зменшується хімічний градієнт глюкози крізь плазматичну мембрану

Варто зазначити, що спорідненість переносника GLUT2 у мембрані гепатотитів до глюкози теж є невеликою ($K_m = 20$ мМ). Натомість, спорідненість до глюкози GLUT1 (наприклад, у мембрані еритроцитів) є приблизно на порядок вищою ($K_m = 1,5$ мМ). Це ще один механізм, який забезпечує неконкурентність печінки з іншими органами за глюкозу, коли її рівень у крові перебуває в межах фізіологічної норми.

Реакція 3. У цій реакції гліколізу фермент **фосфофруктокіназа-1 (ФФК-1)** переносить фосфатну групу від АТФ на фруктозо-6-фосфат з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату. За умов клітини ця реакція практично необоротна.

Фосфофруктокіназа-1 – це регуляторний фермент доволі складної будови. Він є важливим регулятором гліколізу (рис. 6.3). За умов вичерпування клітинних запасів АТФ або надмірного накопичення продуктів її розщеплення – АМФ і АДФ – активність фосфофруктокінази-1 зростає. І навпаки, активність цього ферменту пригнічується, якщо клітина має достатню кількість АТФ чи високий рівень цитрату. Ефективним алостеричним регулятором фосфофруктокінази-1 є фруктозо-2,6-дифосфат, який утворюється ферментом **фосфофруктокіназою-2**. Цей фермент має як кіназну, так і фосфатазну активності. Кіназна активність фосфофруктокінази-2 алостерично підсилюється інсуліном за високої концентрації глюкози у крові, а фосфатазна – глюкагоном за низької концентрації глюкози, що опосередковано пригнічує гліколіз.

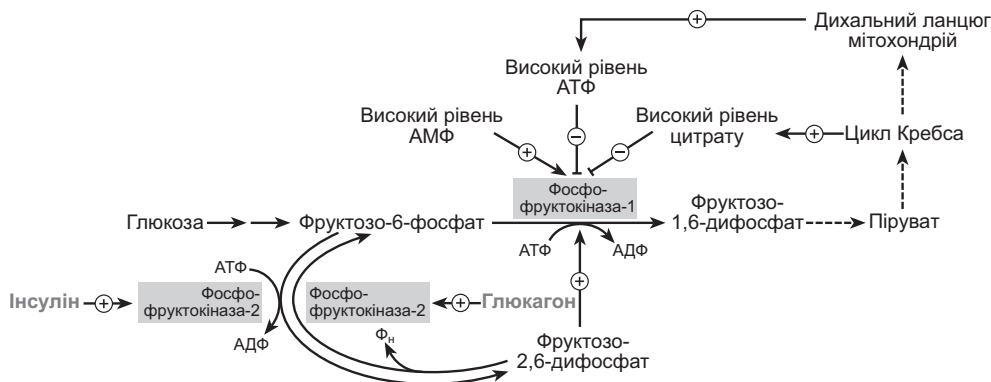


Рис. 6.3. Алостерична регуляція першої стадії гліколізу

6.1.3. Друга стадія

Енергетичний вигравш має місце на другій стадії гліколізу, коли енергія акумулюється у формі як НАДН, так і АТФ (рис. 6.4). Спочатку кожна з двох утворених молекул гліцеральдегід-3-фосфату окислюється та фосфорилується неорганічним фосфатом (без використання АТФ, але з відновленням НАД⁺) до 1,3-дифосфогліцерату (реакція 6). Коли дві молекули 1,3-дифосфогліцерату перетворюються на дві молекули пірувату, вивільнена енергія акумулюється у формі НАДН і АТФ (реакції 6, 7 і 10).

Дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату, що утворилися з однієї молекули глюкози, зазнають однакових перетворень упродовж другої стадії гліколізу. Перетворення двох молекул гліцеральдегід-3-фосфату на дві молекули пірувату супроводжується утворенням чотирьох молекул АТФ. Проте сумарний вихід АТФ становить тільки дві молекули АТФ у перерахунку на одну розщеплену молекулу глюкози, оскільки дві молекули АТФ були використані на першій підготовчій стадії гліколізу на фосфорилування глюкози і фруктозо-6-фосфату.

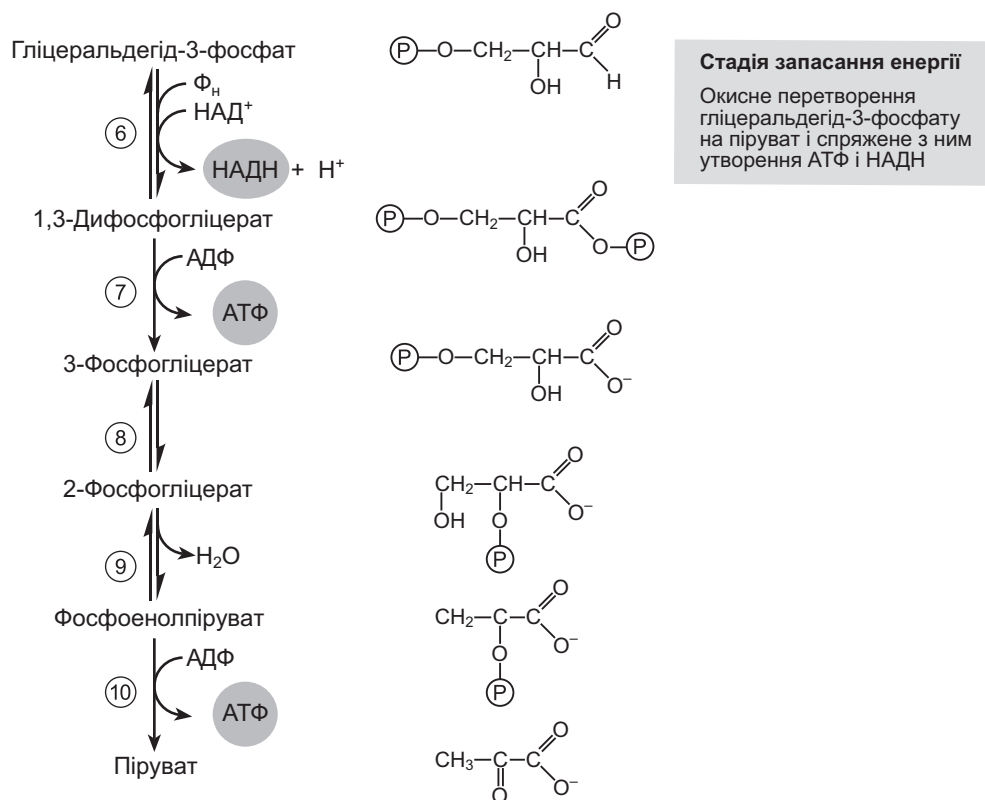


Рис. 6.4. Друга стадія гліколізу: на схемі представлено розщеплення однієї з двох молекул гліцеральдегід-3-фосфату, утворених на першій стадії гліколізу; 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; 7 – фосфогліцераткіназа; 8 – фосфогліцератмутаза; 9 – енолаза; 10 – піруваткіназа

На другій стадії гліколізу гліцеральдегід-3-фосфат окислюється, а вивільнена при цьому енергія зберігається у формі двох молекул АТФ і однієї молекули НАДН.

Розглянемо детальніше реакції 6, 7 і 10, які забезпечують акумуляцію енергії.

Реакція 6. Ця реакція каталізується ферментом **гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою**. Альдегідна група гліцеральдегід-3-фосфату окислюється з утворенням змішаного ангідриду карбонової та фосфорної кислот, який має велике значення стандартної вільної енергії гідролізу ($\Delta G'^0 = -49,3$ кДж/моль). Значна частина цієї енергії зберігається внаслідок утворення ацилфосфатного зв'язку (між карбоною і фосфатною групами) у молекулі 1,3-дифосфогліцерату. Ацептором гідрогену в гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназній реакції слугує НАД⁺. У результаті ферментативного перенесення гідрид-іона (:H⁻) від альдегідної групи гліцеральдегід-3-фосфату до нікотинамідного кільця у складі НАД⁺ утворюється відновлений кофермент НАДН. Другий атом гідрогену гліцеральдегід-3-фосфату потім вивільняється у середовище. Згодом молекула НАДН окислюється до НАД⁺, підтримуючи рівень НАД⁺ у цитоплазмі на фізіологічному рівні, а вивільнена енергія використовується в циклі Кребса і дихальному ланцюгу для синтезу АТФ у мітохондріях.

Зміна вільної енергії (ΔG) реакції 6 (рис. 6.4) залежить від зміни стандартної вільної енергії, $\Delta G'^0$ та співвідношення концентрацій продуктів і субстратів:

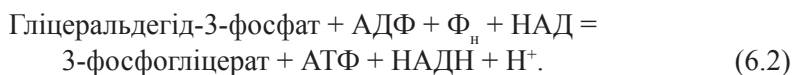
$$\Delta G = \Delta G'^0 + RT \ln \frac{[1,3\text{-дифосфогліцерат}][\text{НАДН}]}{[\text{гліцеральдегід-3-фосфат}][\text{Ф}_\text{н}][\text{НАД}^+]} \quad (6.1)$$

Тому рівновага реакції 6 гліколізу зміщується вправо за високої концентрації у цитозолі окисненої форми НАД.

Під час гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназної реакції гліцеральдегід-3-фосфат ковалентно зв'язаний з ферментом. Альдегідна група гліцеральдегід-3-фосфату реагує з SH-групою залишку цистеїну в активному центрі ферменту. Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа інгібується **йодацетатом**. Додавання цього інгібітора до екстракту дріжджів або м'язів викликає накопичення утворених у ході гліколізу гексозофосфатів.

Реакція 7. За перебігу цієї реакції фермент **фосфогліцераткіназа** каталізує перенесення високоенергетичної фосфатної групи від карбоксильної групи 1,3-дифосфогліцерату на АДФ з утворенням АТФ. Реакція відбувається в обох напрямках. У зворотному напрямі фосфогліцераткіназа діє під час глюконеогенезу та каталізу фотосинтетичних реакцій фіксації CO₂.

Реакції гліколізу 6 і 7 забезпечують спряження процесів окислення та фосфорилування. Їхнє сумарне рівняння має такий вигляд:



Зміна стандартної вільної енергії ($\Delta G'^0$) такої реакції є -12,5 кДж/моль, що свідчить про її екзергонічний характер. Утворення АТФ через перенесення фосфатної групи від субстрату (1,3-дифосфогліцерату) на АДФ називають **субстратним фосфорилуванням**. Воно здійснюється за участі цитозольних

ферментів і хімічних проміжних продуктів, тоді як окисне фосфорилування (спряжене з диханням) відбувається за участі мембранозв'язаних ферментів та градієнта протонів крізь внутрішню мембрану мітохондрій.

Реакція 10. Перенесення фосфатної групи від фосфоенолпірувату на АДФ з утворенням пірувату каталізує фермент **піруваткіназа** за участі іонів K^+ , Mg^{2+} чи Mn^{2+} . Піруват спочатку утворюється в енольній формі, а потім швидко і неферментативно таутомеризується з утворенням кетоформи, яка й переважає за нейтрального значення рН. Сумарна реакція гідролізу фосфоенолпірувату характеризується дуже високою від'ємною величиною зміни стандартної вільної енергії (-61,9 кДж/моль). Значна частина цієї енергії (-31,4 кДж/моль) витрачається на спрямування реакції вправо – в бік утворення пірувату. За типових умов у клітині піруваткіназна реакція є практично необоротною, а активність піруваткінази алостерично пригнічується одним із продуктів цієї реакції – АТФ.

Отже, за перебігу реакцій гліколізу відбуваються три основних хімічних перетворення:

- розпад карбонового скелету глюкози з утворенням пірувату;
- фосфорилування АДФ синтезованими у другій стадії гліколізу високоенергетичними фосфорильованими сполуками з утворенням АТФ;
- перенесення гідрид-іона й електронів на $НАД^+$ з утворенням НАДН.

Подальша доля утвореного пірувату залежить від типу клітини та метаболічних обставин.

Перетворення пірувату. Кінцевий продукт гліколізу – піруват – зазнає подальшого перетворення у тварин одним із трьох катаболічних шляхів. В аеробних організмах (у їхніх тканинах за аеробних умов) гліколіз – це тільки перший процес повного розщеплення глюкози (рис. 6.5). Піруват окислюється, втрачаючи карбоксильну групу, внаслідок чого утворюється ацетильна група ацетилкоферменту А. Надалі ацетильна група повністю окислюється до CO_2 у циклі Кребса. НАДН, утворений шляхом дегідрогенізації гліцеральдегід-3-фосфату, знову окислюється до $НАД^+$. Електрони, що вивільнилися в окисних реакціях, передаються на O_2 через ланцюг переносників у мітохондріях з утворенням H_2O . Енергія, яка вивільняється під час перенесення електронів, використовується для синтезу АТФ у мітохондріях.

Інший шлях перетворення пірувату – його відновлення до лактату у процесі молочнокислого бродіння. Коли скелетні м'язи інтенсивно скорочуються, тобто функціонують за умов гіпоксії, утворений у разі гліколізу НАДН не може окиснюватись до $НАД^+$. За цих умов піруват не окиснюється, а відновлюється до лактату, приєднуючи електрони від НАДН. У такий спосіб відбувається регенерація $НАД^+$, необхідного для продовження гліколізу. У деяких тканинах і клітинах (сітківка ока, мозок, еритроцити) перетворення глюкози на лактат відбувається навіть за аеробних умов.

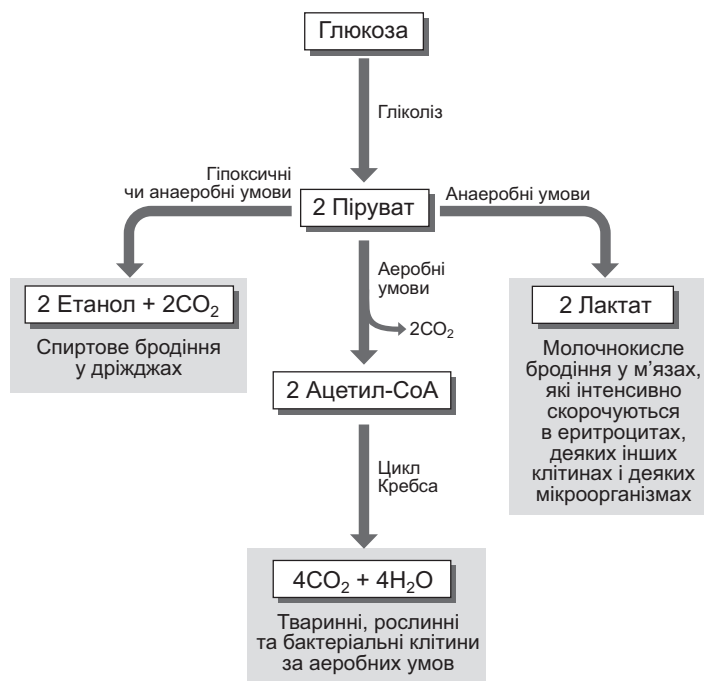


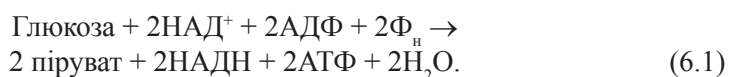
Рис. 6.5. Три можливих катаболічних шляхи перетворення пірувату, утвореного у процесі гліколізу

Третій шлях катаболізму пірувату завершується утворенням етанолу. У деяких тканинах рослин, певних видів хребетних, найпростіших і мікроорганізмів, таких як пивні дріжджі, піруват у гіпоксичних або анаеробних умовах перетворюється на етанол та CO_2 . Цей процес має назву спиртового бродіння (рис. 6.5).

6.1.3. Енергетичний баланс гліколізу

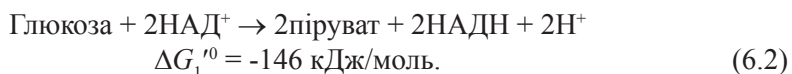
Більша частина вивільненої протягом гліколізу енергії зберігається у формі чотирьох молекул АТФ унаслідок спряженого субстратного фосфорилування. Однак чистий загальний вихід АТФ дорівнює не чотирьом, а тільки двом молекулам АТФ у розрахунку на одну розщеплену молекулу глюкози, оскільки дві молекули АТФ були витрачені під час підготовчого етапу. На другій стадії гліколізу енергія зберігається не тільки у формі АТФ, але й у формі двох молекул НАДН у розрахунку на молекулу глюкози.

Загальне рівняння гліколізу має такий вигляд:

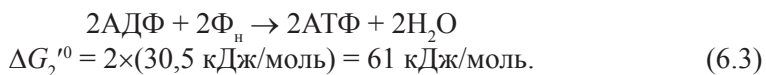


За розщеплення кожної молекули глюкози до пірувату утворюється дві молекули АТФ. У рівнянні гліколізу виділяють дві складові:

1. Перетворення глюкози на піруват, яке є екзергонічним процесом:



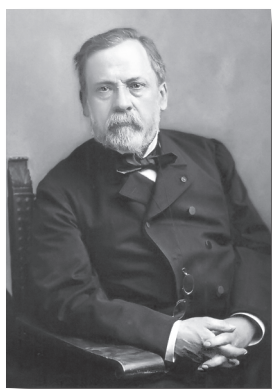
2. Утворення АТФ з АДФ і Φ_{H} , яке є ендергонічним процесом¹:



Із суми рівнянь 6.2 та 6.3 отримаємо величину загальної зміни стандартної вільної енергії у гліколізі, $\Delta G_{\text{сум}}'^0$:

$$\Delta G_{\text{сум}}'^0 = \Delta G_1'^0 + \Delta G_2'^0 = -146 \text{ кДж/моль} + 61 \text{ кДж/моль} = -85 \text{ кДж/моль}. \quad (6.4)$$

За стандартних умов усередині клітини гліколіз функціонує як необоротний процес завдяки значному зменшенню вільної енергії. У ході гліколізу вивільняється тільки незначна частина доступної енергії, яка міститься у молекулі глюкози. За умов повного окиснення глюкози до CO_2 і H_2O величина зміни стандартної вільної енергії становить -2 840 кДж/моль. Тобто у процесі гліколітичного розщеплення глюкози на дві молекули пірувату вивільняється тільки 5,2 % від загальної кількості енергії, що може бути вивільнена за повного окиснення глюкози. Однак, якщо врахувати справжню внутрішньоклітинну концентрацію АТФ, АДФ, Φ_{H} , а також глюкози і пірувату, з'ясується, що ефективність зберігання вивільненої у ході гліколізу енергії у формі АТФ становить більш, ніж 60 %. Крім того, енергія, яка вивільняється за перенесення електронів від НАДН до O_2 , використовується для синтезу АТФ у процесі окисного фосфорилування на третьому етапі енергетичного метаболізму в клітині (див. рис. 6.1).



Луї Пастер
(1822–1895)

Отже, сумарно у процесі гліколізу одна молекула глюкози перетворюється на дві молекули пірувату, дві молекули АДФ фосфорилуються до двох молекул АТФ, а чотири електрони (у формі двох гідрид-іонів) переносяться від двох молекул гліцеральдегід-3-фосфату на дві молекули НАД⁺.

Ще у XIX ст., досліджуючи бродіння глюкози у дріжджовому екстракті, видатний французький біолог Луї Пастер з'ясував, що швидкість процесу і загальна кількість споживаної глюкози за анаеробних умов є набагато вищими, ніж за аеробних. Це відкриття увійшло в історію науки під назвою “ефект Пастера”. Дослідження на скелетних м'язах ссавців також підтвердили вищу швидкість гліколізу за анаеробних умов. Пізніше з'ясувалося, що причиною цього ефекту є те, що кількість АТФ, яка утворюється за перебігу гліколізу в анаеробних умовах (дві молекули АТФ на молекулу глюкози),

¹ Для розрахунку $\Delta G_2'^0$ варто брати до уваги, що на другій стадії гліколізу з однієї молекули глюкози утворюються дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату

є значно меншою, ніж кількість АТФ, яка утворюється за повного окислення глюкози за аеробних умов до CO_2 та H_2O (32 молекули АТФ на молекулу глюкози). Тому для того, щоб забезпечити енергетичні потреби клітин за анаеробних умов, необхідно спожити набагато більше глюкози.

Перебіг гліколітичних реакцій перебуває під постійним контролем, що дає змогу підтримувати сталий рівень АТФ і забезпечувати клітину проміжними продуктами гліколізу для підтримування біосинтетичних реакцій. Коли баланс між утвореним і спожитим АТФ, окисленим і відновленим НАД у клітині порушується, це відразу відбивається на вмісті основних метаболітів. У відповідь на миттєві коливання концентрації цих метаболітів змінюється активність ключових гліколітичних ферментів – гексокінази, фосфофруктокінази-1 та піруваткінази, які регулюються алостерично і контролюють швидкість гліколізу.

6.2. ГЛІКОГЕН ЯК ФОРМА ЗБЕРІГАННЯ ГЛЮКОЗИ

Глюкоза зберігається в організмі ссавців у формі полімерного резервного вуглеводу – **глікогену**. Внутрішньоклітинний глікогеноліз відбувається не через гідроліз, а через фосфороліз, коли глікозидні зв'язки полімеру атакуються фосфатною кислотою. Відповідно продуктом реакції, яку каталізує глікогенфосфорилаза, є не вільна глюкоза, а **глюкозо-1-фосфат**. Це дає змогу зберегти велику частину енергії глікозидних зв'язків, коли моносахарид включається в метаболічні шляхи (наприклад, гліколіз чи пентозофосфатний шлях) і не потребує додаткового фосфорилювання, економлячи “зайву” молекулу АТФ¹. Особливості глюкозо-1-фосфату за фізіологічних умов у м'язах дають їй змогу не покидати клітину. Це обумовлено тим, що за фізіологічних умов ця сполука заряджена негативно і що для неї, на відміну від глюкози, немає переносників у плазматичній мембрані. Сама глікогенфосфорилаза переходить в активний стан унаслідок фосфорилювання, яке здійснюється кіназою глікогенфосфорилази. Цей фермент, у свою чергу, активується адреналіном. Інактивація глікогенфосфорилази відбувається внаслідок дефосфорилювання молекули специфічною фосфатазою.

За дії іншого ферменту – фосфоглюкомутази глюкозо-1-фосфат перетворюється на глюкозо-6-фосфат, який є першим проміжним продуктом гліколізу чи пентозофосфатного шляху (рис. 6.2 і 6.7).

Ізоформи глікогенфосфорилази у м'язах і печінці розрізняються за способами регуляції, що пов'язано з особливостями метаболізму глюкози у цих органах. Алостеричним регулятором активності глікогенфосфорилази у печінці слугує глюкоза.

У гліколіз глікоген залучається у формі глюкозо-6-фосфату після розщеплення глікогенфосфорилазою та ізомеризації фосфоглюкомутазою.

¹ Тому за окислення глюкози у формі глікогену до пірувату утворюється три, а не дві, як за окислення вільної глюкози, молекули АТФ

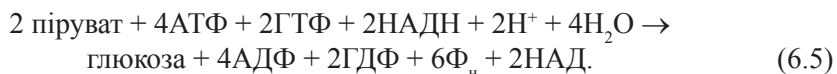
Інші D-гексози (зокрема, фруктоза, маноза та галактоза) також можуть залучатись у процес гліколізу. Кожен із цих моносахаридів спочатку фосфорилюється, а потім перетворюється або на глюкозо-6-фосфат, або на фруктозо-6-фосфат (другий проміжний продукт гліколізу). Перетворення галактозо-1-фосфату на глюкозо-1-фосфат відбувається за участі двох нуклеотидних похідних вуглеводів – УДФ-галактози та УДФ-глюкози. Генетичні дефекти ферментів, які каталізують перетворення галактози на глюкозо-1-фосфат призводять до розвитку небезпечної хвороби **галактоземії**.

6.3. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

Поповнення запасу глюкози відбувається переважно у процесі глюконеогенезу – багатоступінчастого процесу перетворення на глюкозу пірувату, лактату, гліцеролу, глюкогенних амінокислот чи споріднених три- або чотирикарбонових сполук. На рис. 6.6 глюконеогенез проілюстровано процесом синтезу глюкози з пірувату.

У ссавців глюконеогенез відбувається переважно у печінці. Більшу частину реакцій глюконеогенезу каталізують ті ж ферменти, що й реакції гліколізу. Однак у глюконеогенезі є три реакції, які каталізуються специфічними ферментами, оскільки у гліколізі вони є практично необоротними. Це ті реакції, які каталізуються гексокіназою, фосфофруктокіназою-1 і піруваткіназою, зі значним від'ємним $\Delta G'^0$; усі інші реакції гліколізу мають $\Delta G'^0$, близьке до нуля (див. табл. 2.2). Для того, щоб оминати ці три необоротні реакції, у глюконеогенез залучені ферменти піруваткарбоксилаза і фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (для перетворення пірувату через оксалоацетат на фосфоенолпіруват), фруктозо-1,6-дифосфатаза (для перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на фруктозо-6-фосфат), глюкозо-6-фосфатаза (для перетворення глюкозо-6-фосфату на глюкозу; рис. 6.6). Як і гліколіз, глюконеогенез відбувається переважно в цитозолі, але й інші компартменти клітини можуть бути залучені у ці процеси. Встановлено, що фермент останньої реакції глюконеогенезу (розщеплення глюкозо-6-фосфату до глюкози і Φ_{Π}) глюкозо-6-фосфатаза розташований у мембрані ендоплазматичного ретикулуму, а його каталітична субодиниця спрямована у люмен ретикулуму [van Schaftingen, Gerin, 2002]. Утворена у процесі гідролізу глюкоза транспортується з ендоплазматичного ретикулуму, а далі й із клітини за допомогою специфічних переносників.

Сумарна реакція глюконеогенезу з пірувату має такий вигляд:



Глюконеогенез – енергозатратний і реципрокний до гліколізу процес синтезу глюкози, в якому для утворення однієї її молекули треба використати чотири молекули АТФ, дві молекули ГТФ і дві молекули НАДН.

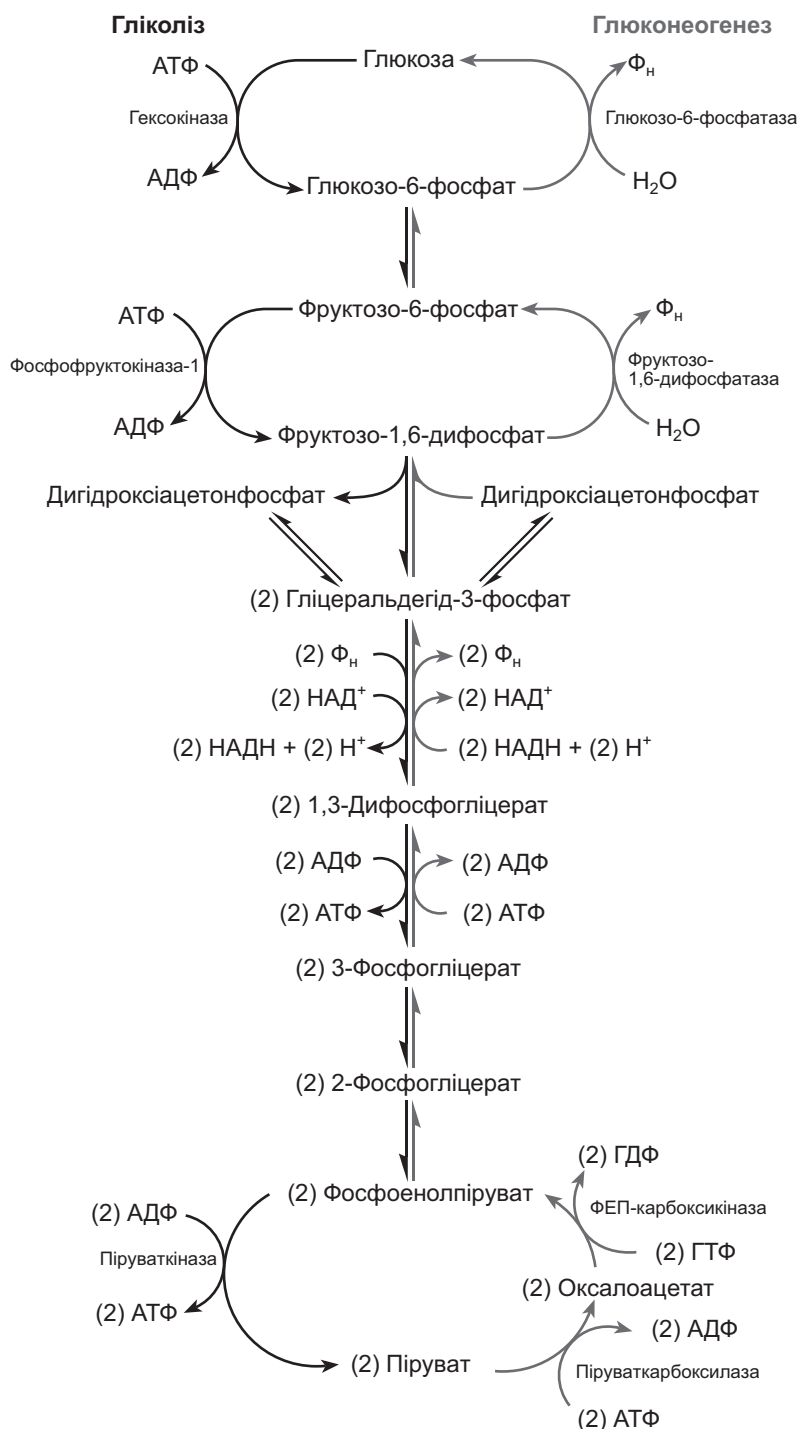


Рис. 6.6. Спряжені процеси гліколізу та глюконеогенезу [за Ніколсон, Кокс, 2015]

Отже, гліколіз і глюконеогенез – це необоротні внутрішньоклітинні процеси, які взаємодіють реципрокно й узгоджено.

Перетворення глюкози у процесах гліколізу і глюконеогенезу перебувають під реципрокним алостеричним контролем – у разі активації гліколізу глюконеогенез пригнічується і навпаки. Наприклад, фруктозо-2,6-дифосфат є алостеричним активатором гліколітичної фосфофруктокінази-1 і одночасно алостеричним інгібітором фруктозо-1,6-дифосфатази – ключового ферменту глюконеогенезу. Регулювання гліколізу також здійснюється гормонами адреналіном, глюкагоном та інсуліном (див. рис. 6.3). Зокрема, за впливу глюкагону знижується концентрація фруктозо-2,6-дифосфату, уповільнюється гліколіз і одночасно стимулюється глюконеогенез. Інший спосіб регуляції гліколізу – зміна експресії генів деяких гліколітичних і глюконеогенних ферментів.

6.4. ПЕНТОЗОФОСФАТНИЙ ШЛЯХ

Окрім гліколізу, є ще й інші способи катаболічного перетворення глюкози, які забезпечують клітину необхідними для життєдіяльності специфічними продуктами. Таким способом є, зокрема, пентозофосфатний шлях, який функціонує як постачальник НАДФН та рибозо-5-фосфату (рис. 6.7).

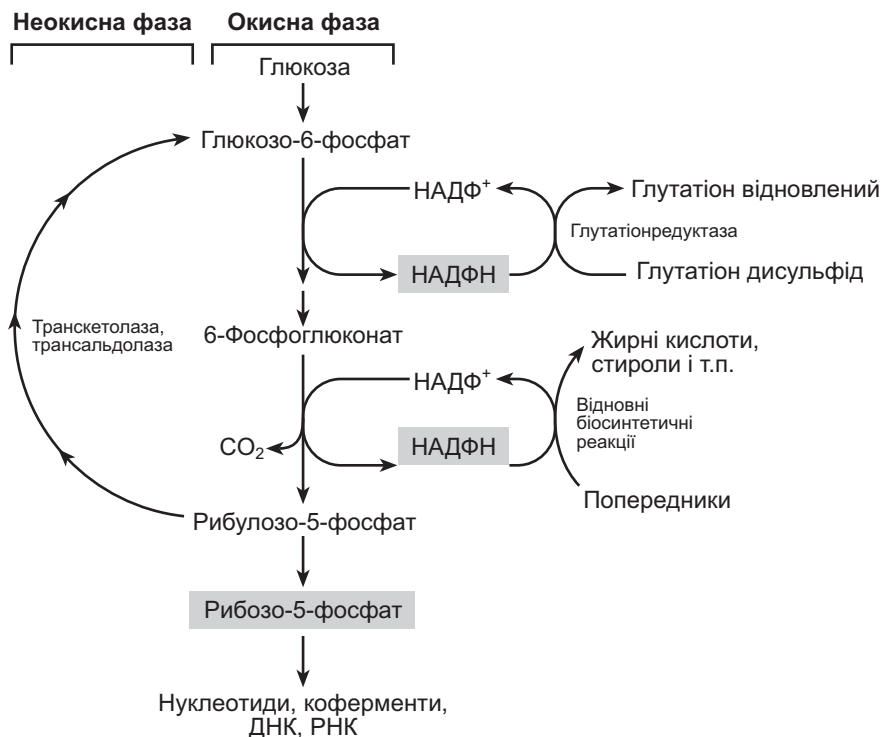


Рис. 6.7. Загальна схема пентозофосфатного шляху

НАДФН є відновником у майже усіх анаболічних реакціях. У ссавців ця функція НАДФН особливо виражена за інтенсивного синтезу жирних кислот чи стероїдів у молочних залозах, корі наднирників, печінці та жировій тканині. У цих тканинах НАДФН використовується для відновлення подвійних зв'язків і карбонільних груп у складі проміжних продуктів синтезу. У тканинах, де жирні кислоти синтезуються в незначній кількості (наприклад, у скелетних м'язах), пентозофосфатний шлях практично не функціонує.

Ще одна функція, яку виконує пентозофосфатний шлях, – це утворення пентоз, особливо D-рибози, необхідної для синтезу нуклеїнових кислот. Особливо висока швидкість біосинтезу нуклеїнових кислот притаманна тканинам, які ростуть і відновлюються, а також пухлинним тканинам.

Фермент глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа каталізує першу реакцію пентозофосфатного шляху – дегідрогенізацію глюкозо-6-фосфату з утворенням ефіру 6-фосфоглюконо-δ-лактону. Роль акцептора електронів у цій реакції виконує НАДФ⁺, і загальна рівновага зсунута у бік утворення НАДФН. Під дією специфічної лактонази відбувається гідролітичне розщеплення лактону до вільного 6-фосфоглюконату.

Потім фермент 6-фосфоглюконатдегідрогеназа дегідрогенізує та декарбоксілює 6-фосфоглюконат з утворенням D-рибулозо-5-фосфату. У цій реакції утворюється ще одна молекула НАДФН. Фермент фосфопентозоізомераза перетворює рибулозо-5-фосфат на альдозний ізомер D-рибозо-5-фосфат. У деяких тканинах пентозофосфатний шлях на цьому завершується, і тоді його сумарне рівняння має вигляд:



Кінцевими продуктами пентозофосфатного шляху є відновник НАДФН, необхідний для реакцій біосинтезу, та рибулозо-5-фосфат, попередник у реакціях синтезу нуклеотидів.

У тканинах, які насамперед використовують НАДФН, а не рибулозо-5-фосфат, утворені пентозофосфати знову перетворюються на глюкозо-6-фосфат за допомогою серії реакцій (рис. 6.7). Утворений глюкозо-6-фосфат може знову зазнавати окислення, яке супроводжується утворенням НАДФН. В еритроцитах утворений у пентозофосфатному циклі НАДФН відіграє важливу роль у відновленні глутатіонредуктазою окисленого глутатіону (рис. 6.7) для їхнього захисту від окисдативного стресу (див. розділ 12). Порушення функціонування глюкозо-6-фосфатдегідрогенази внаслідок генетичного дефекту супроводжується виникненням патологій.

Якщо концентрація НАДФН у клітині зростає через зниження його використання у біосинтетичних реакціях і реакціях відновлення глутатіону, то пригнічується активність першого ферменту пентозофосфатного шляху і у гліколізі надходить більша кількість глюкозо-6-фосфату.

Отже, альтернативним способом катаболізму глюкози є пентозофосфатний шлях, у ході якого відбувається окислення глюкози та її декарбоксилювання з утворенням НАДФН і пентозофосфатів. НАДФН, який характеризується високим відновлювальним потенціалом, необхідний для перебігу біосинтетичних реакцій, а пентозофосфати є попередниками у синтезі нуклеотидів і нуклеїнових кислот.

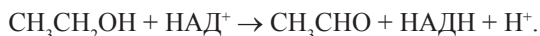
Підсумок 6. ГЛІКОЛІЗ ТА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ

- Гліколіз – це метаболічний шлях перетворення глюкози в цитозолі, у результаті якого з однієї молекули глюкози утворюється дві молекули пірувату, а енергія акумулюється у формі АТФ і НАДН.
- На підготовчій стадії гліколізу внаслідок фосфорилювання глюкози з використанням молекули АТФ утворюється глюкозо-6-фосфат. Друга молекула АТФ використовується для фосфорилювання фруктозо-6-фосфату з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату, який розщеплюється на дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату.
- На другій стадії гліколізу кожна молекула гліцеральдегід-3-фосфату окислюється, а вивільнена енергія акумулюється у формі двох молекул АТФ та однієї молекули НАДН.
- Активність ключових ферментів гліколізу гексокінази, фосфофруктокінази-1 і піруваткінази регулюється алостерично для забезпечення сталого надходження енергії та проміжних продуктів метаболізму.
- Глюкоза зберігається в організмі ссавців у формі глікогену. Від нього відщеплюється залишок глюкози з утворенням глюкозо-1-фосфату, який використовується далі у процесі гліколізу, що дає змогу “зекономити” одну молекулу АТФ.
- Глюконеогенез – це енергозатратний багатоступінчастий реципрокний до гліколізу процес перетворення на глюкозу пірувату, лактату, гліцеролу, глюкогенних амінокислот чи споріднених три- або чотирикарбонових сполук. Для утворення однієї молекули глюкози з пірувату потрібно чотири молекули АТФ, дві молекули ГТФ і дві молекули НАДН.
- Пентозофосфатний шлях забезпечує клітину НАДФН і пентозофосфатами. НАДФН, для якого характерний високий відновлювальний потенціал, необхідний для перебігу біосинтетичних реакцій, а пентозофосфати є попередниками у синтезі нуклеотидів і нуклеїнових кислот.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- 1. Енергетична вартість гліколізу та глюконеогенезу.** Якою є енергетична вартість (у еквівалентах АТФ) перетворення глюкози на піруват шляхом гліколізу та зворотного перетворення пірувату на глюкозу шляхом глюконеогенезу?
- 2. Рівень глюкози у крові й етанол.** Споживання алкоголю (етанолу), особливо після фізичного навантаження чи голодування, призводить до гіпоглікемії у крові. На першому етапі в печінці етанол окиснюється до ацетальдегіду:



Чому ця реакція пригнічує перетворення лактату на піруват? Чому таке пригнічення призводить до зниження рівня глюкози у крові?

- 3. Рівень лактату в плазмі крові під час фізичного навантаження** (наприклад, забігу на 400 м) зростає з 25 до 200 мкМ, а після припинення навантаження повільно знижується протягом 60 хв. Що є причиною швидкого підвищення концентрації лактату? Чому концентрація лактату знижується після припинення бігу? Чому зниження цього показника відбувається набагато повільніше, ніж його підвищення?
- 4. Надлишкове поглинання O_2 за глюконеогенезу.** За перетворення лактату на глюкозу в печінці витрачається шість молекул АТФ на кожну молекулу глюкози. Швидкість цього процесу у тварин можна оцінити, ввівши ^{14}C лактат і виміряти кількість утвореної ^{14}C глюкози. Знаючи стехіометрію спожитого O_2 й утвореного АТФ (п'ять молекул АТФ на одну молекулу кисню), можна розрахувати, наскільки вище норми зросте рівень споживання O_2 після введення відомої кількості лактату. Однак вимірювання надлишкової кількості кисню, використаного для синтезу глюкози з лактату, засвідчило, що насправді ця кількість є більшою, ніж розрахована на підставі стехіометричного співвідношення. Чому?
- 5. Взаємозв'язок між рівнем лактату у крові та фруктозо-1,6-дифосфатом.** У людей із генетичним дефектом ферменту фруктозо-1,6-дифосфатази рівень лактату в плазмі крові дуже високий. Чому?
- 6. Кінцевим продуктом пентозофосфатного циклу є:**
 - 1) рибозо-5-фосфат;
 - 2) піруват;
 - 3) гліоксалат;
 - 4) ацетил-КоА.
- 7. Які проміжні реакції гліколізу є енергозатратними і підтримуються енергією гідролізу АТФ?**
 - 1) фосфорилування глюкози до глюкозо-6-фосфату;
 - 2) фосфорилування фруктозо-6-фосфату з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату;
 - 3) окислення гліцеральдегід-3-фосфату до 1,3-дифосфогліцерату;
 - 4) перетворення фосфоенолпірувату на піруват.
- 8. Які ферменти гліколізу каталізують реакції, що відбуваються зі зберіганням енергії у формі АТФ?**

- 1) гексокіназа;
- 2) фосфофруктокіназа;
- 3) фосфогліцераткіназа;
- 4) піруваткіназа.

9. У сумарному процесі гліколізу утворюється:

- 1) дві молекули АТФ;
- 2) тридцять дві молекули АТФ;
- 3) дві молекули пірувату;
- 4) дві молекули НАДН.

10. Ці фермент і катіон активують глюкозу через її фосфорилювання у положенні С-6 з утворенням глюкозо-6-фосфату:

- 1) гексокіназа і Mg^{2+} ;
- 2) гексокіназа і Ca^{2+} ;
- 3) фосфофруктокіназа і Mg^{2+} ;
- 4) гліцеральдегід-трифосфат-дегідрогеназа і Mn^{2+} .



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Нельсон Д.Л., Кокс М.М.* Основи біохімії за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
- Barańska J., Dżugaj A., Kwiatkowska-Korczak J.* Życie i tragiczna śmierć Jakuba Karola Parnasa, wybitnego polskiego biochemika, współodkrywcy glikolizy // *Problemy Nauk Biologicznych.* – 2008. – Vol. 57, N 1–2. – P. 1–17.
- Harris A.L.* Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2. – P. 38–47.
- Lane A.N., Fan T.W., Higashi R.M.* Metabolic acidosis and the importance of balanced equations // *Metabolomics.* – 2009. – Vol. 5, N 2. – P. 163–165.
- Parnas J.K., Ostern P., Mann T.* Linkage of chemical changes in muscle // *Nature (London).* – 1934. – Vol. 134. – P. 1007.
- Romano A.H., Conway T.* Evolution of carbohydrate metabolic pathways // *Res. Microbiol.* – 1996. – Vol. 147, N 6–7. – P. 448–455.
- Sznol S.* Akademik Jakub Karol Parnas // *Herosi, gangsterzy, konformiści.* Warszawa: Bellona Press, 2004. – P. 296–312.
- van Schaftingen E., Gerin I.* The glucose-6-phosphatase system // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 362, Pt. 3. – P. 513–532.

ЕНЕРГЕТИКА ЖИРОВОГО ОБМІНУ

- Жирні кислоти і триацилгліцероли
- Активація і транспорт жирних кислот
- β -Окиснення жирних кислот
- Енергетична цінність окиснення жирних кислот
- Кетонів тіла

Окиснення жирних кислот до ацетил-КоА забезпечує енергетичні потреби багатьох тканин. За їхнього окиснення електрони відщеплюються та потрапляють у дихальний ланцюг мітохондрій, і таким чином жирні кислоти забезпечують енергією синтез АТФ. У печінці та серці цей процес постачає до 80 % необхідної енергії для клітин за будь-яких фізіологічних умов.

7.1. ЖИРНІ КИСЛОТИ І ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛИ

Жирні кислоти – це органічні сполуки, що складаються з аліфатичного ланцюга, завдовжки до 36 атомів карбону і з карбоксильною групою ($-\text{COOH}$) на одному кінці. Ковалентні зв'язки між атомами карбону можуть бути одинарні або подвійні. Аліфатичні ланцюги, які містять тільки одинарні зв'язки, мають максимальну кількість атомів гідрогену, тому їх називають **насиченими** (наприклад, у міристиновій, стеариновій і пальмітиновій кислотах). Ланцюги з одним подвійним зв'язком називають **ненасиченими** (у олеїновій чи пальмітолеїновій кислотах), а з двома і більше (розташовані, як правило, в молекулі через одну CH_2 -групу) – **поліненасиченими** (у лінолевій, ліноленовій і арахідоновій кислотах). За довжиною аліфатичного ланцюга розрізняють кілька груп жирних кислот.

Найпоширенішими харчовими жирами є **триацилгліцероли**. Кожна молекула триацилгліцеролу має основу у вигляді триатомного спирту гліцеролу

з приєднаними трьома жирними кислотами. Останні можуть відрізнятися довжиною ланцюга та кількістю подвійних зв'язків. Ліпази шлунково-кишкового тракту гідролізують триацилгліцероли до діацилгліцеролів, моноацилгліцеролів, вільних жирних кислот і гліцеролу. Продукти гідролізу всмоктуються клітинами епітелію тонкого кишечника, де з них знову синтезуються триацилгліцероли, які транспортуються до м'язів, жирової тканини та печінки. У цих органах відбувається розщеплення триацилгліцеролів (до жирних кислот і гліцеролу) та ресинтез специфічних для організму триацилгліцеролів. За потреби жирні кислоти окислюються у печінці та м'язах для забезпечення енергетичних потреб клітини. Гліцерол залучається до гліколізу, перетворюючись на діоксіацетонфосфат за допомогою двох ферментів – гліцеролкінази та гліцеролфосфатдегідрогенази.

Жирні кислоти, які у розчині мають властивості детергента, транспортуються плазмою крові в комплексі з альбуміном, який синтезується у печінці. Спеціальні білки, зокрема **CD36**, забезпечують транспорт жирних кислот у клітину. Цей мембранний білок є експресований на поверхні клітин кількох типів, особливо макрофагів, і належить до скевенджер-рецепторів¹ класу В. Він є важливим компонентом системи вродженого імунітету, зокрема, забезпечує виявлення еритроцитів, заражених паразитичним *Plasmodium falciparum*. CD36 зв'язується з окисленими ліпопротеїнами низької щільності, фосфоліпідами та жирними кислотами. Крім цього, CD36, експресований на поверхні епітелію смакових сосочків язика, слугує рецептором, що зв'язує жирні кислоти їжі та бере участь у формуванні “смаку жиру”.

7.2. АКТИВАЦІЯ І ТРАНСПОРТ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Перш ніж бути залученими у процес окисного метаболізму, жирні кислоти мають бути активовані через естерифікацію до ацил-КоА (естер жирної кислоти і коферменту А) ацил-КоА-синтазою (тіокіназою). Це фермент, асоційований з ендоплазматичним ретикуломом і зовнішньою мембраною мітохондрій. Є кілька ізоферментів ацил-КоА-синтази, специфічних до жирних кислот з різною довжиною ацильного ланцюжка.

Процес естерифікації довголанцюгових жирних кислот є АТФ-залежним і відбувається у два етапи (рис. 7.1).

Двоетапну естерифікацію жирних кислот каталізує ацил-КоА-синтаза, яка в АТФ-залежному процесі активує довголанцюгові жирні кислоти з утворенням ацил-КоА.

¹ Група рецепторів до окислених або ацетильованих ліпопротеїнів низької щільності

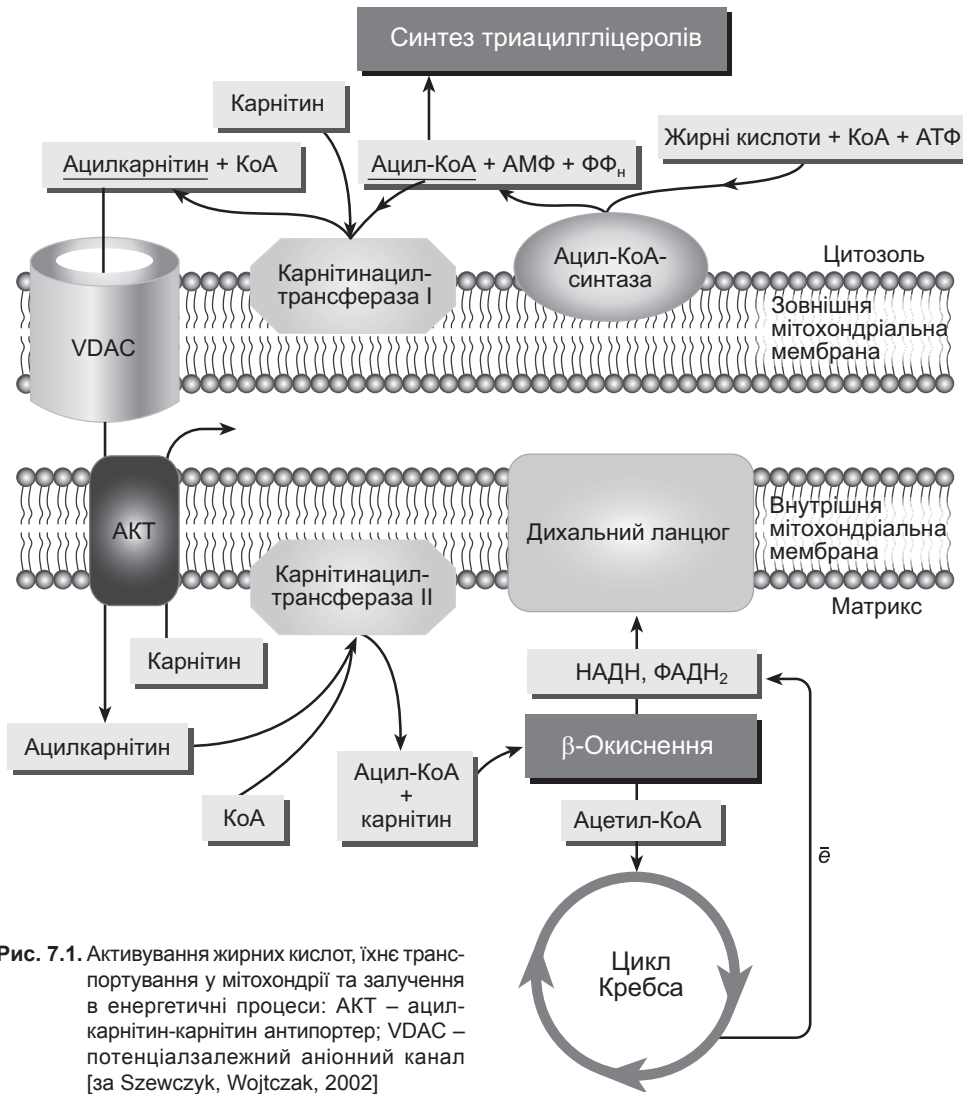
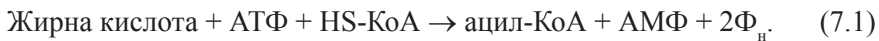


Рис. 7.1. Активування жирних кислот, їхнє транспортування у мітохондрії та залучення в енергетичні процеси: АКТ – ацилкарнітин-карнітин антипортер; VDAC – потенціалзалежний аніонний канал [за Szewczyk, Wojtczak, 2002]

Сумарна реакція активування жирних кислот має такий вигляд:



Продукт цієї реакції – ацил-КоА містить один “високоенергетичний” тиольний зв’язок¹. Спочатку від молекули АТФ протягом активації жирних кислот відщеплюється $\text{ФФ}_{\text{н}}$. Гідроліз екзергонічного зв’язку $\text{ФФ}_{\text{н}}$ ($\text{Ф} \sim \text{Ф}$), що каталізується пірофосфатазою, робить цю спряжену (з утворенням ациладенілату) реакцію спонтанною.

¹ Цей зв’язок утворює сульфгідрильна група (-SH) із залишком жирної кислоти (ацил-КоА) або ацетильною групою (ацетил-КоА). Тому кофермент А інколи представляють як KoA-SH

Утворений у цитоплазмі ацил-КоА може легко проникати крізь зовнішню мембрану мітохондрій, використовуючи великі VDAC-канали. Однак внутрішня мембрана мітохондрій непроникна для ацил-КоА. Тому жирна кислота транспортується в матрикс мітохондрій у вигляді ацилкарнітину, який синтезується розміщеною у зовнішній мембрані карнітин-ацилтрансферазою I.

Для спряженого транспорту ацил-КоА крізь внутрішню мембрану мітохондрій необхідні карнітин і карнітин-ацилтрансфераза I.

L-Карнітин (вітамін B₁₁) – це амінокислота, подібна за будовою до вітамінів групи B, але, на відміну від них, синтезується в організмі. Біосинтез карнітину в організмі відбувається у печінці та нирках, звідки транспортується в інші органи і тканини, зокрема, у скелетні м'язи. Для цього біосинтезу необхідні вітаміни C, B₃, B₆, B₉, B₁₂, ферум, лізин, метіонін і низка ферментів. За дефіциту бодай однієї із цих речовин розвивається недостатність карнітину.

Карнітин залучений у важливі метаболічні процеси. Зокрема, він забезпечує підтримання фізіологічного рівня КоА у клітинах, тому його використовують для корекції метаболічних процесів. Він має анаболічну, антигіпоксічну й антиуреїдну дію, а також активує жировий обмін, стимулює регенерацію тканин і підвищує апетит.

Карнітин-опосередковане перенесення жирних кислот у мітохондрії включає три етапи (див. рис. 7.1):

Етап 1. Карнітин-ацилтрансфераза I асоційована із зовнішньою мітохондріальною мембраною і каталізує перенесення жирних кислот від ацил-КоА на гідроксилкарнітин з утворенням ацилкарнітину.

Етап 2. Антипортер ацилкарнітин / карнітин у внутрішній мембрані мітохондрій опосередковує трансмембранний обмін молекули ацилкарнітину на молекулу карнітину.

Етап 3. У мітохондріальному матриксі карнітин-ацилтрансфераза II каталізує перенесення жирної кислоти від ацилкарнітину на КоА і знову утворюється ацил-КоА.

Контроль окислення жирних кислот здійснюється переважно на етапі транспортування їх до мітохондрій (рис. 7.2).

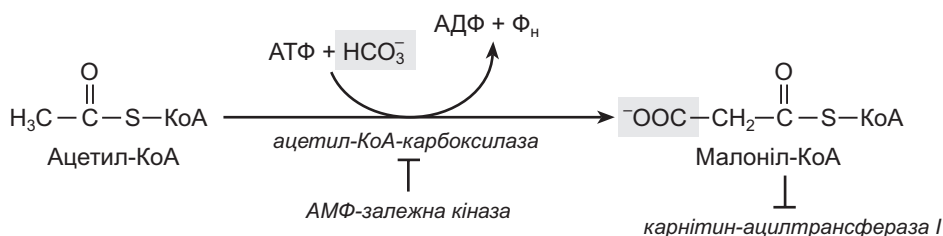


Рис. 7.2. Контроль окислення жирних кислот

Процес транспорту жирних кислот у мітохондрії контролює АМФ-залежна кінза (АМФК) через зміну рівня проміжного продукту синтезу жирних кислот – малоніл-КоА (див. рис. 7.2). Ацетил-КоА-карбоксилаза каталізує його утворення з ацетил-КоА. Малоніл-КоА інгібує карнітин-ацилтрансферазу I, що порушує транспортування жирних кислот у матрикс мітохондрій. У свою чергу, фосфорилування ацетил-КоА карбоксилази АМФ-залежною кінзаю інгібує її, що призводить до зменшення продукції малоніл-КоА.

АМФ-залежна кінза – це сенсор енергетичного рівня у клітині, що алостерично активується за збільшення співвідношення АМФ/АТФ, зокрема, за дефіциту глюкози, гіпоксії та ішемії (див. підрозділ 4.4). Зниження рівня малоніл-КоА, за зростання АМФ, активує карнітин-ацилтрансферазу I, унаслідок чого зростає транспорт жирних кислот у мітохондрії, генерування ацетил-КоА і його входження у цикл Кребса з подальшим утворенням АТФ.

7.3. β -ОКИСНЕННЯ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Жирні кислоти розщеплюються в мітохондріальному матриксі у процесі β -окиснення (рис. 7.3). Більшість ферментів цього процесу є специфічними до довжини жирної кислоти. Багато з них є розчинними білками мітохондріального матриксу, але ті ферменти, що розщеплюють дуже довгі жирні кислоти, прикріплені до внутрішньої мембрани мітохондрій.

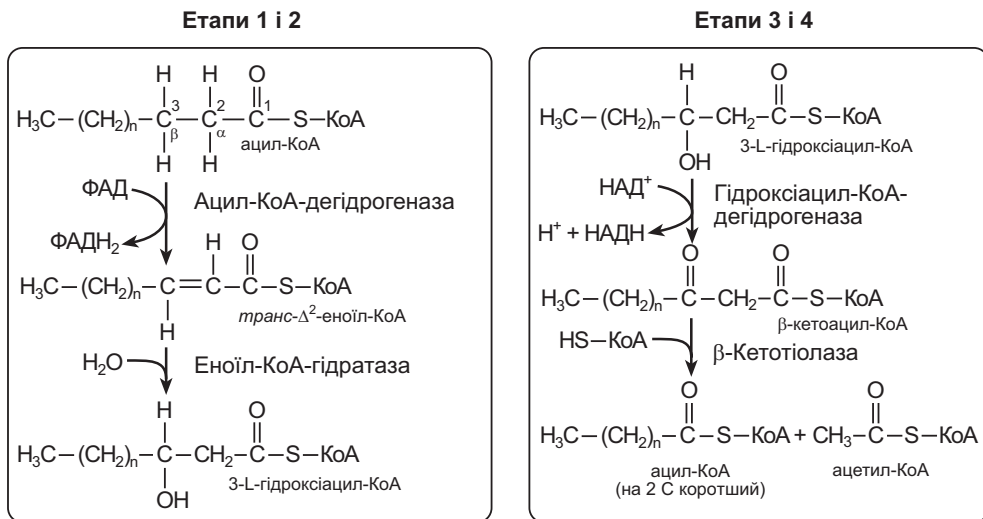


Рис. 7.3. β -Окиснення жирних кислот

β -Окиснення жирних кислот відбувається в матриксі мітохондрій у чотири етапи і закінчується утворенням вкороченого на два карбони ацил-КоА, FADH_2 , NADH , ацетил-КоА і H^+ .

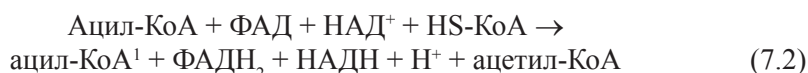
Е т а п 1. Ацил-КоА-дегідрогеназа каталізує окислення жирнокислотного залишку ацил-КоА, що зумовлює утворення подвійного зв'язку між другим і третім карбоном, причому у *транс*-конфігурації. Є три ізоферменти ацил-КоА-дегідрогенази, кожен з яких виявляє специфічність до жирних кислот з ланцюгом певної довжини. Акцептором електронів для всіх цих ізоферментів ацил-КоА-дегідрогенази є простетична група ФАД. Відновлена дегідрогеназа віддає свої електрони електронтранспортувальному флавопротеїну (ЕТФ), а далі – до КоQ в дихальному ланцюгу мітохондрій (див. розд. 10).

Е т а п 2. Еноіл-КоА-гідратаза каталізує стереоспецифічну гідратацію подвійного зв'язку між другим і третім карбоном жирнокислотного залишку з утворенням L-гідроксіацил-КоА.

Е т а п 3. Гідроксіацил-КоА-дегідрогеназа каталізує окислення гідроксіацил КоА у β -позиції (С3) до β -кетואцил-КоА, а НАД⁺ слугує акцептором електронів. Відновлений НАДН віддає електрони НАДН-дегідрогеназі.

Е т а п 4. Ацил-КоА-ацетилтрансфераза (β -кетотіолаза, β -кетואцил-КоА-тіолаза) взаємодіє з молекулою вільного КоА, внаслідок чого від карбоксильного кінця вихідної жирної кислоти відщеплюється ацетил-КоА.

Сумарна реакція одного циклу β -окислення має такий вигляд:



Утворений ацетил-КоА окислюється у циклі Кребса. β -Окиснення жирних кислот – це багатократний циклічний процес, тому що ацил-КоА, вкорочений на два карбони, знову залучається у процес окиснення. В останньому циклі з бутирил-КоА (чотирикарбонової сполуки) утворюється дві молекули ацетил-КоА.

Окиснення ненасичених жирних кислот подібне до окиснення насичених, але має свої особливості. Подвійні зв'язки природних ненасичених жирних кислот мають *цис*-конфігурацію, а на першому етапі β -окиснення утворюються проміжні сполуки, в яких жирнокислотний залишок містить подвійний зв'язок у *транс*-конфігурації. Тому еноіл-КоА-гідратаза не може каталізувати наступну реакцію β -окиснення ненасичених жирних кислот. Якщо проміжне ацил-КоА-вмісне похідне ненасиченої жирної кислоти містить подвійний зв'язок у *цис*-конфігурації між С3 і С4, то ***цис*- Δ^3 -еноіл-КоА-ізомераза** забезпечує конвертування цього зв'язку у *транс*-конфігурацію між С2 і С3. Утворена сполука далі включається у третій етап β -окиснення.

Ще один фермент – **2,4-діеноіл-КоА-редуктаза**, використовуючи протони від НАДФН і зі середовища, гідрогенізує 2,4-діеноіл-похідне коферменту А ненасиченої жирної кислоти (містить подвійні зв'язки між карбонами С4 і С5 у *цис*-конфігурації та С2 і С3 – у *транс*-конфігурації) з утворенням еноіл-похідного коферменту А з подвійним зв'язком між С3 і С4. Утворена сполука далі

¹ Цей ацил-КоА є вкороченим на два карбони щодо попереднього

ізомеризується *цис*- Δ^3 -еноїл-КоА-ізомеразою (див. вище) і включається у третій етап β -окиснення. Отже, окиснення поліненасичених жирних кислот (лінолевої, ліноленової й арахідонової) потребує додаткових затрат енергії у вигляді НАДФН.

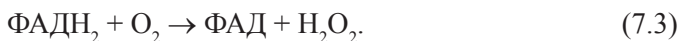
β -Окиснення дуже довгих жирних кислот відбувається також у **пероксисомах**. Пероксисома – це органела, яка притаманна більшості еукаріотичних клітин і містить приблизно 50 ферментів, що каталізують окисдаційні реакції. Зокрема, ферменти необхідні для забезпечення β - і α -окиснення¹ жирних кислот, амінокислот; біосинтезу холестеролу, плазмалогену, жовчних кислот, поліненасичених жирних кислот. Транспорт жирних кислот з пероксисом відбувається за участю карнітину.

У клітинних органелах пероксисомах також відбувається окиснення жирних кислот з утворенням ацетил-КоА, НАДН і H_2O_2 .

Пероксисоми беруть участь у клітинному диханні. Вони споживають кисень у процесі окиснення різних класів жирних кислот.

Морфологічно пероксисоми є дуже різноманітними. Вони можуть мати вигляд ізольованих сферичних тілець, трубочок або навіть тісно переплетеного ретикулуму. Морфологія пероксисом може змінюватися залежно від умов зовнішнього середовища. Пероксисома оточена однією ліпідною мембраною. Ферменти матриксу пероксисом часто кристалізуються. Пероксисома, на відміну від мітохондрій, не містить ДНК. Білки, що входять до складу пероксисом, кодуються ядерними генами.

Пероксисомальна система β -окиснення відрізняється від мітохондріальної за двома ознаками. Зокрема, на першому етапі окиснення електрони передаються безпосередньо на O_2 з утворенням H_2O_2 . ФАД є акцептором електронів для пероксисомальної ацил-КоА-оксидази, яка каталізує перший етап окиснення. Внаслідок ФАДН₂ реоксигенується у пероксисомі, утворюючи гідроген пероксид:



Пероксисомальний фермент каталаза розщеплює H_2O_2 (див. розділ 12):



Другою особливістю β -окиснення жирних кислот у пероксисомах є те, що утворений у них НАДН не може знову окиснюватися, тому відновні еквіваленти надходять у цитозоль і далі в мітохондрії. Утворений у пероксисомах ацетил-КоА також транспортується у цитозоль.

¹ Послідовне відщеплення однокарбонових фрагментів від карбоксильного кінця жирної кислоти, яке не супроводжується синтезом макроергічних сполук

7.4. ЕНЕРГЕТИЧНА ЦІННІСТЬ ОКИСНЕННЯ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Енергетичну цінність β -окиснення жирних кислот проілюстровано на рис. 7.4 на прикладі каприлової кислоти (C8). Унаслідок повного β -окиснення цієї кислоти утворюються чотири молекули ацетил-КоА, а також чотири молекули ФАДН₂ і чотири молекули НАДН, що еквівалентне вивільненню 12 електронів. Кожна з чотирьох молекул ацетил-КоА залучається у цикл Кребса, де далі з них продукується чотири молекули АТФ і вивільняється 32 електрони, які відновлюють НАД⁺ та ФАД⁺.

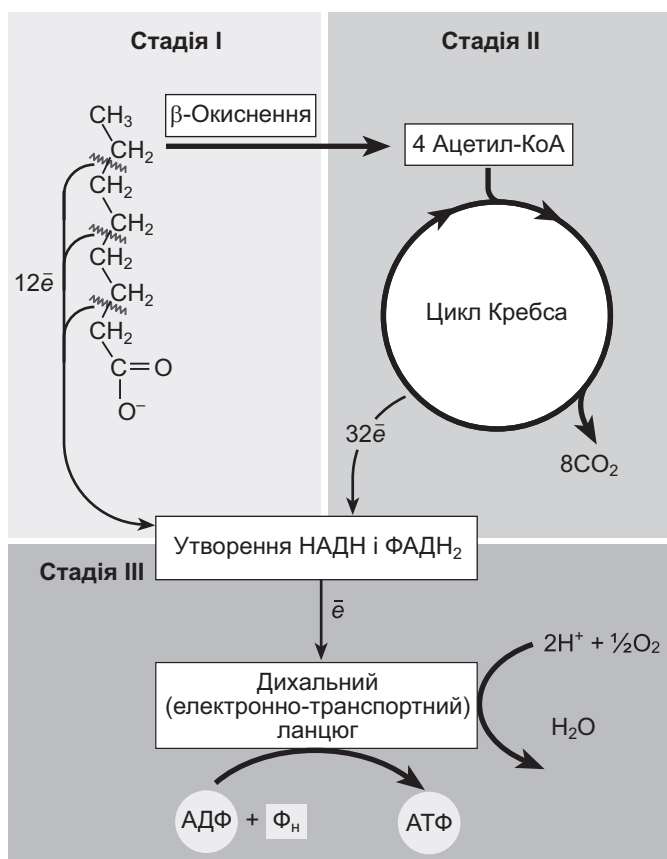


Рис. 7.4. Стадії окиснення каприлової кислоти. Стадія I: жирна кислота окиснюється з утворенням ацетил-КоА. Стадія II: ацетильні групи окиснюються до CO₂ у циклі Кребса. Стадія III: електрони, відщеплені на попередніх стадіях, переміщуються в дихальний ланцюг мітохондрій і постачають енергію для синтезу АТФ

Простетична група ФАДН₂ ферменту ацил-КоА-дегідрогенази на першому етапі β -окиснення окислюється, транспортуючи 2ē до коферменту Q у дихальному ланцюгу. Транспорт пари електронів від коферменту Q до кисню зумовлює

вихід протонів, що забезпечує синтез $\sim 1,5$ молекули АТФ на одну пару електронів. НАДН, утворена на третьому етапі β -окиснення, окислюється, транспортуючи $2e^-$ до першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій. Транспорт електронів від НАДН до кисню викликає вихід протонів із мітохондрій, що забезпечує синтез $\sim 2,5$ молекул АТФ на одну пару електронів. Енергетичну цінність β -окиснення пальмітоїлової кислоти наведено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Енергетична цінність повного окиснення однієї молекули пальмітоїл-КоА до CO_2 і води

Фермент	Кількість відновлених молекул ФАД чи НАД	Еквівалентна кількість молекул АТФ
Ацил-КоА-дегідрогеназа	7ФАДН ₂	10,5
β -Гідроксіацил-КоА-дегідрогеназа	7НАДН	17,5
Ізоцитратдегідрогеназа	8НАДН	20
α -Кетоглутаратдегідрогеназа	8НАДН	10,5
Сукциніл-КоА-синтаза		8
Сукцинатдегідрогеназа	8ФАДН ₂	12
Малатдегідрогеназа	8НАДН	20
Усього		108

7.5. КЕТОНОВІ ТІЛА

Протягом голодування чи вуглеводного виснаження рівень оксалоацетату в печінці є знижений, оскільки він використовується у гліоконеогенезі (рис. 7.5). Це заважає входженню ацетил-КоА у цикл Кребса. Тоді ацетил-КоА перетворюється в мітохондріях на кетонові тіла¹: ацетон, ацетоацетат і β -оксибутират. Ацетоацетат і β -оксибутират можуть використовуватись як енергетичні субстрати, але не у печінці.

За певних патологічних станів чи виснаження організму енергія ацетил-КоА може зберігатись у формі кетонових тіл (ацетон, ацетоацетат чи β -оксибутират) і використовуватись у різних органах (за винятком печінки) як енергетичний субстрат.

У це перетворення залучені три ферменти.

1. **β -Кетотіолаза** конденсує дві молекули ацетил-КоА з утворенням ацетоацетил-КоА і вільного КоА.

¹ Термін “тіла”, який інколи використовують для позначення нерозчинних часток, не є зовсім адекватним щодо кетонів, які повністю розчиняються у крові та сечі

2. **Гідроксиметилглутарил-КоА-синтаза** каталізує конденсацію третього ацетатного залишка (із ацетил-КоА) з ацетоацетил-КоА, утворюючи гідроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА).
3. **Гідроксиметилглутарил-КоА-ліаза** розщеплює гідроксиметилглутарил-КоА, утворюючи ацетоацетат і ацетил-КоА.

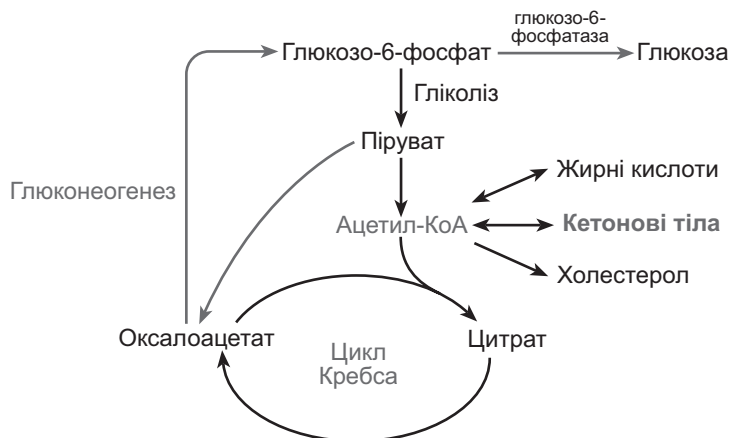
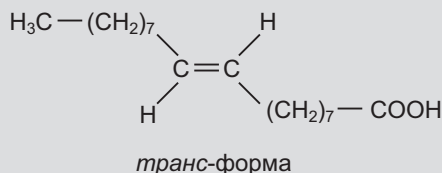
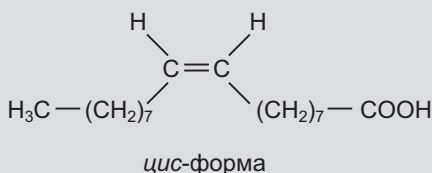


Рис. 7.5. Умови утворення кетонів тіл (детальніше про глюконеогенез на рис. 6.6)

Транс-ізомери жирних кислот (*транс*-жири) – один із видів ненасичених жирних кислот, що містять *транс*-подвійні зв'язки між атомами карбону. В *цис*-подвійного зв'язку два атоми карбону на ділянці $\text{CH} = \text{CH}$ перебувають по один бік щодо карбон-карбонового зв'язку.

Олеїнова кислота



β -Гідроксибутиратдегідрогеназа каталізує взаємне перетворення ацетоацетату і β -гідроксибутирату. Кетонів тіла переносяться кров'ю до інших тканин, де вони перетворюються на ацетил-КоА з подальшим використанням у циклі Кребса, а відтак і для синтезу АТФ. Якщо за умов гіпоглікемії кетонів тіла використовуються як альтернативне джерело енергії, тоді мають розщеплюватися для підтримання глюконеогенезу амінокислоти, оскільки ацетат не може бути перетворений на глюкозу.

Надмірне утворення кетонів тіл призводить до кетозу й ацидозу, які супроводжують багато патологічних станів, наприклад, цукровий діабет, голодування, лихоманку та ін.

У *транс*-подвійного зв'язку атоми гідрогену розташовані по діагоналі на протилежних боках від подвійного зв'язку. Природні *транс*-ізомери утворюються у шлунку жуйних тварин бактеріями і навіть потрапляють у молоко корів чи кіз. Менш здорові штучні *транс*-ізомери жирних кислот утворюються за гідрогенізації олій, обсмажування з кулінарними та кондитерськими жирами. За 24 години обсмажування харчових продуктів рівень *транс*-ізомерів жирних кислот зростає з 5 до 32,5 % [Пономарьов, 2009]. В Україні середнє споживання *транс*-ізомерів жирних кислот становить від 2,7 до 12,8 г/добу. Вчені рекомендують зменшити їхнє споживання до 2 г/добу. У США виробники зобов'язані вказувати вміст *транс*-жирів у продуктах харчування.

Останні десятиліття ведеться жвава дискусія про можливий патологічний вплив *транс*-жирів на здоров'я людини, зокрема, на підвищення рівня холестеролу, збільшення концентрації ліпопротеїдів низької щільності й атеросклерозу кровоносних судин.



Вважають, що *транс*-ізомери жирних кислот можуть бути причетні до розвитку діабету, порушення обміну простагландинів, зниження імунітету й активності тестостерону, неопластичних перетворень [Willett, 2005]. Поряд із цим, у Шотландії, де населення особливо схильне до ранньої смертності від серцево-судинних захворювань, не було виявлено жодного зв'язку між цією патологією та споживанням *транс*-ненасичених жирних кислот.

Підсумок 8. ЕНЕРГЕТИКА ЖИРОВОГО ОБМІНУ

- Довголанцюгові жирні кислоти взаємодіють із коферментом А в АТФ-залежному процесі, який каталізує синтаза довголанцюгових ацил-КоА, локалізована у зовнішній мембрані мітохондрій.
- Ацил-КоА перетворюється на ацилкарнітин за допомогою карнітин-ацилтрансферази I, що розташована в зовнішній мембрані мітохондрій з боку цитоплазми. Ацилкарнітин проникає крізь внутрішню мембрану мітохондрій (в обмін на карнітин) за допомогою карнітин/ацилкарнітин транслокази.
- У матриксі ацилкарнітин перетворюється карнітин-ацилтрансферазою II на ацил-КоА, який далі включається у багатоступінчастий процес мітохондріального β -окиснення. Кінцевий продукт цього

процесу ацетил-КоА метаболізується до H_2O і CO_2 у циклі Кребса. Водночас відновлені у процесі β -окиснення НАДН і ФАДН₂ передають відновлювальні еквіваленти в дихальний ланцюг.

- Окрім мітохондрій, окиснення жирних кислот також відбувається і у клітинних органелах пероксисомах.
- Ацил-КоА, що не був перетворений на ацетилкарнітин і метаболізований у процесі β -окиснення, використовується поза межами мітохондрій для синтезу фосфоліпідів і триацилгліцеролів.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Запаси палива в жировій тканині.** Триацилгліцероли, у складі яких є залишки жирних кислот, мають найвищий серед усіх поживних речовин запас енергії.
А) У дорослої людини масою 70 кг на триацилгліцероли припадає 15 % маси тіла. Розрахуйте (у кДж) загальний доступний запас енергії, що міститься в організмі у формі триацилгліцеролів.
Б) Як довго може прожити людина, якщо єдиним джерелом енергії для неї є жирні кислоти, що містяться у складі триацилгліцеролів, а добова енергетична потреба становить у середньому 8 400 кДж?
- Енергія, що міститься у тригліцеридах.** Яка частина молекули триацилгліцеролів містить більше біологічно доступної енергії в розрахунку на один атом карбону: залишки жирних кислот чи залишки ацилгліцеролу? Чому?
- Способи генерування енергії у птахів.** У табл. 7.2 наведено максимальну активність ($V_{\text{макс}}$) деяких ферментів грудних м'язів голуба та фазана.

Таблиця 7.2

Фермент	$V_{\text{макс}}$ мкМ субстратів / хв × г тканини	
	голуб	фазан
Гексокіназа	3, 00	2,30
Глікогенфосфорилаза	18, 0	120
Фосфофруктокіназа-1	24,0	143
Цитратсинтаза	100	15,0
Триацилгліцеролліпаза	0,07	0,01

- Проаналізуйте відносне значення інтенсивності метаболізму глікогену та метаболізму жирів за утворення АТФ.
- Порівняйте споживання кисню цими птахами.
- На підставі наведених даних зробіть висновок, який із птахів більше пристосований до дальніх перельотів?
- Чому для порівняння вибрано саме ці ферменти? Чи можна обрати для такого порівняння тріозофосфатізомерази і малатдегідрогенази?

4. Дієта збагачена жирами та позбавлена вуглеводів. Уявіть дієту на китовому чи тюленьячому жирі й позбавлену вуглеводів. Як вплине брак вуглеводів на використання жирних кислот? Якщо раціон повністю позбавлений вуглеводів, то які жирні кислоти було б вигідніше споживати – з парною чи непарною кількістю атомів?

5. Перш ніж бути залученими у процес окисного метаболізму, жирні кислоти мають бути естерифіковані до:

- 1) КоА;
- 2) триацилгліцеролу;
- 3) кардіоліпіну;
- 4) гліцеролу.

6. Який процес описує реакція:

$\text{Жировий ацил-КоА} + \text{ФАД}^+ + \text{НАД}^+ + \text{HS-КоА} \rightarrow$
 жировий ацил-КоА (вкорочений на 2С) + $\text{ФАДН}_2 + \text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{ацетил-КоА}$?

- 1) β -окиснення жирних кислот;
- 2) розщеплення триацилгліцеролів;
- 3) окиснення кетонів тїл;
- 4) контроль окислення карнітину.

7. Вибрати правильну послідовність чотирьох етапів β -окиснення жирних кислот, що каталізуються такими ферментами:

- 1) Ацил-КоА дегідрогеназа \rightarrow еноїл-КоА гідратаза \rightarrow гідроксіацил-КоА дегідрогеназа \rightarrow β -кетотіолаза;
- 2) β -Кетотіолаза \rightarrow еноїл-КоА гідратаза \rightarrow гідроксіацил-КоА дегідрогеназа \rightarrow ацил-КоА дегідрогеназа;
- 3) Еноїл-КоА гідратаза \rightarrow ацил-КоА дегідрогеназа \rightarrow гідроксіацил-КоА дегідрогеназа \rightarrow β -кетотіолаза.

8. Із наведеного переліку вибрати кетонів тїла:

- 1) оксалоацетат;
- 2) ацетил-КоА;
- 3) ацетоацетат;
- 4) β -оксибутират.

9. Вибрати морфологічні ознаки, характерні для пероксисом:

- 1) оточені однією ліпідною мембраною;
- 2) мають власну ДНК;
- 3) одним із продуктів β -окиснення довгих жирних кислот є H_2O_2 ;
- 4) ФАД є акцептором електронів для пероксисомальної ацил-КоА-оксидази;
- 5) мають усі ферменти, необхідні для β - й α -окиснення жирних кислот.

10. Кетонів тїла утворюються за:

- 1) голодування;
- 2) карбогідратного виснаження;
- 3) висококалорійної їжі;
- 4) впливу адреналіну.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Ластухін Ю.О.* Хімія природних органічних сполук. – Львів: Національний університет “Львівська політехніка”, 2005. – 506 с.
- Нельсон Д.Л., Кокс М.М.* Основи біохімії за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.
- Пономарьов П.Х.* Потенційна небезпечність швидкої їжі // Вісник Львівської комерційної академії. Наукова періодика України. – 2009. – Вип. 10. – С. 1–5.
- Albert B.* Molecular Biology of the Cell. – New York: Garland Pub., 1994. – 67 p.
- Lampe M.A., Burlingame A.L., Whitney J. et al.* Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations // J. Lipid Res. – 1983. – Vol. 24. – P. 120–130.
- Steiber A., Kerner J., Hoppel C.* Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective // Mol. Aspects Med. – 2004. – Vol. 25, N 5–6. – P. 455–473.
- Szewczyk A., Wojtczak L.* Mitochondria as a pharmacological target // Pharmacol. Rev. – 2002. – Vol. 54, N 1. – P. 101–127.
- Titorenko V.I., Rachubinski R.A.* The life cycle of the peroxisome // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2001. – Vol. 2, N 5. – P. 357–368.
- Willett W.* Eat, Drink, and be Healthy: The Harvard Medical School Guide to Healthy Eating. – Harvard: A Harvard Medical School Book, 2005. – 348 p.

КАТАБОЛІЗМ БІЛКІВ І АМІНОКИСЛОТ

- Катаболізм і структура амінокислот
- Катаболізм амінокислот
- Використання амінокислот у полярографічних і ЯМР дослідженнях

Білки – важлива частина харчування тварин і людини, оскільки ці організми не можуть синтезувати повний набір амінокислот і повинні отримувати частину з них із білковою їжею. У процесі травлення протеолітичні ферменти розщеплюють спожиті білки, розкладаючи їх до амінокислот, які використовуються у біосинтезі білків організму або піддаються подальшому розщепленню для отримання енергії. На узагальненій схемі енергетичного метаболізму (див. рис. 6.1) зазначено тільки перетворення білків на ацетил-КоА, але насправді амінокислоти можуть бути залучені в біоенергетичні процеси й іншими способами.

Окисне розщеплення амінокислот відбувається у кілька етапів. Для енергетичних потреб використовують амінокислоти, не залучені у синтез протеїнів. З огляду на те, що амінокислоти не зберігаються в організмі понад норму, надлишок амінокислот, які надходять із їжею, розщеплюється. У разі голодування чи неконтрольованого діабету, коли вуглеводи не надходять чи не утилізуються, клітинні білки також стають паливом. Цікаво, що хижаки на 90 % покривають свої енергетичні потреби відразу після вдалого полювання завдяки білкам. У рослиноїдних тварин роль білків як джерела енергії є незначною.

У ссавців, як видно зі схеми катаболізму амінокислот (рис. 8.1), їхні аміногрупи та карбонові скелети метаболізуються окремими, але взаємопов'язаними шляхами. У процесі катаболізму від амінокислот відщеплюються аміногрупи, які в подальшому використовуються у біосинтетичних процесах інших амінокислот, нуклеотидів і біогенних амінів або надходять у вигляді карбамоїлфосфату в цикл сечовини. Карбоновий скелет перетворюється на α -кетокислоти, які потім окиснюються до CO_2 і H_2O або перетворюються на три- чи чотирикарбонові структури глюконеогенезу для утворення глюкози.

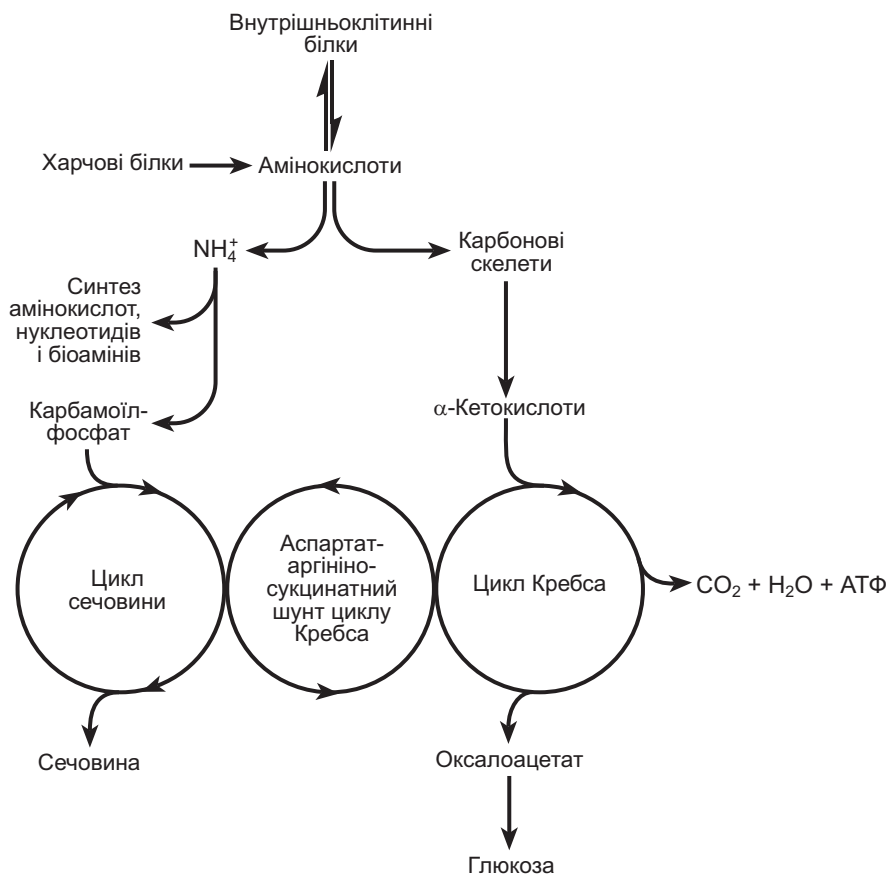


Рис. 8.1. Схема катаболізму амінокислот у ссавців

8.1. КЛАСИФІКАЦІЯ І СТРУКТУРА АМІНОКИСЛОТ

Кожна амінокислота містить хоча б одну карбоксильну ($-\text{COOH}$) й амінну ($-\text{NH}_2$) групу. Залежно від того, до якого атома карбону приєднана аміногрупа, амінокислоти поділяються на α -, β -, γ - (і т. д.) амінокислоти. α -Карбоном вважається той атом карбону, до якого приєднана карбоксильна група. Якщо біля нього ж розташована аміногрупа, така амінокислота називається α -амінокислотою. Мономерами білків є тільки α -амінокислоти.

Зазвичай амінокислоти відрізняються своїми боковими ланцюгами. П'ять амінокислот (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін) є неполярними з вираженими гідрофобними властивостями. До неполярних амінокислот належать також гліцин і пролін, однак вони виконують досить специфічну функцію у білках. Ступінь гідрофобності амінокислот з ароматичними боковими ланцюгами зменшується у послідовності фенілаланін–триптофан–тирозин. П'ять

амінокислот – серин, треонін, цистеїн, аспарагін і глутамін не мають заряджених груп у бокових ланцюгах, проте є полярними.

Залежно від того, чи здатні амінокислоти перетворюватися на глюкозу, їх поділяють на три групи: глюкогенні, кетогенні й амінокислоти “змішаного” типу.

У **глюкогенних амінокислот** карбоновий скелет розщеплюється у процесі катаболізму до пірувату або до чотири- чи п'ятикарбових інтермедіатів циклу Кребса, які є субстратами для глюконеогенезу. Цей метаболічний шлях стає особливо важливим, коли рівень глюкози в організмі знижується. Синтезована таким чином глюкоза може бути використана як джерело енергії безпосередньо або для синтезу глікогену чи жирних кислот. До глюкогенних амінокислот належать аланін, гліцин, цистеїн, серин, аспартат, аспарагін, аргінін, пролін, гістидин, глутамат, метіонін, валін і глутамін.

Кетогенні амінокислоти розщеплюються до ацетил-КоА чи ацетоацетату, які, однак, не можуть забезпечити утворення оксалоацетату, необхідного для глюконеогенезу, але вони можуть бути використані для кетогенезу та синтезу ліпідів. Карбоновий скелет кетогенних кислот також може бути використаний для генерування енергії у циклі Кребса. Кетогенні амінокислоти не можуть перетворюватися на глюкозу. До кетогенних амінокислот належать тільки дві амінокислоти – лізин і лейцин. Решта амінокислот є **змішаного типу** і метаболізуються як у глюкогенні, так і в кетогенні продукти (рис. 8.2).

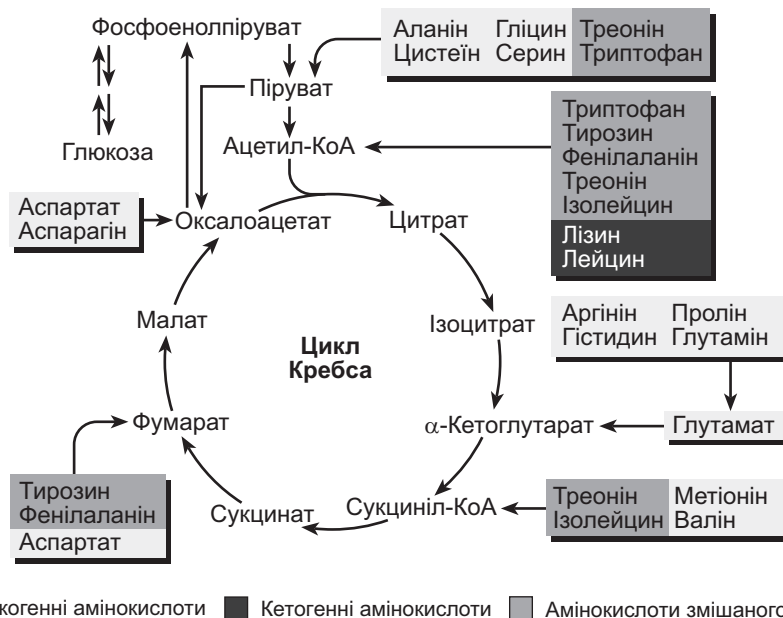


Рис. 8.2. Утворення субстратів циклу Кребса з амінокислот глюкогенного, кетогенного та змішаного типу

8.2. КАТАБОЛІЗМ АМІНОКИСЛОТ

Аміногрупи амінокислот використовуються економно, адже азот повітря є сполукою інертною, яка безпосередньо не залучається у метаболізм тваринних організмів. Катаболізм аміногруп відбувається переважно у печінці (рис. 8.3). На початковому етапі аміногрупа відщеплюється від карбонового скелета і переміщується переважно на α -кетоглутарат з утворенням глутамату, який надходить у мітохондрії. Таке трансамінування потребує наявності коферменту **піридоксальфосфату** – простетичної групи трансаміназ. У мітохондріях від глутамату відщеплюється аміногрупа, яка вивільняється у формі NH_4^+ .

Карбонові скелети амінокислот можуть зазнавати окиснення і перетворюватись на сполуки, що можуть входити у цикл Кребса, де окиснюються до карбон діоксиду та води.

У скелетних м'язах унаслідок трансамінування аміногрупи з амінокислот переносяться спочатку на α -кетоглутарат з утворенням глутамату, а згодом – за участі аланінамінотрансферази з глутамату на піруват з утворенням аланіну. Аланін транспортується з кров'ю до клітин печінки, де перетворюється на глюкозу. Утворена глюкоза повертається у м'язи, де розщеплюється у гліколізі до пірувату, з якого знову утворюється аланін. Цей метаболічний цикл (глюкоза – піруват – аланін – піруват – глюкоза) називають **глюкозо-аланіновим циклом** (рис. 8.4).

Інший спосіб утилізації аміногруп у тканинах – це синтез із глутамату і NH_4^+ -амінокислоти глутаміну з використанням енергії АТФ. Глутамін – це ще одна з нетоксичних транспортних сполук аміаку, яка також слугує джерелом аміногруп для різних синтетичних реакцій. У печінці за участю ферменту глутамінази глутамін перетворюється на глутамат з відщепленням NH_4^+ . У більшості тварин концентрації глутамату і глутаміну є найвищими серед усіх амінокислот. Наприклад, концентрація глутаміну в крові становить 0,5–0,9 мМ. У печінці глутамат зазнає подальших перетворень з утворенням додаткової кількості NH_4^+ та карбонових скелетів. Карбонові скелети використовуються як джерело енергії в метаболічних реакціях, а токсичний для організму аміак виводиться з організму через цикл сечовини.

Цикл сечовини починається у матриксі мітохондрій, де NH_4^+ реагує з вивільненим у ході мітохондріального дихання CO_2 (у формі HCO_3^-) з утворенням карбамоїлфосфату. Ця АТФ-залежна реакція є ключовою для регулювання циклу. Карбамоїлфосфат взаємодіє з орнітином з утворенням цитруліну, який виходить у цитозоль (рис. 8.5). Друга аміногрупа, що надходить у цикл сечовини, переноситься на цитрулін від аспартату з утворенням аргініно-сукцинату і далі аргініну. Аргіназа каталізує розщеплення аргініну до сечовини й орнітину, замикаючи таким чином цикл сечовини.

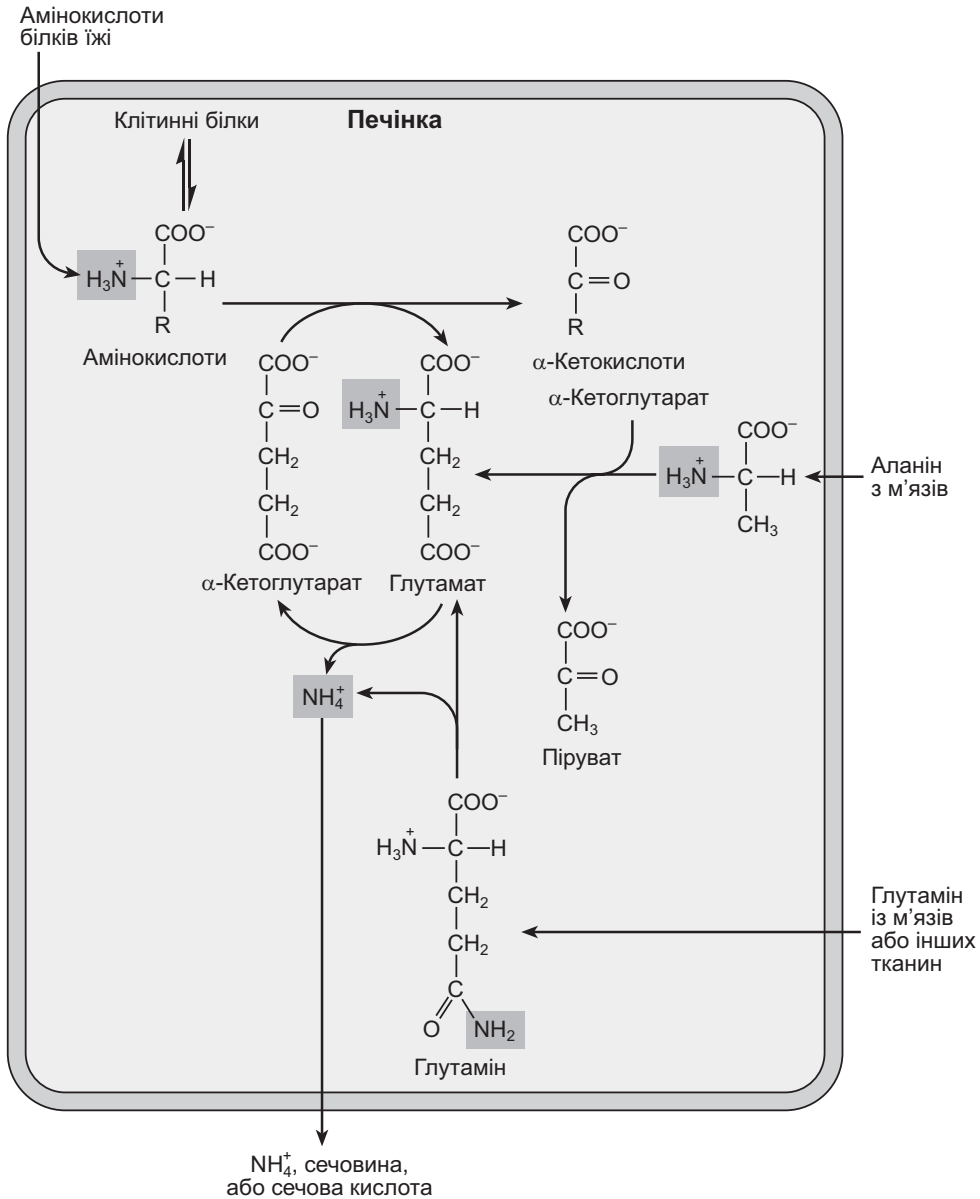


Рис. 8.3. Катаболічні перетворення амінокислот у печінці ссавців [за Нельсон, Кокс, 2015]

Цикл сечовини та цикл Кребса взаємопов'язані через проміжні продукти – аргініносукцинат, фумарат, α -кетоглутарат і малат. Механізми, що поєднують ці два цикли, називають **аспартат-аргініносукцинатним шунтом** (рис. 8.5). Цей шунт забезпечує ефективне поєднання метаболізму аміногруп і карбонових скелетів амінокислот. Варто зазначити, що у такому біциклі функціонують мітохондріальні та цитозольні пули фумарату і малату. Фумарат, що синтезується

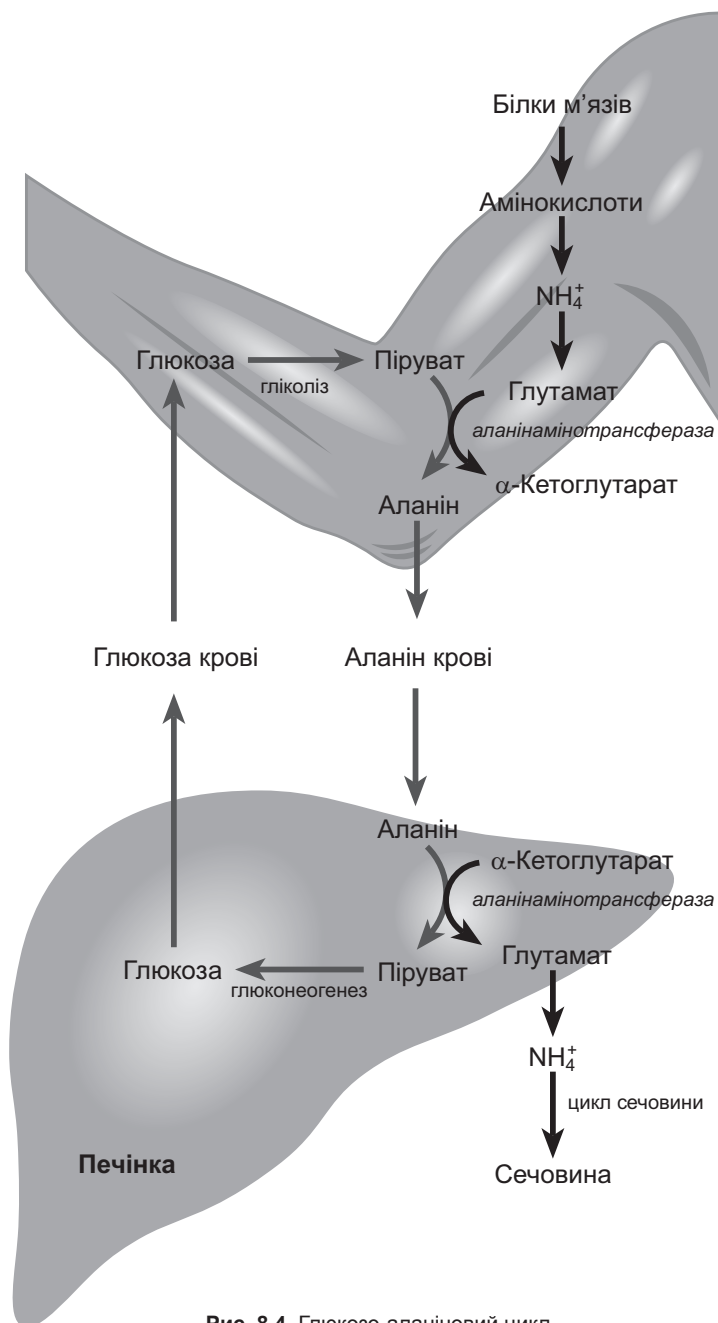


Рис. 8.4. Глюкозо-аланіновий цикл

Аспартат-аргініносукцинатний шунт зв'язує цикл сечовини і цикл Кребса, забезпечуючи ефективне поєднання метаболізму карбонових скелетів і аміногруп амінокислот.

у циклі сечовини чи за біосинтезу пуринів, може перетворюватись у цитозолі на малат. Малат далі надходить у мітохондрії через малат-аспартатний переносник і включається у цикл Кребса.

Форми виведення нітрогену мають свою видову специфічність. Встановлено, що для мікроорганізмів і кісткових риб – це аміак, для більшості наземних хребетних і акул – сечовина, а для птахів і наземних рептилій – сечова кислота.

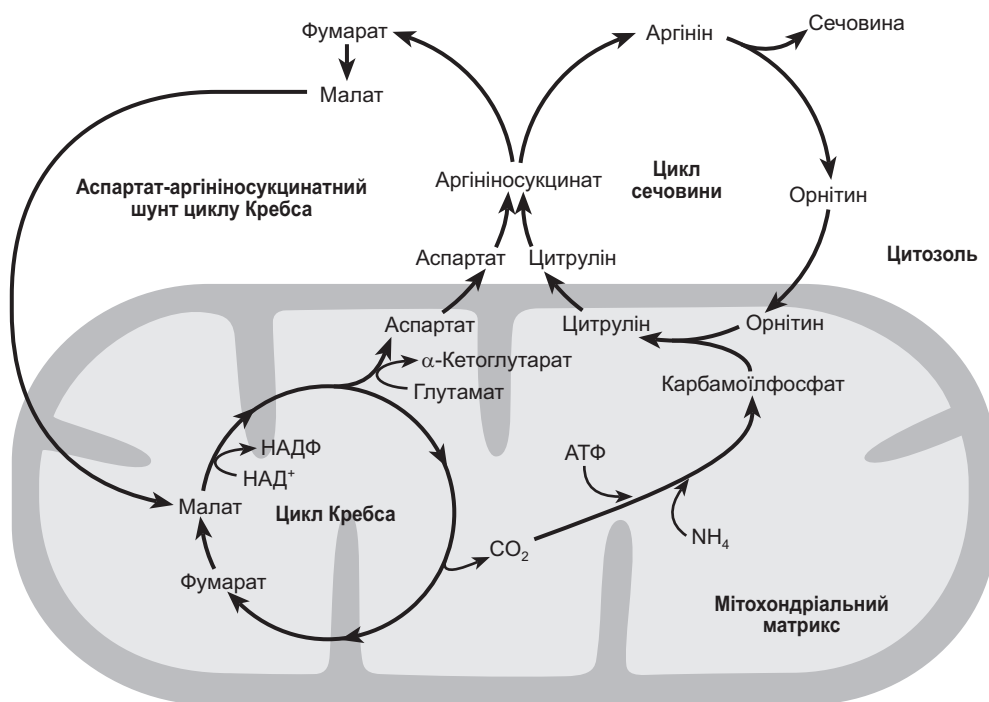


Рис. 8.5. Аспартат-аргініносукцинатний шунт спряження циклів Кребса і сечовини: $\text{CO}_2 + \text{NH}_4 + \text{АТФ} = \text{карбамоїлфосфат}$

Після відщеплення аміногрупи карбонові скелети перетворюються на сполуки, які здатні надходити в цикл Кребса і далі повністю окиснюватись у дихальному ланцюгу мітохондрій. Ці карбонові скелети надходять у цикл у формі ацетил-КоА, α -кетоглутарату, сукциніл-КоА, фумарату й оксалоацетату. Усі можливі варіанти утворення субстратів циклу Кребса з амінокислот наведені на рис. 8.2.

Стартовий субстрат циклу Кребса – **оксалоацетат** – може утворюватися з аспартату внаслідок дезамінування. Так само (внаслідок подвійного трансамінування) відбувається перетворення аспарагіну. Аланін, цистеїн, гліцин, серин, триптофан і треонін можуть розщеплюватися до трикарбонової кетокислоти **пірувату**. Зокрема, утворення пірувату з аланіну відбувається завдяки дезамінуванню цієї амінокислоти в трансаміназній реакції. Унаслідок дезамінування глутаматдегідрогеназою чи трансаміназою глутамат перетворюється на **α -кетоглутарат**. У свою чергу, глутамат може утворюватися з аргініну, глутаміну,

гістидину і проліну. **Сукциніл-КоА** синтезується з ізолейцину, валіну, метіоніну та треоніну. Проміжним продуктом цих реакцій є пропіоніл-КоА, який також може утворюватись у процесі β -окиснення жирних кислот. Він карбоксилюється до метилмалоніл-КоА і далі – до сукциніл-КоА. Ароматичні амінокислоти фенілаланіну і тирозину розщеплюються до **фумарату**, а НАДН є вторинним акцептором електронів у цій реакції. Амінокислоти переважно катаболізуються у печінці, за винятком амінокислот із розгалуженим ланцюгом (ізолейцин, валін і лейцин).

8.3. ВИКОРИСТАННЯ АМІНОКИСЛОТ У ПОЛЯРОГРАФІЧНИХ І ЯМР ДОСЛІДЖЕННЯХ

Для оцінки функціонального стану ізольованих мітохондрій у різноманітних модельованих умовах використовують різні субстрати окиснення – інтермедіати циклу Кребса, жирні кислоти, амінокислоти тощо. Різноманітне поєднання цих екзогенних субстратів дає змогу протестувати різні ланки системи енергетичного забезпечення (наприклад, НАД- чи ФАД-залежний шлях). Досить важливим напрямом у цих дослідженнях є встановлення ролі амінокислот в енергетичних процесах.

Амінокислоти часто використовують як енергетичний субстрат у дослідженнях ізольованих мітохондрій, наприклад, полярографічним методом чи методом ядерно-магнітного резонансу (ЯМР).

За фізіологічних умов глутамат потрапляє у мітохондрії за допомогою глутамат/ОН⁻-обмінника та перетворюється до α -кетоглутарату за участю глутаматдегідрогенази або аспаратамінотрансферази. α -Кетоглутарат включається у цикл Кребса і підтримує мітохондріальне дихання. Оскільки глутамат утворюється за гідролізу глутаміну, то і глутамін є дуже важливим аеробним субстратом, наприклад, для культури клітин [Kemp et al., 1994].

Досить часто для стимуляції дихання за полярографічних досліджень використовують суміші субстратів дихання (див. розділ 16). Зокрема, ефективно стимулює дихання суміш пірувату з малатом. У цій парі малат є фізіологічним попередником оксалоацетату, який разом із ацетил-КоА запускає цикл Кребса, а це інтенсифікує дихання мітохондрій.

За використання суміші глутамату з малатом оцінюють роль трансаміназних реакцій у підтриманні процесів енергетичного забезпечення. У цьому випадку малат використовується не лише як попередник оксалоацетату, але й для транспорту глутамату в мітохондрії.

Позамітохондріальний (цитоплазматичний) малат активує малат-аспартатний шунт, що включає глутамат-аспартатний переносник і α -кетоглутаратний транспортер, який обмінює малат на α -кетоглутарат (рис. 8.6). Цитозольна

і мітохондріальна малатдегідрогеназа і трансаміназа доповнюють шунт, поповнюючи рівень НАДН у мітохондріях. Цей НАДН може бути використаний для дихання, коли протони транспортуються за електрохімічним градієнтом назад у мітохондрії. Отже, за використання суміші глутамату з малатом спостерігається зростання рівня α -кетоглутарату, малату та НАДН у матриксі мітохондрій, що загалом зумовлює посилення поглинання кисню.

У мітохондріях скелетних м'язів людини встановлено, що інтенсивність дихання, яке спряжене з окисним фосфорилуванням, за окиснення тільки екзогенного глутамату становить 50–85 % від інтенсивності дихання за окиснення суміші глутамату з малатом. Водночас глутамат-стимульоване дихання є на 10 % інтенсивнішим, ніж за окиснення суміші пірувату з малатом (Gnaiger, 2009). Ці результати підтверджують особливу роль трансаміназних реакцій в енергетичному забезпеченні аеробних процесів у клітинах.

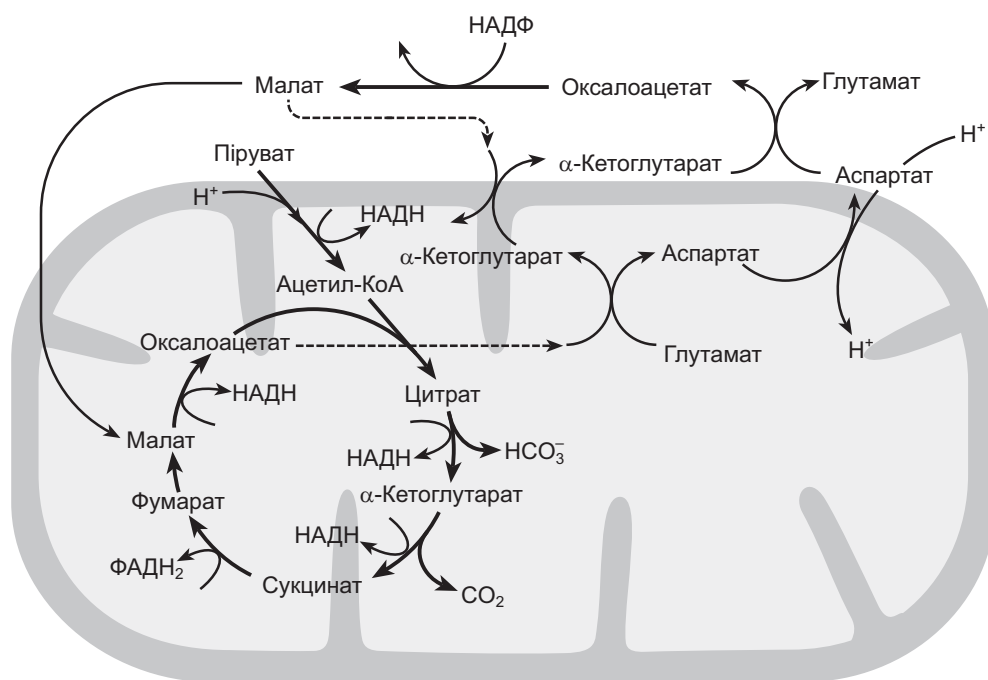


Рис. 8.6. Малат-аспартатний шунт у мітохондріях

На рис. 8.7 наведено зразок ^{31}P -спектра ЯМР ізольованих мітохондрій серця щура, на якому позначено піки АТФ (α , β , γ), АДФ (α , β), неорганічного фосфату (P_i) та метилendifосфонатного стандарту (МДФ). Умови такого експерименту наведені у розділі 18. Як видно, за окиснення амінокислоти глутамату з малатом (середній спектр) величина піків АТФ, яка відображає концентрацію цього макроерга, є практично рівно-велика величині піків за окиснення суміші пірувату з малатом (нижній спектр). Однак інгібування глутамат-аспартатного переносника аміно-

оксіяцетатом (АОА) практично повністю нівелює ЯМР-сигнал від β - і γ -фосфатних груп молекули АТФ (верхній спектр). Це свідчить про те, що синтез АТФ за використання суміші глутамату з малатом забезпечується окисненням переважно глутамату, що додатково підкреслює потенційно важливу енергетичну роль амінокислот для окисного фосфорилування.

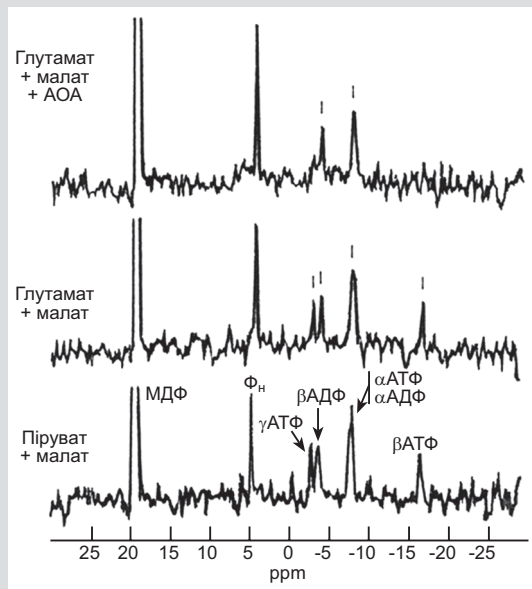


Рис. 8.7. Роль трансаміназних реакцій за синтезу АТФ у мітохондріях: ^{31}P -спектри ЯМР мітохондрій серця щура за окиснення різних субстратів: піруват – 5 мМ, малат – 5 мМ, глутамат – 5 мМ, АОА – 0,5 мМ [Бабський та ін., 2003]

Підсумки 8. КАТАБОЛІЗМ БІЛКІВ І АМІНОКИСЛОТ

- За певних умов амінокислоти можуть слугувати джерелом енергії для метаболічних процесів. Деякі амінокислоти можуть перетворюватись на глюкозу, інші – на кетоніві тіла, а ще інші – як на глюкозу, так і на кетоніві тіла.
- Після відщеплення аміногруп зі складу амінокислот їхні карбонові скелети зазнають окиснення і перетворюються на сполуки, які можуть входити у цикл Кребса, окиснюючись до карбон діоксиду та води.
- Цикл Кребса пов'язаний із циклом сечовини через аспартат-аргініносукцинатний шунт, що забезпечує використання карбонових скелетів амінокислот в енергетичному метаболізмі.
- Карбонові скелети амінокислот можуть надходити в цикл Кребса через такі проміжні сполуки: піруват, ацетил-КоА, α -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат і оксалоацетат.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. **Трансамінування та цикл сечовини.** Активність аспартатамінотрансферази є найвищою серед усіх амінотрансфераз печінки ссавців. Чому?
2. **Аланін і глутамін крові.** У плазмі крові здорової людини містяться всі амінокислоти, необхідні для синтезу протеїнів організму, однак їхня концентрація є різною. Наприклад, концентрація аланіну та глутаміну значно вища, ніж інших амінокислот. Назвіть можливу причину такої різниці.
3. **Продукти трансамінування амінокислот.** Які α -кетокислоти утворюються в реакції трансамінування α -кетоглутарату з аспаратом, глутаматом, аланіном і фенілаланіном?
4. **Порівняйте будову трьох продуктів білкового метаболізму: аміаку, сечовини і сечової кислоти.**
5. **Отруєння аміаком і нестача аргініну в харчових продуктах.** Кішкам після нічного голодування вранці натще дали амінокислотну суміш, яка містила всі амінокислоти, крім аргініну. За дві години вміст аміаку в крові кішок зріс від нормального рівня (18 мкг/л) до 180 мкг/л і з'явилися клінічні симптоми отруєння. У контрольній групі тварин недостатність аргініну компенсували орнітином і не спостерігали симптомів отруєння.
 - А) Чим зумовлене підвищення рівня аміаку в контрольних тварин? Чому брак аргініну призводить до аміачного отруєння? Чи є аргінін незамінною амінокислотою для кішок?
 - Б) Яку роль у цьому експерименті відіграло голодування?
 - В) Чому аргінін можна замінити орнітином?
6. **Хижаки на 90 % покривають енергетичні потреби відразу після вдалого полювання завдяки:**
 - 1) амінокислотам;
 - 2) вуглеводам;
 - 3) жирним кислотам;
 - 4) глюкозі.
7. **Яка з реакцій циклу сечовини відбувається у мітохондріях?**
 - 1) утворення цитруліну з орнітину та карбамоїлфосфату;
 - 2) утворення аргініносукцинату через формування цитруліл-АМФ;
 - 3) утворення аргініну з аргініносукцинату;
 - 4) утворення сечовини та регенерація орнітину.
8. **Вибрати кетогенні амінокислоти:**
 - 1) аланін;
 - 2) лейцин;
 - 3) лізин;
 - 4) глутамат.

9. Цей метаболічний шунт пов'язує цикл Кребса і цикл сечовини за катаболізму амінокислот у ссавців.

- 1) аспартат-аргініносукцинатний шунт;
- 2) пентозофосфатний шунт;
- 3) глюкозо-аланіновий цикл;
- 4) ці цикли не пов'язані між собою.

10. У циклі сечовини орнітин приєднує аміак у формі:

- 1) карбамоїлфосфату;
- 2) цитруліну;
- 3) N_2 ;
- 4) NH_4^+ .

11. Вибрати спільний субстрат циклів Кребса і сечовини.

- 1) орнітин;
- 2) фумарат;
- 3) сукцинат;
- 4) цитрат.

12. У циклі сечовини цей субстрат переноситься із цитозолу у мітохондрії:

- 1) орнітин;
- 2) цитрулін;
- 3) аргініносукцинат;
- 4) цитрат.

13. У циклі сечовини цей субстрат переноситься із мітохондрій у цитозоль:

- 1) орнітин;
- 2) цитрулін;
- 3) аргініносукцинат;
- 4) аргінін.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Бабський А.М., Верлі С., Доліба М.М. та ін. Посилення утворення сукцинату при ішемії серця // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2003. – № 4. – С. 26–41.

Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 3. – С. 388–405.

Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основы біохімії за Ленінджером. – Львів: БаК, 2015. – 1256 с.

Brosnan J. T. Glutamate at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism // J. Nutrit. – 2000. – Vol. 130 (4S Suppl). – P. 988S–990S.

Gnaiger E. Mitochondrial Pathways to Complex I: Respiration with pyruvate, glutamate and malate // Mitochondrial Physiology Network. – 2011. – Vol. 11, N 4. – P. 1–9.

Kemp M., Roberts P., Pook P. et al. Antagonism of presynaptically mediated depressant responses and cyclic AMP-coupled metabotropic glutamate receptors // Eur. J. Pharmacol. – 1994. – Vol. 266, N 2. – P. 187–192.

ЦИКЛ КРЕБСА

- Піруватдегідрогеназний комплекс
- Реакції циклу Кребса
- Зберігання енергії, вивільненої у циклі
- Метаболіти циклу як біосинтетичні субстрати
- Регуляція циклу

На другому етапі основних енергетичних процесів у клітині ацетильні групи ацетил-КоА, які утворені на першій стадії, надходять у цикл Кребса (цикл трикарбонових кислот, або цикл лимонної кислоти), в якому вони ферментативно окислюються до проміжних метаболітів циклу і CO_2 (див. рис. 6.1). Енергія, вивільнена у цьому процесі, зберігається у відновлених переносниках електронів – у чотирьох молекулах НАДН, одній молекулі ФАДН₂ та одній молекулі АТФ.

У цьому розділі ми детально розглянемо реакції циклу Кребса, але спочатку – перетворення пірувату до ацетил-КоА та включення останнього у цикл.

9.1. ПІРУВАТДЕГІДРОГЕНАЗНИЙ КОМПЛЕКС

Піруват, отриманий із глюкози й інших цукрів у процесі гліколізу, окислюється **піруватдегідрогеназним комплексом** у матриксі мітохондрій. До складу піруватдегідрогеназного комплексу входять три основних і два регуляторних ферменти, а також п'ять коферментів.

Реакція, що каталізується цим комплексом, є необоротним **окисним декарбоксілюванням**, у результаті якого від пірувату відщеплюється карбоксильна група, а двокарбоновий скелет, що залишився, стає ацетильною групою ацетил-КоА (рис. 9.1). НАДН, утворений у цій реакції, віддає гідрид-іон (:H^-) у дихальний ланцюг, через який відбувається послідовне перенесення двох електронів до молекули кисню.

Піруватдегідрогеназний комплекс окислює піруват у матриксі мітохондрій. Ця реакція є необоротною і завершується утворенням ацетил-КоА, CO_2 і НАДН.

Поєднані процеси дегідрування та декарбоксилювання пірувату до ацетил-КоА потребують узгодженої дії трьох ферментів: **піруватдегідрогенази** (E_1), **дигідроліпоїлтрансацилази** (E_2) і **дигідроліпоїлдегідрогенази** (E_3). Ця ферментна основа структури піруватдегідрогеназного комплексу залишилася незмінною протягом тривалої еволюції.

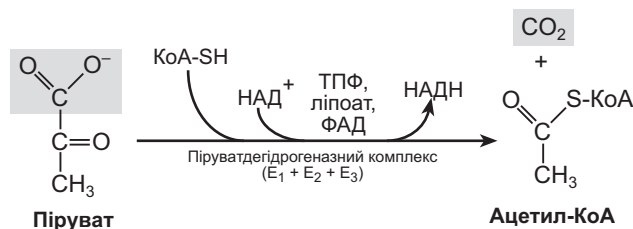


Рис. 9.1. Сумарна реакція окислення пірувату піруватдегідрогеназним комплексом: E_1 – піруватдегідрогеназа, E_2 – дигідроліпоїлтрансацилаза, E_3 – дигідроліпоїлдегідрогеназа, ТПФ – тіамінпірофосфат, КоА-SH – кофермент А

Виділений із клітин нирки корови піруватдегідрогеназний комплекс містить 60 ідентичних копій дигідроліпоїлтрансацилази, які разом із молекулами дигідроліпоїлдегідрогенази формують серцевину комплексу діаметром ~ 25 нм (рис. 9.2). Дигідроліпоїлтрансацилаза є також місцем приєднання простетичної групи – ліпоату. Навколо розташовані молекули піруватдегідрогенази, тому назагал діаметр піруватдегідрогеназного комплексу становить ~ 50 нм.

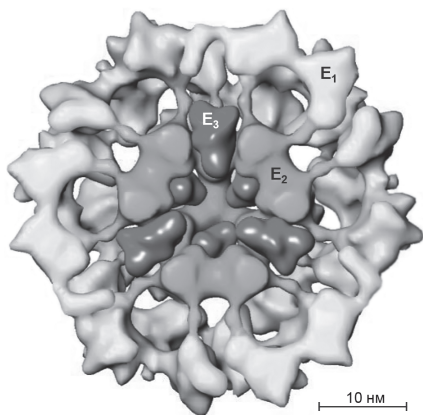


Рис. 9.2. Структура піруватдегідрогеназного комплексу згідно з моделлю Zhou et al., 2001. Пояснення див. у тексті

Піруватдегідрогеназний комплекс також містить п'ять коферментів, або простетичних груп: тіамінпірофосфат, ФАД, кофермент А, НАД і ліпоат. Чотири з цих компонентів містять, у свою чергу, вітаміни: тіамін (у молекулі тіамінпірофосфату), рибофлавін (у ФАД), ніацин (у НАД) і пантотенову кислоту (в КоА).

Ліпоат має дві тиолові групи, які зазнають оборотного окислення, утворюючи дисульфідні зв'язки (-S-S-). Тіамінпірофосфат розташований в активному центрі піруватдегідрогенази, а ФАД – в активному центрі дигідроліпоїлдегідрогенази.

Частиною дегідрогеназного комплексу також є два регуляторних білки – протеїнкіназа і фосфопротеїнфосфатаза.

9.2. РЕАКЦІЇ ЦИКЛУ КРЕБСА

У еукаріот реакції циклу Кребса відбуваються в мітохондріях, які містять усі необхідні ферменти і коферменти цих реакцій. Цикл Кребса налічує вісім етапів (рис. 9.3).

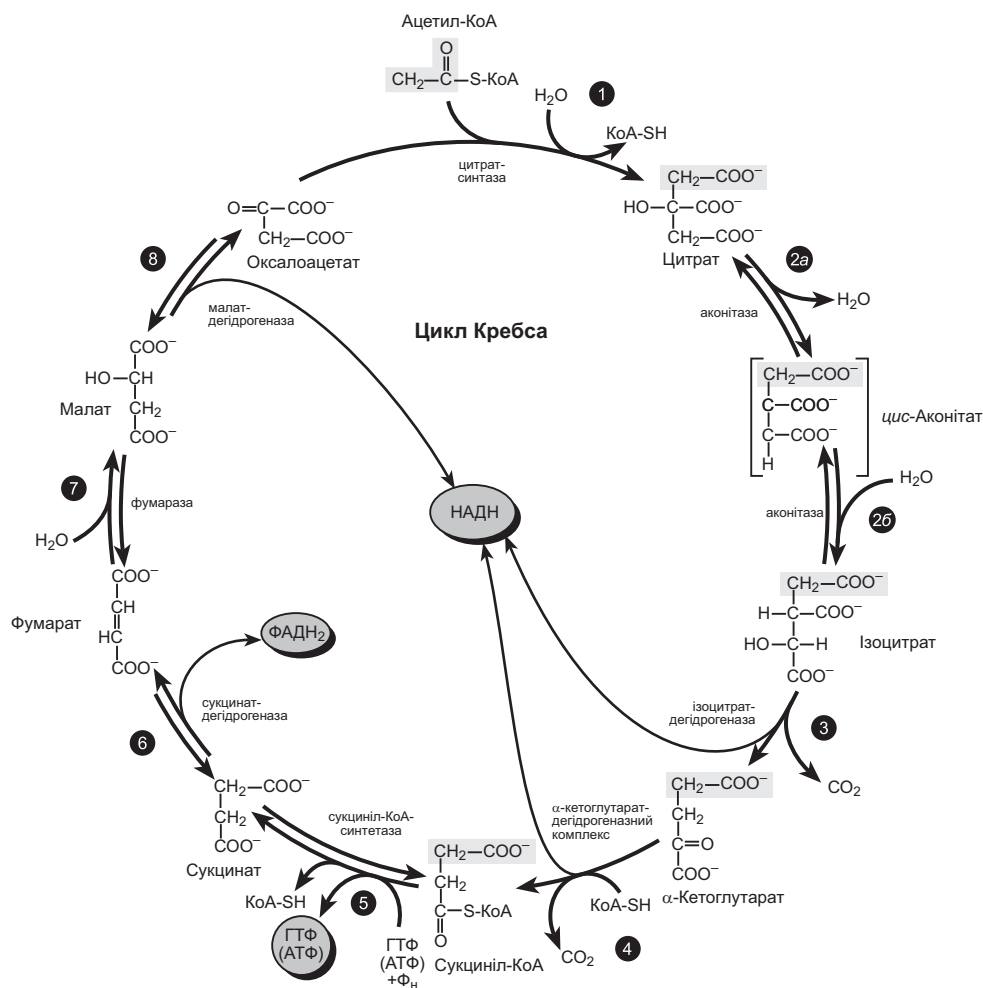


Рис. 9.3. Реакції циклу Кребса [за Nelson, Cox, 2012]

Реакції циклу Кребса у еукаріот відбуваються в мітохондріях, які містять усі ферменти і коферменти, необхідні для циклу.

Етап 1 – утворення цитрату. У першій реакції циклу метильний карбон ацетильної групи ацетил-КоА приєднується до карбонільної групи чотирикарбонового оксалоацетату. Ця реакція каталізується **цитратсинтазою**. Цитроїл-КоА є проміжним продуктом, який формується в активному центрі ферменту. Цей проміжний продукт швидко гідролізується до вільного КоА і цитрату, які вивільняються з активного центру ферменту. У цій реакції гідролізується саме високоенергетичний тіоефірний зв'язок цитроїл-КоА, що робить усю реакцію виражено екзергонічною. Високе від'ємне значення зміни стандартної вільної енергії цитратсинтазної реакції ($\Delta G'^0 = -32,2$ кДж/моль) є визначальним для перебігу всього циклу. КоА, що вивільняється у цій реакції, повторно залучається у процес окисного декарбоксилювання ще однієї молекули пірувату в піруватдегідрогеназному комплексі.

Етап 2 – утворення ізоцитрату через цис-аконітат. Оборотна трансформація цитрату в ізоцитрат супроводжується утворенням проміжного продукту – трикарбонової кислоти цис-аконітату, який зв'язаний з активним центром ферменту **аконітази**. Цей фермент може активувати як оборотну дегідратацію цитрату з утворенням цис-аконітату (2а), так і оборотну гідратацію цис-аконітату до ізоцитрату (2б). Ферум-сульфурний центр аконітази бере участь і в приєднанні субстрату до активного центру, і в каталітичній взаємодії з молекулою води. Зазвичай, за стандартних умов *in vitro* (pH 7,4 і 25 °C) концентрація ізоцитрату є дуже низькою. Так, рівноважна суміш продуктів і субстратів реакції містить менш ніж 10 % ізоцитрату. Проте у клітині реакція зміщена в бік утворення ізоцитрату, оскільки він активно споживається на третьому етапі циклу Кребса.

Етап 3 – декарбоксилювання ізоцитрату з утворенням α -кетоглутарату. Цей процес каталізує фермент **ізоцитратдегідрогеназа**. В активному центрі цього ферменту Mn^{2+} взаємодіє з карбонільною групою проміжного продукту – оксалосукцината – і стабілізує його енольну форму, утворену в процесі декарбоксилювання. Відомі дві форми ізоцитратдегідрогенази – одна з них передає свої електрони на НАД⁺, а друга – на НАДФ⁺. У клітинах еукаріот НАД-залежна ізоцитратдегідрогеназа трапляється переважно в мітохондріальному матриксі, а НАДФ-залежна форма ферменту – і в матриксі, і в цитозолі. Відомо, що відновлений НАДФ є необхідним фактором анаболічних реакцій, які переважно відбуваються у цитозолі клітини.

Етап 4 – декарбоксилювання α -кетоглутарату до сукциніл-КоА. Цей процес відбувається в **α -кетоглутаратдегідрогеназному комплексі**. За цього процесу окисного декарбоксилювання НАД є акцептором електронів, а КоА – донором сукцинільної групи (-S-КоА). Енергія окислення α -кетоглутарату зберігається в тіоефірному зв'язку сукциніл-КоА ($\Delta G'^0 = -33,5$ кДж/моль).

α -Кетоглутаратдегідрогеназний комплекс функціонально і структурно подібний до піруватдегідрогеназного комплексу. Ферменти E_1 , E_2 і E_3 α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу є фактично гомологічні відповідним ферментам піруватдегідрогеназного комплексу, за винятком того, що E_1 -ферменти зв'язують α -кетоглутарат, а не піруват. У α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс входять також такі коферменти як тіамінопірофосфат, ліпоат, ФАД, НАД і кофермент А. Припускають, що обидва комплекси мають спільне еволюційне походження.

Етап 5 – перетворення сукцинілу-КоА до сукцинату. Фермент, який каталізує цю оборотну реакцію, називається сукциніл-КоА-синтазою. Як вказано вище, утворений на попередньому етапі сукциніл-КоА має високоенергетичний тіоефірний зв'язок. Енергія, що вивільняється за розриву цього зв'язку, використовується для утворення фосфоангідридного зв'язку в молекулі ГТФ. Який механізм цього процесу? На першій стадії фосфатна група заміщає КоА у складі сукциніл-КоА й утворює високоенергетичний сукцинілфосфат (рис. 9.4). Далі сукцинілфосфат, зв'язаний з сукциніл-КоА-синтазою, віддає свою фосфатну групу на залишок гістидину в молекулі ферменту з утворенням високоенергетичного фосфогістидилферменту. Відтак, фосфатна група переноситься від ферменту до другого залишку фосфорної кислоти у молекулі ГДФ з утворенням ГТФ. Утворення ГТФ завдяки енергії, акумульованій у процесі декарбоксилювання α -кетоглутарату, є прикладом субстратного фосфорилування, подібного до синтезу АТФ у процесі гліколізу. ГТФ, утворений сукциніл-КоА-синтазою, може віддавати свою фосфатну групу на АДФ, утворюючи АТФ в оборотній реакції за участі **нуклеотиддифосфаткінази**:



Отже, на цьому етапі вивільнена енергія акумулюється, врешті, саме у формі АТФ. Оскільки АТФ і ГТФ є енергетично еквівалентні, зміна стандартної вільної енергії за їхньої взаємної трансформації практично дорівнює нулю. Інші деталі цього етапу розглянуто в розділі 13.

Етап 6 – окислення сукцинату до фумарату. Утворений зі сукциніл-КоА сукцинат окислюється до фумарату флавопротеїновим ферментом – **сукцинатдегідрогеназою**. Це єдиний фермент циклу Кребса, який є мембранозв'язаним: у еукаріотів – з внутрішньою мембраною мітохондрій, а у прокаріотів – із плазматичною мембраною. Цей фермент містить три різних ферум-сульфурних центри і одну молекулу ковалентно зв'язаного ФАД, через які проходять електрони, вивільнені у процесі окислення сукцинату.

Етап 7 – оборотна гідратація фумарату до малату. Перетворення фумарату на L-малат каталізується **фумаразою**. Фумараза є високо стереоспецифічним ферментом, який каталізує гідратацію подвійного зв'язку *транс*-типу. Проміжним етапом у цій реакції є утворення карбаніону. В обох напрямках фумараза є однаково стереоспецифічною.

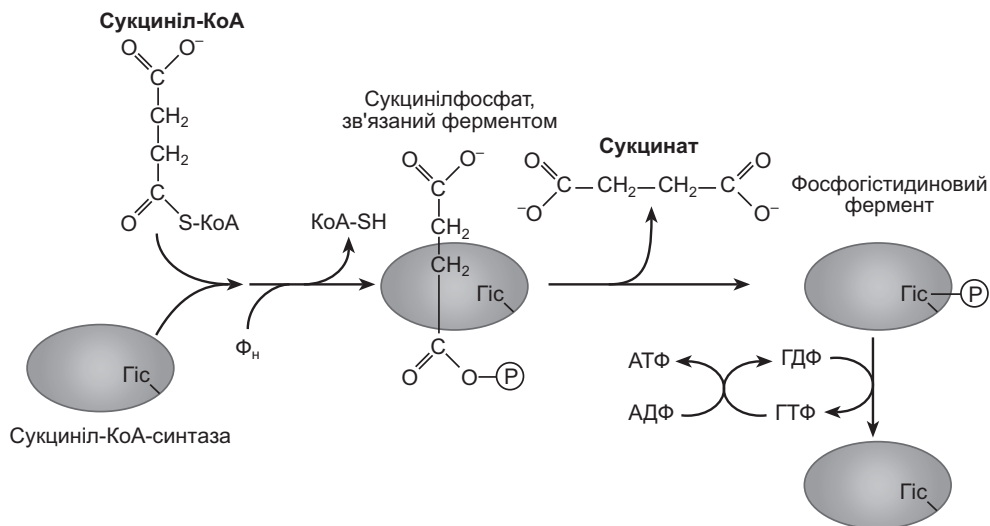


Рис. 9.4. Сукциніл-КоА-синтазна реакція: Гіс – гістидиновий залишок ферменту

Етап 8 – окислення малату до оксалоацетату. У цій реакції циклу Кребса НАД-залежна **L-малатдегідрогеназа** каталізує окислення L-малату до оксалоацетату. За стандартних термодинамічних умов переважає утворення L-малату. Однак у живих клітинах оксалоацетат постійно залучається до високоекзергонічної цитратсинтазної реакції (див. етап 1). Тому концентрація оксалоацетату в клітині є дуже низькою (< 1 мкМ). Ця особливість останньої реакції циклу Кребса сприяє перебігу малатдегідрогеназної реакції у бік утворення оксалоацетату.

9.3. ЗБЕРІГАННЯ ЕНЕРГІЇ, ВИВІЛЬНЕНОЇ У ЦИКЛІ КРЕБСА

Енергія, вивільнена за окислення ізоцитрату, α -кетоглутарату, сукциніл-КоА, сукцинату й малату, зберігається у трьох молекулах НАДН, одній молекулі ФАДН₂ і в одній молекулі АТФ (ГТФ). Незважаючи на те, що у циклі Кребса безпосередньо синтезується тільки одна молекула АТФ (у реакції перетворення сукциніл-КоА до сукцинату) за один повний цикл, чотири інші реакції окислення забезпечують потужний потік електронів у дихальний ланцюг мітохондрій через НАДН і ФАДН₂, що врешті приводить до синтезу великої кількості молекул АТФ у процесі окисного фосфорилування.

Коли обидві молекули пірувату, утворені з однієї молекули глюкози, окислюються у циклі Кребса, а всі вивільнені електрони переносяться на О₂, то внаслідок окисного фосфорилування синтезується 32 молекули АТФ (табл. 9.1).

Оскільки за гідролізу однієї молекули АТФ вивільняється 30,5 кДж/моль, то сумарна енергія, акумульована в 32 молекулах АТФ, становить 976 кДж/моль

($32 \times 30,5$ кДж/моль), або 34 % від теоретичного максимуму повного окислення однієї молекули глюкози (2840 кДж/моль). Дійсне значення вільної енергії відрізняється від стандартного. Коли внести поправку на дійсне значення вільної енергії повного розщеплення глюкози, розрахована ефективність процесу зростає до 65 %.

Таблиця 9.1

Утворення відновлених коферментів і АТФ за аеробного окиснення глюкози в реакціях гліколізу, піруватдегідрогеназного комплексу та циклу Кребса

Реакція	АТФ чи відновлені коферменти	Коефіцієнт розщеплення*	Максимально можлива кількість АТФ**
Глюкоза \rightleftharpoons глюкозо-6-фосфат	-1 АТФ		-1
Фруктозо-6-фосфат \rightleftharpoons фруктозо-1,6-фосфат	-1 АТФ		-1
Гліцеральдегід-3-фосфат \rightleftharpoons \rightleftharpoons 1,3-дифосфогліцерат	НАДН	$\times 2$	5
1,3-Дифосфогліцерат \rightleftharpoons 3-фосфогліцерат	АТФ	$\times 2$	2
Фосфоенолпіруват \rightleftharpoons піруват	АТФ	$\times 2$	2
Піруват \rightleftharpoons ацетил-КоА	НАДН	$\times 2$	5
Ізоцитрат \rightleftharpoons α -кетоглутарат	НАДН	$\times 2$	5
α -Кетоглутарат \rightleftharpoons сукциніл-КоА	НАДН	$\times 2$	5
Сукциніл-КоА \rightleftharpoons сукцинат	АТФ чи ГТФ	$\times 2$	2
Сукцинат \rightleftharpoons фумарат	ФАДН ₂	$\times 2$	3
Малат \rightleftharpoons оксалоацетат	НАДН	$\times 2$	5
Сумарний вихід на одну молекулу глюкози			32

Примітки: * – варто брати до уваги, що у гліколізі молекула глюкози розщеплюється на дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату;

** – кількість молекул АТФ розрахована за припущення, що 2,5 АТФ утворюється за окиснення НАДН і 1,5 АТФ – за окиснення ФАДН₂; негативне значення кількості АТФ свідчить про споживання енергії

9.4. МЕТАБОЛІТИ ЦИКЛУ КРЕБСА ЯК БІОСИНТЕТИЧНІ СУБСТРАТИ

Циклічний процес, який складається з восьми стадій і призначений, здавалося б, для простого окислення двокарбонових ацетильних груп ацетил-КоА до СО₂, не обмежується лише цим. Цей цикл є своєрідним колектором для більшості метаболічних процесів. Чотири- і п'ятикарбонові кінцеві продукти багатьох катаболічних процесів підживлюють цикл. Наприклад, оксалоацетат і α -кетоглутарат утворюються також за розщеплення відповідно амінокислот аспартату і глутамату (див. розділ 8). За певних умов метаболіти циклу Кребса вивільняються та слугують попередниками (субстратами) для різноманітних біосинтетичних процесів.

Цикл Кребса є центром сходження практично всіх метаболічних реакцій, коли продукти катаболічних реакцій підживлюють цикл, а метаболіти циклу слугують попередниками для різноманітних анаболічних реакцій

Цикл Кребса, подібно до інших метаболічних процесів, є продуктом еволюції, яка здебільшого відбувалася напередодні виникнення аеробних організмів. Цей цикл не є прикладом найкоротшого шляху перетворення ацетату до CO_2 , проте він має дуже великі переваги. Як видно з рис. 9.5, метаболіти циклу Кребса є важливими біосинтетичними інтермедіатами. Наприклад, α -кетоглутарат і оксалоацетат можуть слугувати попередниками аспартату і глутамату в реакціях трансамінування, які використовуються для синтезу інших амінокислот, а також пуринових і піримідинових нуклеотидів. Оксалоацетат може перетворюватися на глюкозу в процесі глюконеогенезу (рис. 9.5). Сукциніл-КоА є центральним інтермедіатом у синтезі порфіринового кільця гемових груп. Гемові групи залучені у процеси перенесення кисню гемоглобіном, його депонування міоглобіном і у транспорт електронів цитохромами.

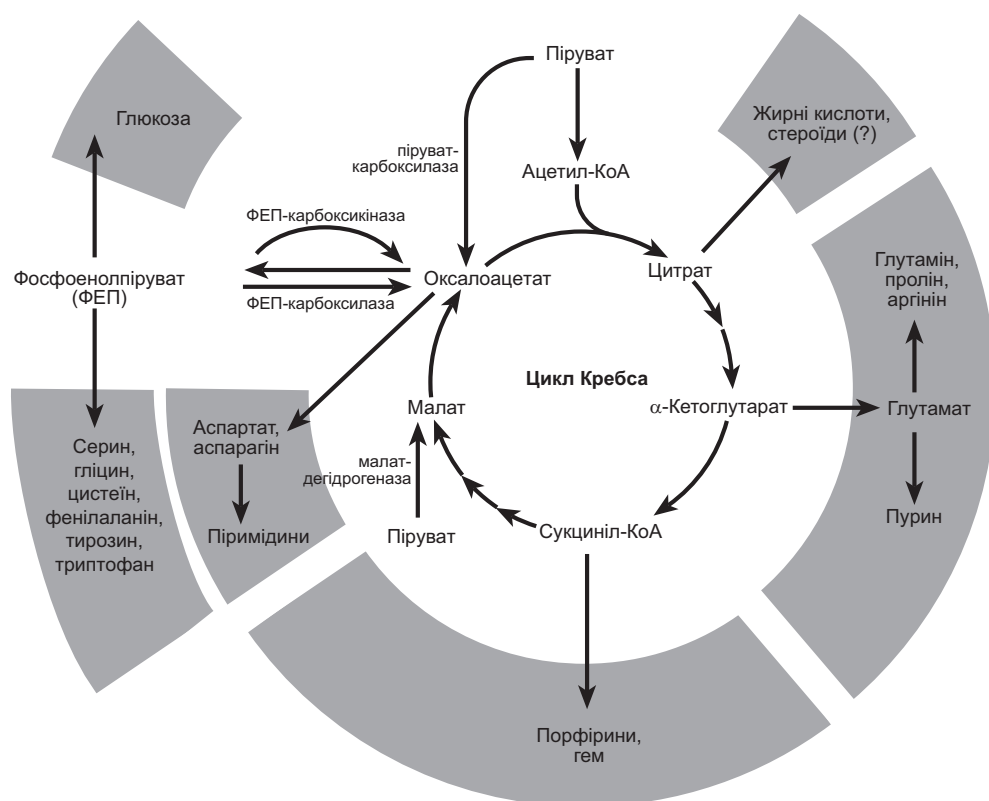


Рис. 9.5. Роль циклу Кребса в анаболізмі [за Nelson, Cox, 2012]

В аеробних організмах цикл Кребса є амфіболічним механізмом, який об'єднує катаболічні й анаболічні процеси, для синтезу нових органічних сполук.

Амфіболічні шляхи забезпечують метаболізму певну гнучкість, що дає змогу більш точно регулювати метаболічні процеси.

Оскільки метаболіти циклу Кребса використовуються як біосинтетичні попередники, то їхній запас поповнюється **анаплеротичними реакціями**, продукти яких підвищують концентрацію субстратів циклу. У нормальних умовах реакції, в яких метаболіти циклу використовуються для інших метаболічних процесів, є в динамічному балансі з реакціями, які поповнюють запас цих метаболітів. Отже, концентрація метаболітів циклу Кребса у нормі залишається відносно сталою.

Анаплеротичні реакції забезпечують підтримання концентрації проміжних метаболітів циклу Кребса на фізіологічному рівні.

У табл. 9.2 наведено найбільш поширені анаплеротичні реакції, які відбуваються в різних тканинах і організмах, причому кожна з них відповідає за перетворення пірувату чи фосфоенолпірувату до оксалоацетату чи малату.

Таблиця 9.2

Анаплеротичні реакції циклу Кребса

Реакція	Фермент	Тканина чи організм
$\text{Піруват} + \text{HCO}_3^- + \text{АТФ} \rightleftharpoons \text{оксалоацетат} + \text{АДФ} + \text{P}_i$	Піруваткарбоксилаза	Нирка, печінка
$\text{Фосфоенолпіруват} + \text{CO}_2 + \text{ГДФ} \rightleftharpoons \text{оксалоацетат} + \text{ГТФ}$	Фосфоенолпіруват-карбоксикіназа	Скелетні м'язи, серце, печінка
$\text{Піруват} + \text{HCO}_3^- + \text{НАД(Ф)Н} \rightleftharpoons \text{малат} + \text{НАД(Ф)}^+$	Малатдегідрогеназа	Більшість прокариот і еукаріот

Найважливішою анаплеротичною реакцією в печінці та нирках ссавців є оборотне карбоксилювання пірувату піруваткарбоксилазою з утворенням оксалоацетату. Коли у циклі Кребса бракує оксалоацетату чи іншого інтермедиату, піруват зазнає карбоксилювання і рівень оксалоацетату зростає. Ця реакція є енергозалежною. Енергія, необхідна для приєднання карбоксильної групи до пірувату, приблизно дорівнює енергії, вивільненій з молекули АТФ. Піруваткарбоксилаза є важливим регулятором циклу Кребса, для якої ацетил-КоА є позитивним алостеричним модулятором. Кожного разу, коли рівень ацетил-КоА, який ініціює цикл Кребса, є в надлишку, це стимулює піруваткар-

боксилазну реакцію синтезу оксалоацетату. Збільшення концентрації оксалоацетату інтенсифікує цикл Кребса завдяки цитратсинтазній реакції.

На відміну від піруваткарбоксилази, яка розташована винятково у матриксі мітохондрій, фосфоенолкарбоксикіназа функціонує у людини як у мітохондріях, так і в цитозолі. Малатдегідрогеназа, яка також експресована в гепатоцитах обох клітинних компартментів, поряд із пентозофосфатним шляхом постачає НАДФН для синтезу жирних кислот і холестерину в печінці, молочній залозі та інших органах.

9.5. РЕГУЛЯЦІЯ ЦИКЛУ КРЕБСА

Згідно з класичними уявленнями, цикл Кребса регулюється чотирма ключовими ферментами. Однією з визначальних ланок його регуляції є піруватдегідрогеназний комплекс, який формально не належить до ферментів циклу Кребса. Важливими також є цитратсинтаза, ізоцитратдегідрогеназа і α -кетоглутаратдегідрогеназа.

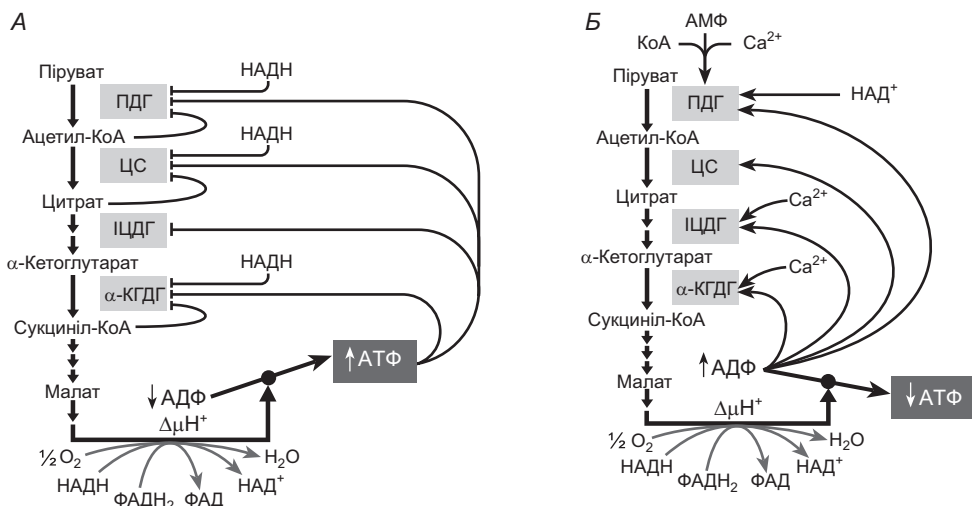


Рис. 9.6. Інhibуючі (А, \vdash) та стимулюючі (Б, \leftarrow) чинники у циклі Кребса: ПДГ – піруватдегідрогеназа, ЦС – цитратсинтаза, ІЦДГ – ізоцитратдегідрогеназа, α -КГДГ – α -кетоглутаратдегідрогеназа; інші пояснення див. у тексті

Продукція ацетил-КоА піруватдегідрогеназним комплексом регулюється через алостеричні та ковалентні механізми. АТФ, а також продукти піруватдегідрогеназної реакції – ацетил-КоА і НАДН, – ефективно інhibують піруватдегідрогеназний комплекс завдяки негативному зворотному зв'язку (рис. 9.6, А). Алостеричне гальмування окислення пірувату посилюється також за наявності довголанцюгових жирних кислот. І навпаки, АМФ, КоА і NAD^+ , які нагромаджуються у матриксі мітохондрій за сповільнення циклу Кребса, здатні алостерично

активувати піруватдегідрогеназний комплекс (рис. 9.6, Б). Отже, піруватдегідрогеназна активність знижується у разі надлишку метаболічного “палива” у формі жирних кислот і ацетил-КоА, а також тоді, коли клітинне співвідношення $[АТФ]/[АДФ]$ чи $[НАДН]/[НАД^+]$ є високим. Однак якщо у клітини виникає потреба в більшій кількості енергії, ця ферментативна активність зростає, в результаті чого збільшується потік ацетил-КоА у цикл Кребса.

У ссавців ці алостеричні регуляторні механізми доповнюються ще одним рівнем регуляції – **ковалентною модифікацією білка**. Піруватдегідрогеназний комплекс гальмується фосфорилуванням специфічного залишку серину на його E_1 -субодиниці – піруватдегідрогеназі. Піруватдегідрогеназний комплекс ссавців містить два регуляторних ферменти. Специфічна **протеїнкіназа** фосфорилує і таким чином інактивує піруватдегідрогеназу, а специфічна **фосфопротеїнфосфатаза** відщеплює фосфатну групу і так активує піруватдегідрогеназу. Сама протеїнкіназа алостерично активується молекулою АТФ, і коли концентрація цього нуклеотиду є високою, піруватдегідрогеназний комплекс інактивується. Якщо концентрація АТФ зменшується, активність кінази знижується і фосфатаза відщеплює фосфатну групу від піруватдегідрогенази, активуючи комплекс. Активність фосфатази також зростає за дії катіонів Ca^{2+} [McCormack et al., 1990].

Окрім піруватдегідрогеназного комплексу, ферменти цитратсинтаза, ізоцитратдегідрогеназа і α -кетоглутаратдегідрогеназа (рис. 9.6), які каталізують три екзергонічні реакції циклу Кребса, можуть за певних обставин як прискорити його, так і сповільнити. Активність цитратсинтази зростає за зниження співвідношення $[АТФ]/[АДФ]$. І навпаки, за підвищення концентрації цитрату і НАДН, згідно з принципом зворотного негативного зв'язку, активність цього ферменту знижується.

Цикл Кребса регулюється через його три екзергонічні ланки. Три фактори визначають ступінь потоку в циклі – доступність субстрату, гальмування продуктами, які нагромадились у реакції, і алостеричне гальмування за принципом зворотного негативного зв'язку ферментів, які каталізують ранні стадії циклу. Концентрації субстратів та інтермедіатів у циклі Кребса визначають потік реакцій із такою інтенсивністю, яка забезпечує оптимальні концентрації АТФ і НАДН.

НАДН – продукт дегідрогенізації ізоцитрату, α -кетоглутарату і малату – може нагромаджуватися й інгібувати не тільки цитратсинтазу, а й α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс. Високе співвідношення $[НАДН]/[НАД^+]$ регулює активність і малатдегідрогенази, коли концентрація оксалоацетату є низькою, сповільнюючи першу стадію циклу (див. розділ 13). Накопичений на четвертому етапі циклу сукциніл-КоА теж за принципом зворотного негативного зв'язку інгібує α -кетоглутаратдегідрогеназу. Усі ключові ферменти – цитратсинтаза, ізоцитратдегідрогеназа і α -кетоглутаратдегідрогеназа – зазнають

інгібування за підвищеної концентрації АТФ і активуються за підвищеної концентрації АДФ.

Крім піруватдегідрогенази, Ca^{2+} -залежними ферментами також є ізоцитрат- і α -кетоглутаратдегідрогенази циклу Кребса [McCormack et al., 1990]. Катіони Ca^{2+} запускають функціональну активність клітини, що супроводжується зниженням концентрації АТФ. Щоб запобігти неконтрольованому зниженню концентрації АТФ, необхідно заздалегідь активувати окисні процеси в мітохондріях, і це також реалізується катіонами Ca^{2+} – згідно з принципом випереджувального зв'язку.

Отже, за фізіологічних умов гліколіз і цикл Кребса скоординовані. Тільки така кількість глюкози буде перетворена до пірувату, яка необхідна для забезпечення циклу Кребса “пальним”. Інтенсивність гліколізу спряжена зі швидкістю циклу Кребса не тільки через гальмування молекулами АТФ чи НАДН, котрі є спільними продуктами і гліколітичної, і дихальної ланок окислення глюкози, але й також через гальмування дегідрогеназ продуктами їхніх реакцій – ацетил-КоА, цитратом і сукциніл-КоА. Відомо, що цитрат, який є продуктом першої стадії циклу Кребса, – це також важливий алостеричний інгібітор фосфофруктокінази-1 у гліколізі.

Німецько-англійський біолог Ганс Адольф Кребс (1900–1981) народився в Гільдесгаймі (Німеччина), в сім'ї отоларинголога Георга Кребса. В останні місяці Першої світової війни Ганс служив у полку зв'язку пруської армії. Медичний диплом отримав у Гамбурзькому університеті. Наукова кар'єра молодого вченого розпочалась на посаді асистента-лаборанта в лабораторії Отто Варбурґа в Інституті біології кайзера Вільгельма в Берліні, де він засвоїв розроблений Варбурґом метод дослідження клітинного дихання на тонких зрізах свіжих тканин. Згодом цей метод дав йому змогу разом із Куртом Генселейтом описати цикл сечовини – процесу, за допомогою якого з організму виводяться кінцеві продукти нітрогенного обміну. У 1933 р., після приходу до влади Гітлера, Кребс втратив роботу в Фрайбурзькому університеті й емігрував до Великобританії. Він прибув у Кембридж,



Ганс Адольф Кребс
(1900–1981)

не захопивши зі собою “практично нічого, окрім полегшення, декількох книг і 16 упаковок апарата Варбурґа”. Згодом він був призначений викладачем з погодинною оплатою на кафедрі біохімії Шеффілдського університету. Вивчаючи проміжні стадії обміну вуглеводів, Кребс описав цикл лимонної кислоти, або цикл трикарбонових кислот, який тепер називають його іменем. У ранніх роботах Альберта Сент-Дьйордьї та ін. уже було встановлено, що за аеробних умов цитрат (шестикарбонова

кислота) у результаті послідовних реакцій перетворюється на оксалоацетат (чотирикарбонову кислоту) і вуглекислий газ. У 1937 р. у своїй історичній публікації в журналі "Ензимологія" (співавтор В.А. Джонсон) Кребс писав: *«У разі додавання цитрату інтенсивність дихання часто зростає ... надлишкове поглинання кисню є значно вищим, ніж це можна було б пояснити повним окисненням цитрату ... Оскільки лимонна кислота каталітично посилює окиснення інших субстратів у тканині, то, можливо, вона використовується у початковій реакції, проте регенерується у завершальній реакції»*. Кребс довів, що основні принципи його циклу справедливі і для окиснення жирних кислот. У 1953 р. вченому було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини "за відкриття циклу лимонної кислоти". Кребс розділив цю премію з Фріцом Ліпманом. У вітальній промові дослідник із Каролінського інституту Ерік Гаммарстен сказав: *«Цикл Кребса пояснює два одночасних процеси: реакцій розпаду, за яких вивільняється енергія, і синтетичні процеси, за яких ця енергія використовується»*. Підкреслюючи загальнобіологічне значення свого відкриття, Кребс у Нобелівській лекції зазначив: *«Наявність одного й того ж механізму утворення енергії в усіх живих істот дає змогу зробити ще два висновки. По-перше, цей механізм виник на дуже ранніх етапах еволюції і, по-друге, життя у його нинішньому вигляді зародилося лише один раз»*.



Альберт Сент-Дьйордьї
(1893–1986)

Підсумки 9. ЦИКЛ КРЕБСА

- Піруват за допомогою піруватдегідрогеназного комплексу перетворюється на ацетил-КоА, який є початковим субстратом для циклу Кребса.
- Цикл Кребса – центральний метаболічний механізм, за перебігу якого сполуки, що утворились унаслідок розщеплення вуглеводів, жирів і білків, далі окислюються, а енергія, вивільнена у цих процесах, акумулюється у вигляді переносників електронів – трьох молекул НАДН, однієї молекули ФАДН₂, а також в одній молекулі ГТФ (АТФ) на один цикл.
- Восьмиетапний цикл Кребса, який у еукаріот розташований в мітохондріях, починається з реакції об'єднання оксалоацетату з ацетил-КоА, внаслідок чого утворюється цитрат. Цей механізм є циклічним: на кожен молекулу використаного оксалоацетату в циклі утворюється одна нова молекула оксалоацетату.

- Цикл Кребса включає як катаболічні, так і анаболічні реакції, тобто є амфіболічним.
- Проміжні сполуки можуть вилучатися з циклу і ставати субстратами для синтетичних процесів. Вилучені проміжні сполуки поповнюються за допомогою кількох анаплеротичних реакцій.
- Класичний погляд полягає в тому, що швидкість перебігу циклу Кребса визначається швидкістю перетворення пірувату на ацетил-КоА та потоком проміжних метаболітів через цитратсинтазу, ізоцитратдегідрогеназу і α -кетоглутаратдегідрогеназу. Ці потоки інгібуються АТФ і НАДН й активуються АДФ і НАД⁺.
- Утворення ацетил-КоА для циклу Кребса за участі піруватдегідрогеназного комплексу алостерично активують метаболіти, які є сигналами про зниження енергетичних запасів (АДФ, НАД⁺, КоА), та інгібують метаболіти, які сигналізують про забезпеченість клітин метаболічною енергією (АТФ, НАДН, жирні кислоти).



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. **Стимулювання поглинання кисню малатом і оксалоацетатом.** На початку 1930-х років Альберт Сент-Дьйордї встановив, що малі кількості малату чи оксалоацетату, додані до гомогенату грудних м'язів голуба, посилюють поглинання кисню. Причому кількість поглинутого кисню була приблизно у сім разів вища, ніж це потрібно для повного окиснення малату чи оксалоацетату до CO_2 і H_2O . Як пояснити ці ефекти?
2. **Взаємозв'язок між диханням і циклом Кребса.** Хоча кисень безпосередньо не бере участі в циклі Кребса, однак цикл функціонує тільки за його наявності. Чому?
3. **Термодинаміка цитратсинтазної реакції у клітинах серця щура.** Цитрат утворюється в результаті взаємодії ацетил-КоА й оксалоацетату за участі ферменту цитратсинтази:



У мітохондріях серця щура за рН 7,0 і 25 °С концентрація реагентів і продуктів становить (у мкМ): оксалоацетату – 1, ацетил-КоА – 1, цитрату – 220, КоА – 65. Зміна стандартної вільної енергії для цитратсинтазної реакції становить -32,2 кДж/моль. Розрахувати зміну дійсної вільної енергії для цитратсинтазної реакції.

4. **Дослідження дихання ізольованих мітохондрій.** Якщо в полярографічній комірці до ізольованих мітохондрій, які окиснюють екзогенний енергетичний субстрат піруват, додати малонат натрію (інгібітор сукцинатдегідрогенази, див. с. 147), то поглинання кисню органелами припиниться. Чому? Який проміжний продукт метаболізму буде за цих експериментальних умов накопичуватись? Яким способом, окрім видалення малонату, можна відновити дихання мітохондрій?

- 5. Регулювання піруватдегідрогеназного комплексу.** У м'язах кроля швидкість перетворення пірувату на ацетил-КоА регулюється співвідношенням активної (фосфорильованої) до неактивної (нефосфорильованої) форми комплексу. Як зміниться швидкість реакції, якщо до гомогенату цих м'язів додати: а) кіназу піруватдегідрогенази, АТФ і НАДН; б) фосфатазу піруватдегідрогенази і Ca^{2+} ; в) малонат?
- 6. Класичний цикл Кребса розпочинається:**
- 1) утворенням цитрату з оксалоацетату й ацетил-КоА;
 - 2) утворенням оксиду карбону, води і регенерацією оксалоацетату;
 - 3) утворенням цитрату з пірувату і малату;
 - 4) утворенням оксиду карбону і води.
- 7. Вказати компоненти-вітаміни піруватдегідрогеназного комплексу:**
- 1) рибофлавін;
 - 2) ніацин;
 - 3) аскорбінова кислота;
 - 4) ретинол.
- 8. Вибрати правильну послідовність інтермедіатів циклу Кребса:**
- 1) цитрат → аконітат → ізоцитрат → α -кетоглутарат → сукциніл-КоА → сукцинат → фумарат → малат → оксалоацетат;
 - 2) оксалоацетат → малат → ацетил-КоА → сукцинат → цитрат → аконітат → ізоцитрат → α -кетоглутарат → сукциніл-КоА → фумарат;
 - 3) ацетил-КоА → піруват → ізоцитрат → α -кетоглутарат → сукцинат → сукциніл-КоА → фумарат → малат → оксалоацетат;
 - 4) цитрат → ацетил-КоА → ізоцитрат → α -кетоглутарат → сукциніл-КоА → сукцинат → фумарат → малат → оксалоацетат.
- 9. Вибрати реакції циклу Кребса, які супроводжуються декарбоксилюванням:**
- 1) окислення ізоцитрату до α -кетоглутарату;
 - 2) окислення α -кетоглутарату до сукциніл-КоА;
 - 3) окислення цитрату до ізоцитрату;
 - 4) утворення цитрату з ацетил-КоА і оксалоацетату.
- 10. Вибрати реакції циклу Кребса, в яких НАД⁺ відновлюється до НАДН:**
- 1) перетворення α -кетоглутарату на сукциніл-КоА;
 - 2) перетворення пірувату на ацетилКоА;
 - 3) перетворення ізоцитрату на цитрат;
 - 4) перетворення малату на оксалоацетат.
- 11. Вказати Ca^{2+} -залежні ферменти циклу Кребса:**
- 1) α -кетоглутаратдегідрогеназа;
 - 2) цитратсинтаза;
 - 3) малатдегідрогеназа;
 - 4) ізоцитратдегідрогеназа.
- 12. Вибрати інгібітори піруватдегідрогеназного комплексу:**
- 1) АТФ;
 - 2) ацетил-КоА;
 - 3) НАД⁺;
 - 4) НАДН.

13. Цей фермент каталізує зворотнє карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату:

- 1) піруваткарбоксилаза;
- 2) піруватдегідрогеназа;
- 3) піруватсинтаза;
- 4) оксалоацетатдекарбоксилаза.

**ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

- Gest H.* Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes // *Biochem. Soc. Symp.* – 1987. – Vol. 54. – P. 3–16.
- McCormack J.G., Halestrap A.P., Denton R.M.* Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism // *Physiol Rev.* – 1990. – Vol. 70, N 2. – P. 391–425.
- Krebs H.A., Weitzman P.D.J.* Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning. – London: Biochemical Society, 1987.
- Lane N.* Life Ascending: The Ten Great Inventions of Evolution. – New York: W.W. Norton & Co., 2009.
- Meléndez-Hevia E., Waddell T.G., Cascante M.* The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution // *J. Mol. Evol.* – 1996. – Vol. 43, N 3. – P. 293–303.
- Nelson D.L., Cox M.M.* Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth Edition. – Madison: University of Wisconsin, 2012. – 1119 p.
- Zhou Z.H., McCarthy D.B., O'Connor C.M. et al.* The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2001. – Vol. 98, N 26. – P. 14802–14807.

БУДОВА І ФУНКЦІЇ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ

- Перенесення електронів дихальним ланцюгом
- Мультиферментні комплекси дихального ланцюга
- Протонний градієнт як форма зберігання енергії

На третьому етапі енергетичних перетворень (див. рис. 6.1) відбувається окиснення НАДН і ФАДН₂, що супроводжується вивільненням протонів і електронів. Далі ланцюгом мультиферментних комплексів, який називають **дихальним**, або **електронтранспортним**, електрони переносяться на кінцевий акцептор – кисень, а протони транспортуються в міжмембранний простір мітохондрій. Дихальний ланцюг розташований у внутрішній мембрані мітохондрій або у плазматичних мембранах бактерій і синьозелених водоростей. Такі мембрани ще називають спряжуваними, бо в них відбувається важливий біоенергетичний процес – **окисне фосфорилування**, а саме спряження процесів окиснення та синтезу АТФ.

10.1. ПЕРЕНЕСЕННЯ ЕЛЕКТРОНІВ ДИХАЛЬНИМ ЛАНЦЮГОМ

Транспорт електронів дихальним ланцюгом мітохондрій здійснюється декількома способами: 1) прямим перенесенням електронів між простетичними групами, які містять метал зі змінною валентністю (наприклад, Fe³⁺/ Fe²⁺); 2) перенесенням у формі атома водню ($H = H^+ + e^-$); 3) перенесенням у формі гідрид-іона ($:H^- = H^+ + 2e^-$).

Перенесення електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій відбувається у певній послідовності за допомогою низки зв'язаних з мембраною білків-переносників, що містять простетичні групи, здатні приєднувати чи віддавати один або два електрони.

Переносники електронів дихального ланцюга функціонують у складі мультиферментних комплексів, які вмонтовані у мембрани. Виділяють чотири окремих комплекси, кожен із яких здатний каталізувати перенесення електронів крізь певну ланку ланцюга (табл. 10.1). Комплекси I і II каталізують перенесення електронів на убіхінон від двох основних донорів – НАДН (комплекс I) і сукцинату (комплекс II). Комплекс III переносить електрони від відновленого убіхінону на цитохром *c*, а комплекс IV завершує ланцюг перенесенням електронів від цитохрому *c* на O_2 .

Таблиця 10.1

Функціональні компоненти дихального ланцюга мітохондрій

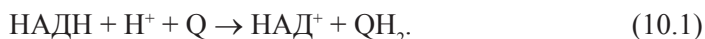
№	Комплекс / білок	Простетичні групи	Молекулярна маса, кДа	Кількість субодиниць
I	НАДН-дегідрогеназа	ФМН, Fe-S	850	44
II	Сукцинатдегідрогеназа	ФАД, Fe-S	140	4
III	Убіхінон-цитохром <i>c</i> -оксидоредуктаза	Геми, Fe-S	250	11
	Цитохром <i>c</i>	Гем	13	1
IV	Цитохромоксидаза	Геми, Cu_A , Cu_B	160	13

10.2. МУЛЬТИФЕРМЕНТНІ КОМПЛЕКСИ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА

Комплекс I переносить електрони від НАДН до убіхінону. Цей комплекс, який також називають **НАДН : убіхінон-оксидоредуктазою**, або **НАДН-дегідрогеназою**, складається зі 44 різних поліпептидних ланцюгів і флавопротеїну, що містить простетичну групу ФМН і ферум-сульфурні групи. Білки комплексу I мають L-подібну форму і пронизують внутрішню мембрану мітохондрії (рис. 10.1), контактуючи як із міжмембранним простором, так і з матриксом мітохондрій.

Комплекс I дихального ланцюга мітохондрій переносить відновлювальні еквіваленти від НАДН до убіхінону.

Як наведено на рис. 10.1, комплекс I каталізує два одночасних і спряжених між собою процеси. Перший із них – це екзергонічне перенесення гідрид-іона від НАДН і протона з матриксу на убіхінон у внутрішній мембрані мітохондрій:



Із ним спряжений другий процес – ендергонічне перенесення чотирьох протонів із матриксу мітохондрій у міжмембранний простір. Отже, комплекс I

функціонує як протонна помпа, що використовує енергію перенесення двох електронів (у складі гідрид-іона H^-) для транспорту чотирьох протонів (H^+) із матриксу в міжмембранний простір. У цьому разі на внутрішній мембрані мітохондрій акумулюються заряди: додатний (ззовні) і від'ємний (з боку матриксу; рис. 10.1).

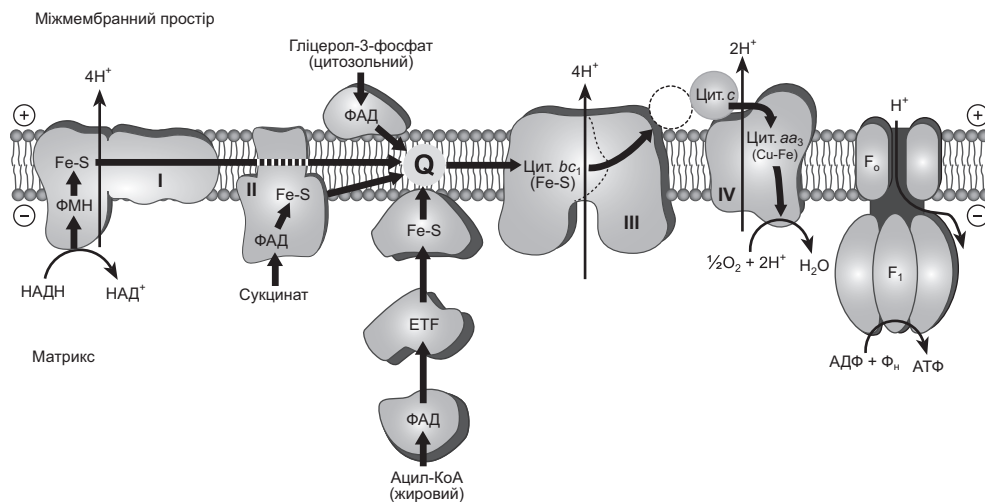


Рис. 10.1. Дихальний ланцюг мітохондрій [модифіковано за Нельсон, Кокс, 2015]

Отже, процеси, що відбуваються у комплексі I, можна описати таким сумарним рівнянням:



де $\text{H}^+_{\text{в}}$ і $\text{H}^+_{\text{з}}$ – протони з внутрішнього та зовнішнього боку внутрішньої мембрани мітохондрій відповідно. Варто зазначити, що, на відміну від відновлювальних еквівалентів, ні НАДН, ні НАДФН не можуть проникати крізь внутрішню мембрану мітохондрій.

Відновлення НАД^+ до НАДН відбувається за окиснення таких субстратів як піруват, ізоцитрат, α -кетоглутарат, малат та ін. Такі субстрати називають НАД-залежними. Отже, внаслідок окиснення НАД-залежних субстратів вивільнена енергія передається на комплекс I дихального ланцюга.

Послідовність перенесення електронів у дихальному ланцюгу досліджують за допомогою інгібіторного аналізу. Спеціальні інгібітори інсектицид **ротенон** і барбітурат **барбаміл** блокують перенесення електронів від НАДН до КоQ I, відповідно, окиснення НАД-залежних субстратів.

Флавопротеїни комплексу I мають міцно зв'язану простетичну групу у формі флавінового мононуклеотиду (ФМН; рис. 10.1). Якщо окислена форма ФМН приймає один електрон, утворюється напівхінонова форма (ФМНН^\bullet), а якщо приймає два електрони, утворюється повністю відновлена форма (ФМНН_2).

Перенесення електронів на флавопротеїн відбувається тому, що він має вищий відновний потенціал, ніж НАДН, від якого надходять електрони. Якщо для НАД стандартний відновний потенціал не залежить від взаємодії з білками комплексу, то стандартний відновний потенціал ФМН змінюється за приєднання до білка. Справа в тому, що білки деформують електронні орбіталі флавінового кільця та змінюють стабільність його відновлених чи окислених форм.

Флавіновий мононуклеотид – це не реагент чи продукт реакції перенесення електронів, а частина активного центру флавопротеїну, яка бере участь або в одно-, або в двохелектронному перенесенні. Інші деталі окисно-відновних процесів за участі НАД, ФМН, а також ФАД описано у розділі 6.

Комплекс II переносить електрони від сукцинату до убіхінону, тому його називають **сукцинатдегідрогеназою**, або **сукцинат-КоQ-редуктазою**. Цей комплекс складається з п'яти простетичних груп двох типів і чотирьох різних протеїнових субодиниць (A, B, C і D; рис. 10.2).

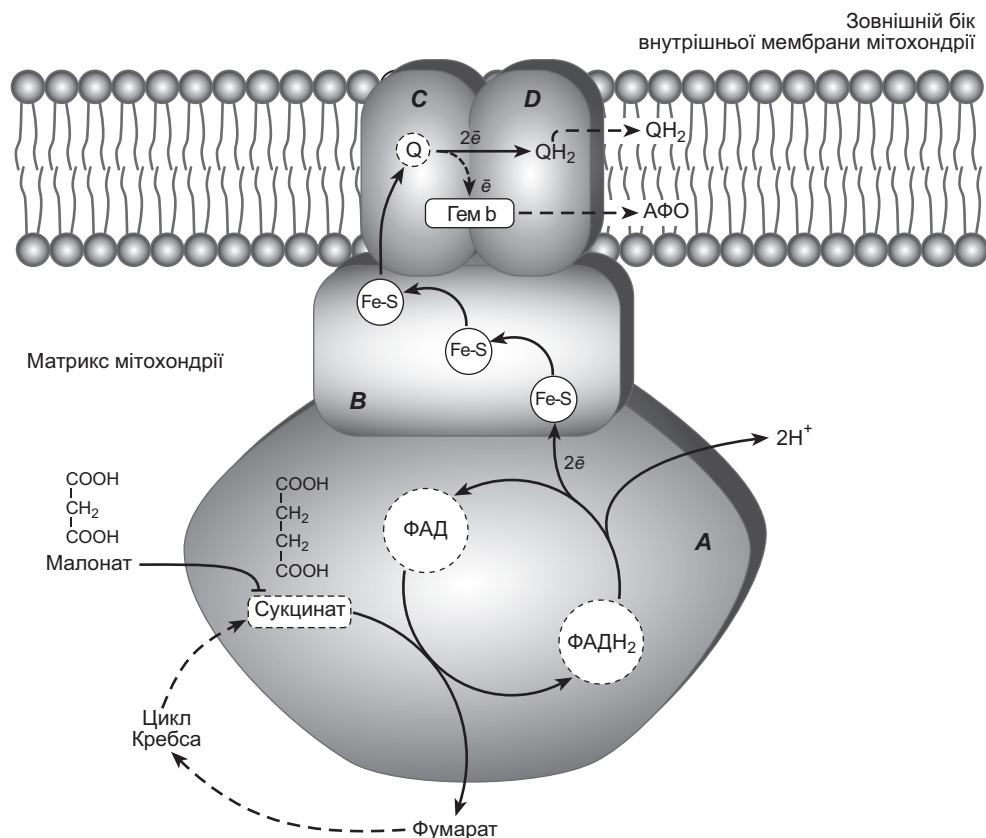


Рис. 10.2. Транспорт електронів за допомогою сукцинатдегідрогенази

Субодиниці A і B зорієнтовані у матрикс мітохондрій. Субодиниця A містить центр зв'язування субстрату – сукцинату, а також зв'язаний ФАД, який

має окисно-відновні властивості, подібні до ФМН. За окислення сукцинату (в циклі Кребса) утворюється фумарат, а електрони відновлюють ФАД до ФАДН₂. Далі два електрони від ФАДН₂ передаються по чергові через три Fe-S-центри в субодиниці В. Субодиниці С і D – це інтегральні мембранні білки, кожен із яких має три трансмембранні спіралі. Вони містять гем *b* і центр зв'язування убіхінону, який є кінцевим акцептором двох електронів у реакції, що каталізується комплексом II.

Сукцинат називають ФАД-залежним субстратом. Як блокатор зв'язування сукцинату зі сукцинатдегідрогеназою використовують подібний за будовою **малонат**. Детальніше про сукцинатдегідрогеназу див. у розділі 13.

У комплексі II дихального ланцюга сукцинат окислюється сукцинатдегідрогеназою, яка містить флавопротеїн, що передає електрони через три Fe-S-центри на убіхінон.

Донором електронів для дихального ланцюга можуть бути не тільки НАД- і ФАД-залежні субстрати окислення, а й продукт β-окислення жирних кислот – ацил-КоА. У цьому разі електрони потрапляють у дихальний ланцюг одразу на убіхінон, минаючи комплекси I і II. Зокрема, за окислення ацил-КоА, яке каталізує ацил-КоА-дегідрогеназа, електрони переносяться на ФАД цієї дегідрогенази, а далі – через електронно-транспортний флавопротеїн (ЕТФ) на ЕТФ: убіхінон-оксидоредуктазу (рис. 10.1). Цей фермент, який містить Fe-S-центр, переносить електрони безпосередньо в дихальний ланцюг, відновлюючи убіхінон.

Відновлювальні еквіваленти можуть надходити також із цитозоллю, а не тільки з матриксу мітохондрій. Цитозольний гліцерол-3-фосфат, який утворюється з гліцеролу, вивільненого під час розщеплення триацилгліцеролу, окислюється гліцерил-3-фосфатдегідрогеназою (рис. 10.1). Цей фермент є флавопротеїном, що розташований із зовнішнього боку внутрішньої мітохондріальної мембрани і передає електрони на убіхінон дихального ланцюга.

Убіхінон, або **кофермент Q** – це жиророзчинний бензохінон, який містить довгий ізопреноїдний ланцюг. Убіхінон може прийняти один або два електрони. У першому разі утворюється напівхіноновий радикал **убісеміхінон** ([•]QH), а у другому – повністю відновлена форма переносника **убіхінол** (QH₂; рис. 10.3). Повне відновлення убіхінону відбувається у два етапи й потребує двох електронів і двох протонів. Завдяки своїм гідрофобним властивостям і невеликому розміру, убіхінон може вільно дифундувати у ліпідному шарі внутрішньої мітохондріальної мембрани. Він переносить відновлювальні елементи між електронними переносниками, які є немобільними інтегральними білками у цій мембрані – між комплексом I і комплексом III або комплексом II і комплексом III. Крім того, убіхінон відіграє важливу роль у спряженні потоку електронів з переміщенням протонів, бо переносить і протони, і електрони.

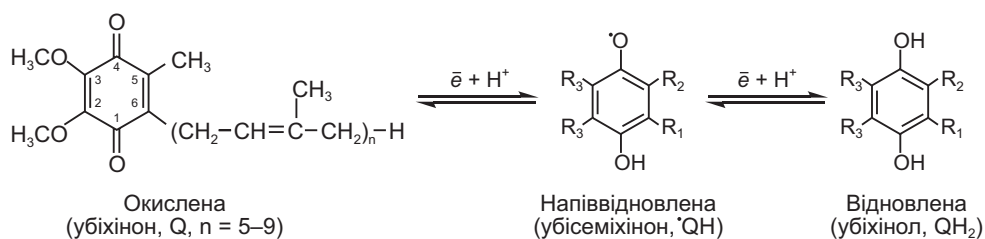


Рис. 10.3. Окисно-відновні форми убіхінону

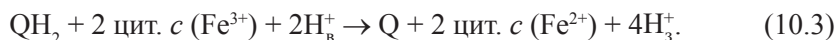
Комплекс III дихального ланцюга переносить електрони від убіхінолу до цитохрому *c* (рис. 10.4). Цей комплекс також називають **убіхінон: цитохром *c*-оксидоредуктазою**, чи комплексом **цитохромів *bc*₁**, оскільки до його складу одночасно входять цитохром *b* і цитохром *c*₁. Комплекс III спрягає перенесення електронів і транспорт протонів із матриксу в міжмембранний простір.

Цей комплекс є гомодимером. До складу кожного мономеру входить 11 субодиниць, зокрема, цитохром *b*, ферум-сульфурний білок Ріске і цитохром *c*₁. Цитохром *b* має два геми (*b*_L and *b*_H), цитохром *c*₁ – тільки однойменний гем, а білок Ріске містить Fe-S-центр. Цитохром *c*₁ і ферум-сульфурний білок Ріске можуть взаємодіяти з цитохромом *c* у міжмембранному просторі.

Комплекс має центр зв'язування убіхінону і центр зв'язування убіхінолу – Q_p і Q_N, які блокуються відповідно **антиміцином А** та **міксотіазолом** (рис. 10.4). Протигрибковий антибіотик антиміцин А витісняє убіхінон та інгібує його відновлення. Продуцент мікобактерій міксотіазол блокує перенесення електронів на ферум-сульфурний центр білка Ріске. За блокування комплексу III усі переносники електронів, що розташовані “перед” цитохромами *b* і *c*₁ у дихальному ланцюгу (НАДН, КоQ), залишатимуться у відновленому стані, а цитохроми *a* і *a*₃ комплексу IV перебуватимуть в окисленому стані.

Перенесення електронів і протонів у комплексі III називають **Q-циклом**. У ньому по чергову окислюються дві молекули QH₂ у ліпідному шарі внутрішньої мембрани мітохондрій біля її зовнішньої поверхні. У результаті від кожної молекули QH₂ один електрон переноситься через Fe-S-центр білка Ріске і далі через цитохром *c*₁ комплексу на цитохром *c*, який виконує функцію рухомого переносника у міжмембранному просторі мітохондрії. Інший електрон від першої молекули убіхінолу передається через геми *b*_L і *b*_H цитохрому *b* на молекулу убіхінону (Q) біля внутрішньої поверхні мембрани, внаслідок чого утворюється убісеміхінон ($\cdot QH$). Для цього відновлення використовується протон із матриксу, що додатково посилює трансмембранний протонний градієнт. Електрон від другої молекули убіхінолу використовується таким самим чином для відновлення убісеміхінону до убіхінолу (QH₂). Отже, за один цикл дві молекули убіхінолу окислюються, одна молекула – відновлюється, два електрони передаються на цитохром *c* і чотири протони вивільняються у міжмембранний простір мітохондрій.

Сумарне рівняння окисно-відновних реакцій Q-циклу є таким:



Комплекс III дихального ланцюга мітохондрій передає по одному електрону на дві молекули цитохрому *c* з вивільненням у міжмембранний простір чотирьох протонів.

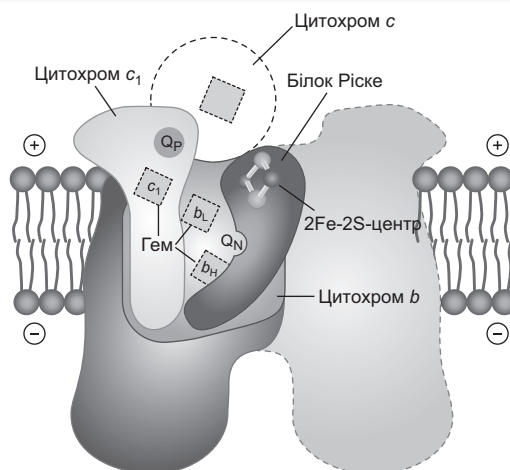


Рис. 10.4. Комплекс цитохромів bc_1 (комплекс III)

Функціонування Q-циклу забезпечує перемикання процесу перенесення електронів від двохелектронного переносника убіхінону на одоелектронні переносники цитохроми *b*, *c*₁ і *c* та пояснює стехіометрію переміщення чотирьох протонів у міжмембранний простір мітохондрій на кожну пару електронів, які переносяться через комплекс III на цитохром *c*.

Цитохром *c* – це розчинний невеликий білок із молекулярною масою 12 кДа, що міститься у міжмембранному просторі мітохондрій. Після того як його єдиний гем приймає електрон від комплексу III дихального ланцюга, цитохром *c* переміщається до комплексу IV і передає електрон на двох’ядерний Cu-центр.

Загалом цитохроми – це білки, для яких характерним є сильне поглинання видимого світла, що зумовлено наявністю ферумвмісних гемових простетичних груп. Мітохондрії містять три різних типи цитохромів, які позначають *a*, *b*, *c*. Кожен тип цитохрому у відновленій формі (Fe^{2+}) має смугу поглинання у видимому спектрі: *a* – 600 нм, *b* – 560 нм, *c* – 550 нм. Інколи до назви цитохрому додають число максимуму їхнього спектра поглинання, наприклад, цитохром b_{566} .

Геми цитохромів *a* і *b* міцно, але нековалентно зв’язані зі своїми асоційованими білками. Геми цитохромів *c*, навпаки, ковалентно зв’язуються з білками через залишки цистеїну (рис. 10.5). Стандартний відновлювальний потенціал гемового атома феруму цитохрому залежить від його взаємодії з бічними ланцюгами білка. Цитохроми типів *a* і *b*, а також більшість цитохромів типу *c* належать

до інтегральних білків внутрішньої мембрани мітохондрій, за винятком власне цитохрому *c*. Він міститься у міжмембранному просторі мітохондрій, де є асоційований за допомогою електростатичних взаємодій із зовнішньою поверхнею внутрішньої мембрани, оскільки має від'ємно заряджені амінокислотні залишки.

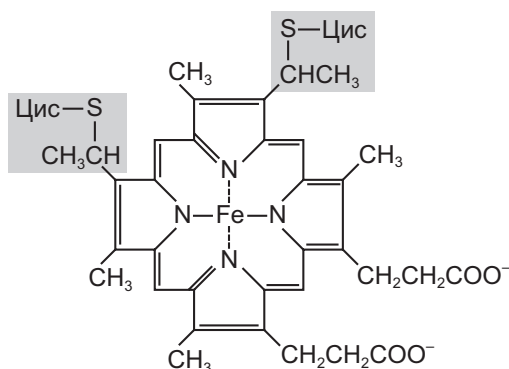


Рис. 10.5. Протетичні групи цитохрому *c*

У ферум-сульфурних білках ферум перебуває не у складі гема, а в асоціації або з неорганічними атомами сульфуру, або з атомами сульфуру залишків цистеїну. Усі ферум-сульфурні протеїни беруть участь в одноелектронних перенесеннях, під час яких один атом феруму ферум-сульфурного центру окислюється або відновлюється. У мітохондріальному перенесенні електронів беруть участь принаймні вісім Fe-S-білків. Залежно від мікрооточення феруму в молекулі білка, відновлювальний потенціал Fe-S-центрів змінюється у діапазоні від +0,65 до +0,45 В.

Комплекс IV, який ще має назву **цитохромоксидаза**, на кінцевому етапі дихального ланцюга мітохондрій переносить електрони від цитохрому *c* на кисень і відновлює його до води. Цей великий ферментний комплекс розташований у внутрішній мітохондріальній мембрані та складається з 13 субодиниць, з яких найважливішими для транспорту електронів є субодиниці I і II (рис. 10.6). Комплекс IV переносить як електрони на молекулу кисню, так і протони у міжмембранний простір мітохондрій.

Субодиниця I комплексу містить гем *a*, гем *a₃* та один купрумвмісний центр – Cu_B. Гем *a₃* і Cu_B-центр формують двох'ядерний Fe-Cu-центр. Субодиниця II має двох'ядерний Cu_A-центр, у якому два іони Cu²⁺ зв'язані SH-групами залишків цистеїну.

Електрони від цитохрому *c* переносяться до Cu_A-центру комплексу IV, далі – до гему *a*, звідти – до Fe-Cu-центру. З гемом *a₃* цього центру зв'язаний кисень, який і є кінцевим акцептором цих електронів. Субстратом реакції відновлення кисню до води комплексом IV є два протони на кожних два електрони, які надходять від цитохрому *c*. Поряд із цим, на пару перенесених електронів фермент транспортує два інших протони з матриксу до міжмембранного простору

мітохондрій. Це приводить до зростання **електрохімічного потенціалу**¹ протонів крізь внутрішню мембрану мітохондрій. Загальна реакція, яку каталізує комплекс IV, може бути записана так:

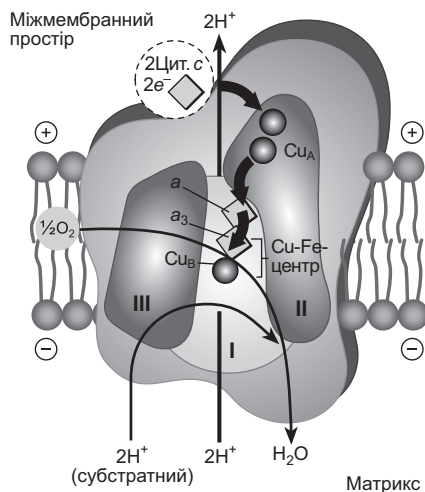
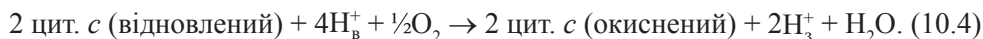


Рис. 10.6. Транспорт електронів від цитохрому c до кисню у комплексі IV

Окисно-відновні центри комплексу IV здатні переносити тільки по одному електрону, і для відновлення одної молекули кисню до води необхідно, щоб були перенесені від цитохрому c до Fe-Cu-центру чотири електрони. Коли через комплекс IV переносяться тільки два електрони, проміжні продукти цього процесу залишаються міцно зв'язаними з комплексом доти, поки не надійдуть наступних два електрони, і кисень (O_2) повністю не перетвориться на дві молекули H_2O . У разі недовідновлення проміжних продуктів є небезпека утворення високореактивних сполук (наприклад, гідроген пероксиду), які можуть пошкоджувати клітину (див. розділ 12).

Ціанідний аніон CN^- ефективно блокує перенесення електронів у комплексі IV. Вдихання HCN або дія солей KCN призводить до швидкої смерті через зв'язування CN^- із катіоном феруму в цитохромі a_3 і пригнічення активності цитохромоксидази. За такого блокування усі переносники електронів у дихальному ланцюгу перебуватимуть у відновленій формі та не піддаватимуться окисненню.

¹ Загалом — це термодинамічна функція, що характеризує стан компонента, який складається із заряджених частинок (електронів, іонів). Потенціал визначають як приріст будь-якого з термодинамічних потенціалів системи після введення в неї однієї зарядженої частинки за сталих решти усіх змінних, від яких залежить цей потенціал. Отже, різниця електрохімічних потенціалів між двома точками є енергією, яка буде виділена в системі за переміщення частинки між ними. Електрохімічний потенціал є частковим випадком хімічного потенціалу, який кількісно (у Дж/моль) характеризує прагнення термодинамічних систем до встановлення рівноваги

Порядок перенесення електронів від НАДН до молекули кисню є такий:
 $\text{НАДН} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{цитохроми } bc_1 \rightarrow \text{цитохром } c \rightarrow \text{цитохром } a \rightarrow \text{цитохром } a_3 \rightarrow \text{O}_2$.

10.3. ПРОТОННИЙ ГРАДІЄНТ ЯК ФОРМА ЗБЕРІГАННЯ ЕНЕРГІЇ

Переносники дихального ланцюга функціонують у порядку зростання відновного потенціалу, оскільки електрони переходять від переносників із нижчим значенням E'^0 до переносників із вищим E'^0 . Експериментально визначені стандартні відновні потенціали переносників електронів у дихальному ланцюгу представлені в табл. 5.1.

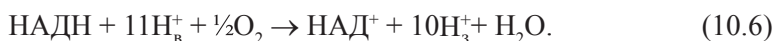
Енергія перенесення електронів з високою ефективністю зберігається у протонному градієнті. Сумарна реакція перенесення двох електронів від НАДН через дихальний ланцюг на кисень є високоекзергонічною. Для окисно-відновної пари $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ значення E'^0 становить $-0,320 \text{ В}$, а для пари $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ – $+0,816 \text{ В}$. Тому $\Delta E'^0$ для реакції окиснення НАДН має значення $1,136 \text{ В}$ ($0,816 \text{ В} - -0,320 \text{ В}$). У цьому разі зміну стандартної вільної енергії обчислюють за формулою

$$\Delta G'^0 = -nF\Delta E'^0, \quad (10.5)$$

і за перенесення від НАДН $\Delta G'^0$ становить -220 кДж/моль .

За окиснення сукцинату величина зміни стандартної вільної енергії перенесення електронів від нього на O_2 становить -150 кДж/моль ($\Delta E'^0$ для пари фумарат/сукцинат = $0,031 \text{ В}$). За реальних, а не стандартних умов, величина зміни вільної енергії реакції є навіть більшою.

Більша частина енергії транспорту електронів використовується на транспорт протонів із мітохондріального матриксу. На кожну пару електронів, які переносяться на O_2 , чотири протони транспортуються комплексом I, чотири протони – комплексом III, і два протони – комплексом IV (рис. 10.1). Сумарне рівняння для цього процесу виглядає так:



Перенесення протонів на зовнішній бік внутрішньої мембрани мітохондрій створює його електрохімічний градієнт, який зберігає більшу частину вивільненої енергії. Енергію такого градієнта називають **протонорушійною силою**, яка містить дві компоненти: 1) енергію хімічного градієнта протонів, зумовленого різницею рН (ΔpH) між двома середовищами, розділеними мембраною; 2) енергію градієнта електричного поля $\Delta \psi$, оскільки транспортування протона в міжмембранний простір не компенсується переміщенням від'ємного заряду

в матрикс мітохондрій. У результаті виникає протонорушійна сила (ΔG_{H^+}), яку можна обчислити за такою формулою:

$$\Delta G_{H^+} = RT \ln ([H_3^+]/[H_b^+]) + F\Delta\psi = 2,3RT \Delta pH + F\Delta\psi. \quad (10.6)$$

Під час інтенсивного дихання електричний потенціал у мітохондріях становить -150 ... -200 мВ, а різниця рН між більш лужним матриксом і кислішим міжмембранним простором становить 0,75 одиниці. Отже, зміна вільної енергії за цих умов є близькою до 20 кДж на один протон. Оскільки за перенесення двох електронів від НАДН на O_2 назовні виноситься 10 протонів, то сумарна величина зміни вільної енергії дорівнює 200 кДж. Тобто з тих 220 кДж, що вивільняються у разі окиснення одного моля НАДН (див. вище), 200 кДж зберігаються у формі градієнта протонів.

У більшості новонароджених ссавців, а також дорослих звірів, які впадають у зимову сплячку, є особливий тип жирової тканини – **бурий жир**. У цій тканині електрохімічний градієнт протонів, що формується внаслідок транспорту електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, слугує не для синтезу АТФ, а для теплоутворення і підтримання температури тіла. Бурий колір тканини зумовлений, зокрема, великою кількістю мітохондрій. Зеленого кольору цитохроми та червоного кольору гемоглобін крові разом і надають цій тканині забарвлення. Вона міститься навколо кровоносних судин, які постачають кров'ю життєво важливі органи: головний мозок, органи очеревини, підшлункову залозу, нирки. Завдяки бурому жиру ці органи у немовлят не охолоджуються в середовищі з низькою температурою.



Принципова особливість мітохондрій бурого жиру полягає в тому, що у їхній внутрішній мембрані є специфічний інтегральний білок **термогенін**, відомий також як роз'єднувальний білок (UCP). Він забезпечує альтернативний спосіб для повернення протонів у матрикс мітохондрій, внаслідок чого енергія протонного градієнта розсіюється у вигляді тепла.

У мітохондріях термогенін активується жирними кислотами, але інгібується нуклеотидами (наприклад, АДФ чи ГДФ). У процес активації залучений нейромедіатор симпатичної нервової системи норадреналін, який активує β_3 -адренорецептори плазматичної мембрани. Як наслідок, α -субодиниця G_s -білка активує аденілатциклазу, яка каталізує утворення цАМФ з АТФ. Внутрішньоклітинний месенджер цАМФ активує протеїнкіназу А (вивільняючи її каталітичну субодиницю), яка фосфорилує і, відтак, активує триацилгліцеролліпазу. Цей фермент відщеплює від триацилгліцеролів жирні кислоти, які й активують термогенін.

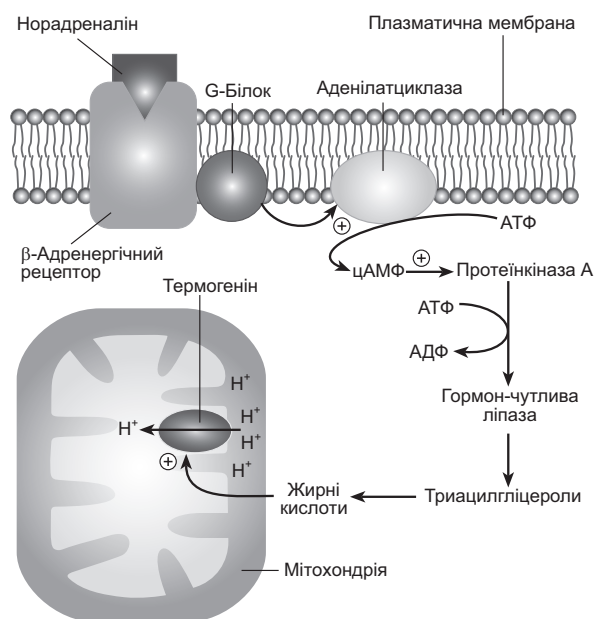


Рис. 10.7. Активація теплопродукції через мітохондріальний термогенін

Підсумки 10. БУДОВА І ФУНКЦІЇ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ

- У мітохондріях гідрид-іони, відщеплені від субстратів НАД-залежними дегідрогеназами, передають електрони у дихальний (електрон-транспортний) ланцюг, який переносить ці електрони на кисень, відновлюючи його до води.
- Відновлювальні еквіваленти від усіх НАД-залежних реакцій дегідрогенізації переносяться на комплекс I дихального ланцюга мітохондрій. Далі відновлювальні еквіваленти переносяться через низку Fe-S-центрів на убіхінон.

- Сукцинат окиснюється сукцинатдегідрогеназою, яка і є комплексом II дихального ланцюга мітохондрій. Цей комплекс містить флавопротеїн, що передає електрони через декілька Fe-S центрів на убіхінон. Електрони, відщеплені у процесі окиснення жирних кислот, переносяться на убіхінон за участю електронтранспортного флавопротеїну.
- Продукти жирового метаболізму ацил-КоА та гліцерол-3-фосфат передають електрони безпосередньо на кофермент Q дихального ланцюга.
- Убіхінон передає електрони до комплексу III дихального ланцюга. У цьому комплексі електрони транспортуються двома різними способами: через геми b_L та b_H цитохрому b і через Fe-S-центр і гем цитохрому c_1 . Цитохром c , розташований у міжмембранному просторі, переносить по одному електрону до комплексу IV дихального ланцюга мітохондрій.
- Електрони від Cu_A -центру комплексу IV дихального ланцюга мітохондрій передаються до гему a , звідти – до Fe-Cu-центру. З гемом a_3 цього центру зв'язаний кисень, який і є кінцевим акцептором цих електронів.
- Енергія потоку електронів зберігається завдяки спряженому (з переміщенням електронів) транспортуванню протонів у міжмембранний простір мітохондрій, унаслідок чого виникає протонорухлива сила.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Окисно-відновні реакції у НАДН-дегідрогеназному комплексі.** Цей комплекс мітохондріального дихального ланцюга каталізує наведені нижче реакції, де E – фермент:
 - $\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{E-ФМН} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{E-ФМНН}_2$;
 - $\text{E-ФМНН}_2 + 2\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{E-ФМН} + \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+$;
 - $2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{Q} \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{QH}_2$.
 Для кожної з трьох реакцій визначити, що є а) донором електронів; б) акцептором електронів; в) спряженою редокс-парою; г) відновником; д) окисником.
- Кількість протонів у одній мітохондрії.** За перенесення електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій протони виходять із матриксу в міжмембранний простір і формують градієнт рН. Зворотна дифузія протонів назад у матрикс є рушійною силою для синтезу АТФ. Якщо у мітохондріях, суспендованих у середовищі з рН 7,4, відбувається синтез АТФ з АДФ, то рН матриксу в цьому разі зростає до 7,7.
 - Обчислити, як за цих умов змінюється концентрація H^+ у міжмембранному та внутрішньому середовищі мітохондрій.

- Б) Розрахувати енергетичну вартість різниці концентрацій протонів у мембрані мітохондрій за формулою:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{C_2}{C_1} \right) + zF\Delta\psi,$$

де C_2 і C_1 – концентрації протонів; z – заряд іона; F – стала Фарадея; $\Delta\psi$ – транс-мембранний електричний потенціал (у В).

- В) Обчислити кількість протонів у функціонуючій мітохондрії гепатоцита, припустивши, що її діаметр 1,5 мкм.
- Г) Чи є градієнт рН достатнім джерелом енергії для окисного фосфорилування?
- 3. Відновленість переносників електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій.** Оцінити, яким буде ступінь окиснення убіхінону, цитохромів b , c_1 , c , a і a_3 за таких умов:
- А) достатньо НАДН та O_2 , але додано ціанід;
 - Б) достатньо НАДН, але запас O_2 вичерпано;
 - В) достатньо O_2 , але запас НАДН вичерпано;
 - Г) достатньо НАДН і O_2 .
- 4. Вплив ротенону й антимицину А на перенесення електронів у дихальному ланцюгу.** Ротенон сильно пригнічує активність НАДН-дегідрогенази в мітохондріях риб і комах. Антимицин А сильно пригнічує окиснення убіхінолу.
- А) Чому ротенон є смертельною отрутою для комах і риб?
 - Б) Чому антимицин діє як отрута?
 - В) Який з інгібіторів – ротенон чи антимицин А – є сильнішою отрутою?
- 5. Розрахунок зміни стандартної вільної енергії за перенесення пари електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій (приклад 1).** Для окисно-відновної пари (цитохром $b - Fe^{3+}$) / (цитохром $b - Fe^{2+}$) стандартний відновний потенціал ($\Delta E'^0$) становить +0,007 В, а для пари (цитохром $a_3 - Fe^{3+}$) / (цитохром $a_3 - Fe^{2+}$) це значення – +0,550 В. Розрахувати зміну $\Delta G'^0$ за перенесення пари електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій від цитохрому b до цитохрому a_3 за формулою $\Delta G'^0 = -nF\Delta E'^0$. (Число Фарадея = 96,5 кДж/В × моль):
- 1) -105 кДж/моль;
 - 2) +220 кДж/моль;
 - 3) -110 В;
 - 4) -96,5 кДж/В × моль.
- 6. У еукаріотів ферменти дихального (електронтранспортного) ланцюга розташовані:**
- 1) у цитоплазмі;
 - 2) у плазматичній мембрані бактерій;
 - 3) у зовнішній мембрані мітохондрій;
 - 4) у внутрішній мембрані мітохондрій.
- 7. Перенесення електронів із цитохрому c на кисень каталізує:**
- 1) НАДН : убіхінон-оксидоредуктаза;
 - 2) сукцинат : убіхінон-оксидоредуктаза;
 - 3) убіхінол : цитохром c -оксидоредуктаза;
 - 4) цитохром c : кисень-оксидоредуктаза.

8. Послідовність компонентів дихального ланцюга зумовлена:

- 1) величинами їхніх окисно-відновних потенціалів;
- 2) величинами їхніх молекулярних мас;
- 3) спорідненістю до електронів;
- 4) розмірами молекул.

9. Розрахунок зміни стандартної вільної енергії за перенесення пари електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій (приклад 2). Для окисно-відновної пари НАД⁺/НАДН стандартний відновний потенціал ($\Delta E'^0$) становить -0,320 В, а для пари O₂/H₂O це значення – +0,816 В. Розрахувати $\Delta G'^0$ за перенесення пари електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій від НАДФ до O₂ за формулою $\Delta G'^0 = -nF \times \Delta E'^0$ (число Фарадея = 96,5 кДж/В × моль):

- 1) -220 кДж/моль;
- 2) -150 кДж/моль;
- 3) +220 кДж/моль;
- 4) -96,5 кДж/В × моль.

10. Вибрати правильну послідовність цитохромів за перенесення електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій:

- 1) $bc_1 \rightarrow c \rightarrow a_3 \rightarrow a$;
- 2) $a_3 \rightarrow a \rightarrow c \rightarrow bc_1$;
- 3) $bc_1 \rightarrow c \rightarrow a \rightarrow a_3$;
- 4) $a \rightarrow a_3 \rightarrow bc_1 \rightarrow c$.

11. Вибрати правильну послідовність переносників електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій:

- 1) сукцинат → ФАД → убіхінон → цитохром bc_1 → цитохром c → цитохром a → цитохром a_3 → O₂;
- 2) НАД → ФМН → убіхінон → цитохром bc_1 → цитохром c → цитохром a → цитохром a_3 → O₂;
- 3) НАД → ФАД → убіхінон → цитохром bc_1 → цитохром c → цитохром a → цитохром a_3 → O₂;
- 4) сукцинат → ФМН → убіхінон → цитохром bc_1 → цитохром c → цитохром a → O₂ → цитохром a_3 .

12. Який переносник електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій може переміщатись у ліпідному шарі мембрани?

- 1) убіхінол;
- 2) кофермент Q;
- 3) цитохром c ;
- 4) цитохром a_3 .

13. Який переносник електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій локалізований на зовнішньому боці внутрішньої мембрани?

- 1) сукцинатдегідрогеназа;
- 2) кофермент Q;
- 3) цитохром c ;
- 4) цитохром a_3 .

14. У якій формі передаються електрони від НАДН у дихальному ланцюгу мітохондрій?

- 1) гідрид-іона;
- 2) H^- ;
- 3) протона;
- 4) H^+ .

**ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

- Мак-Мюррей У.* Обмен веществ у человека. – М.: Мир, 1980. – 368 с.
- Рэкер Э.* Биоэнергетические механизмы: Новые взгляды. – Москва: Мир, 1979. – 216 с.
- Скулачев В.П.* Биоэнергетика: Мембранные преобразователи энергии. – Москва: Высш. школа, 1989. – 271 с.
- Babcock G.T., Wickström M.* Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration // *Nature*. – 1992. – Vol. 356. – P. 301–309.
- Crestanello J.A., Doliba Nic., Doliba Nat. et al.* Effect of coenzyme Q_{10} supplementation on mitochondrial function after myocardial ischemia reperfusion // *J. Surg. Res.* – 2002. – Vol. 102, N 2. – P. 221–228.
- Gray M.W., Berger G., Lang B.F.* Mitochondrial Evolution // *Science*. – 1999. – Vol. 283. – P. 1476–1481.
- Karp G.* Cell and Molecular Biology. – 5th ed. – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2008. – 194 p.
- Nelson D., Cox M.* Lehninger Principles in Biochemistry. – 3rd ed. – New York: Worth Publisher, 2000. – 1150 p.
- Nicholls D.G., Ferguson S.J.* Bioenergetics. – New York: Academic Press, 2013. – 434 p.

СИНТЕЗ АТФ У ПРОЦЕСІ ОКИСНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ

- Теорії спряження дихання й окисного фосфорилювання
- Будова АТФ-синтази
- Ротаційний каталіз синтезу АТФ
- Співвідношення між спожитим O_2 та синтезом АТФ

Кількості енергії, що вивільняється за перенесення однієї пари електронів дихальним ланцюгом мітохондрій і зберігається у вигляді протонорушійної сили, більш ніж достатньо для забезпечення синтезу однієї молекули АТФ. Проте виникає інше питання – яким є механізм спряження процесів перенесення протонів у міжмембранний простір і окисного фосфорилювання? У 1940 р. український біохімік Володимир Беліцер встановив, що за відновлення одного атома кисню (або за перенесення пари електронів від субстрату на кисень) у тканинах організму використовуються три неорганічних фосфати, а відношення зв'язаного неорганічного фосфату до поглинутого кисню (коефіцієнт P/O) дорівнює приблизно 3. Тобто у дихальному ланцюзі мітохондрій є як мінімум три пункти спряження процесів дихання й окисного фосфорилювання, де неорганічний фосфат бере участь у синтезі АТФ.

11.1. ТЕОРІЇ СПРЯЖЕННЯ ДИХАННЯ Й ОКИСНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ

Є кілька гіпотез для пояснення механізму спряження дихання й окисного фосфорилювання у процесі синтезу АТФ. Гіпотеза **хімічного спряження** вперше була висловлена у 1953 р. Едвардом Слейтером. Вона ґрунтується на уявленнях про подібність механізмів окисного та субстратного фосфорилювання.

Згідно з цією гіпотезою, спряжуючим чинником є хімічний посередник, який утворюється під час транспорту електронів, зберігає енергію у вигляді макроергічного зв'язку і надалі використовується для синтезу АТФ:

$$A_{\text{від}} + I + B_{\text{ок}} = B_{\text{від}} + A_{\text{ок}} \sim I; \quad (10.1)$$

$$A_{\text{ок}} \sim I + \text{АДФ} + \Phi_{\text{н}} = A_{\text{ок}} + I + \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O}, \quad (10.2)$$

де A і B – редокс-компоненти дихального ланцюга у відновленій ($A_{\text{від}}$, $B_{\text{від}}$) та окисненій ($A_{\text{ок}}$, $B_{\text{ок}}$) формах; I – хімічний посередник (інтермедіат).

Ділянки дихального ланцюга, які мають редокс-компоненти A і B та посередник I , мали би створювати спряжені центри. На роль посередника I гіпотетично пропонували одну зі субодиниць АТФ-синтази. Передбачалася наявність трьох спряжених центрів у дихальному ланцюгу. Але гіпотеза не отримала достатнього експериментального підтвердження, оскільки хімічних комплексів типу $A_{\text{ок}} \sim I$ не було знайдено.



Пол Боєр
(1918–2018)

Конформаційна, або механохімічна гіпотеза спряження вперше була висловлена у 1964 р. Полом Боєром і доповнена у 1972 р. Девідом Гріном. Вони вважали, що спряжуючим чинником є не окрема енергетично збагачена хімічна сполука, а ділянка певної білкової молекули в енергетично збагаченому конформаційному стані. Перехід у цей стан, згідно з гіпотезою, спряжений із транспортом електронів у дихальному ланцюгу, а вільна енергія, яка зберігається у вигляді енергетично збагаченого конформаційного стану, використовується для синтезу АТФ. В основі таких конформаційних змін лежить, можливо, просторове наближення карбоксильних і сульфгідрильних груп молекули білка з утворенням тіоефірного зв'язку.

Відповідно до цієї моделі транспорт електронів дихальним ланцюгом спричиняє конформаційні зміни одного з комплексів дихального ланцюга у формі механічного і електричного напруження. Подібні напруження спричиняють такі ж зміни в АТФ-синтазному комплексі. Відновлення попередньої конформації АТФ-синтази (а також комплексів дихального ланцюга) і супроводжується синтезом АТФ.

Експериментальні дані засвідчують структурні зміни у внутрішніх мембранах мітохондрій за їхньої енергізації завдяки руху електронів. Однак залишається нез'ясованим, як локальне перенесення електронів дихальним ланцюгом позначається на ступені енергізації великої ділянки мембрани та яким є фізичний механізм використання енергізованого стану мембрани для синтезу молекул АТФ. Крім того, проти конформаційної гіпотези свідчить той факт, що час конформаційних змін молекул, які рееструють за допомогою спектральних методів, не збігається з часом окисного фосфорилування.

Хеміосмотична гіпотеза (теорія) була висловлена англійським біоенергетиком Пітером Мітчелом у 1961 р. Згідно з його гіпотезою, спряжуючим чинником між окисненням (транспортом електронів) і фосфорилюванням є електрохімічний протонний градієнт (див. рис. 10.1). Мітчел назвав свою теорію “хеміосмотичною”, оскільки вона ґрунтується на описі реакцій, які забезпечують одночасний спряжений перебіг хімічної реакції і транспортного процесу (осмосу). Відповідно до хеміосмотичної теорії за транспорту кожної пари електронів по дихальному ланцюгу від НАДН до кисню з матриксу перекачується десять протонів H^+ , а в матриксі залишається десять аніонів OH^- . Транспорт протонів виконують три спряжених пункти внутрішньої мембрани мітохондрій. Отже, внутрішня мембрана мітохондрій слугує енергетичним механізмом, який перетворює енергію окиснення енергетичних субстратів за посередництва НАДН (чи ФАДН₂) на енергію фосфатних зв’язків АТФ.



Пітер Мітчел в Інституті біофізики в Пушино, 1992 р. Зліва направо: В.П. Скулачов, П. Мітчел, А.М. Бабський, М.М. Кондрашова, О.Б. Окон. Фото С.Е. Шноля

Низка експериментів, проведених Мітчелом і співроб., підтвердила, що дихальний ланцюг переносить протони на зовнішній бік внутрішньої мембрани мітохондрій і створює різницю електрохімічних потенціалів іонів гідрогену:

$$\Delta\mu_{H^+} = 2,3RT \lg \frac{[H^+]_3}{[H^+]_b} + F\Delta\psi, \quad (11.3)$$

де $[H^+]_3$ і $[H^+]_b$ – концентрація протонів відповідно у міжмембранному просторі й матриксі мітохондрій; $\Delta\psi$ – різниця електричних потенціалів по обидва боки внутрішньої мембрани; F – число Фарадея.

Загальна протонорушійна сила $\Delta\phi$ становить:

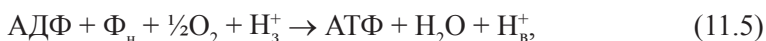
$$\Delta\phi = \Delta\psi + \frac{2,3RT}{F} \Delta pH, \quad (11.4)$$

де ΔpH – різниця між рН матриксу та рН міжмембранного простору мітохондрій. Із цих формул випливає, що протонорушійна сила складається із двох чинників – електричного мембранного потенціалу $\Delta\psi$ і різниці рН двох

середовищ – матриксу та міжмембранного простору. За дихання енергізованих мітохондрій, коли $\Delta p\text{H} = 1$, а мембранний потенціал $\Delta\psi = -160$ мВ, протонорушійна сила $\Delta\phi$ становить приблизно -220 мВ.

Важливе місце у хеміосмотичній теорії займає стехіометричне співвідношення H^+/\bar{e} , тобто співвідношення кількості протонів, які переносяться у міжмембранний простір мітохондрій, до кількості електронів, які переносяться по дихальному ланцюгу. У моделі редокс-залежної протонної помпи для пояснення механізму генерації використовують стехіометрію $\text{H}^+/\bar{e} = 1 : 1$. Відомо, що для утворення одного макроергічного зв'язку АТФ необхідно $30,5$ кДж/М енергії, тому енергії двох протонів, які транспортуються у міжмембранний простір мітохондрій ($7,04 \times 10^{-23}$ кДж), цілком достатньо для синтезу однієї молекули АТФ з АДФ і неорганічного фосфату.

Згідно з теорією Мітчела, енергія електрохімічного градієнта протонів, який утворюється завдяки різниці в концентрації протонів та розділенню зарядів між зовнішнім і внутрішнім боком мітохондріальної мембрани, використовується для синтезу АТФ під час пасивного (за градієнтом) переміщення протонів назад у матрикс крізь протонну пору в молекулі АТФ-синтази. Щоб підкреслити визначальну роль протонорушійної сили, рівняння синтезу АТФ інколи записують у такий спосіб:



де H_3^+ і $\text{H}_{\text{в}}^+$ – концентрації протонів на зовнішньому та внутрішньому боках внутрішньої мембрани мітохондрій.

Хеміосмотична теорія Пітера Мітчела пояснює механізми спряження процесів клітинного дихання й окисного фосфорилювання АДФ, коли енергія потоку електронів у дихальному ланцюгу використовується для транспорту протонів крізь внутрішню мембрану в міжмембранний простір мітохондрій, унаслідок чого виникає протонорушійна сила, яка і є джерелом енергії для синтезу АТФ.

На рис. 11.1 наведено експериментальні криві поглинання кисню та синтезу АТФ, на основі яких можна проілюструвати спряження транспорту електронів у дихальному ланцюгу з окисним фосфорилюванням АДФ. Коли до ізольованих мітохондрій в ізотонічному середовищі додати АДФ, $\Phi_{\text{н}}$ та субстрат окиснення (наприклад, сукцинат чи піруват), то можна зареєструвати інтенсивність трьох ключових процесів: поглинання O_2 , окиснення субстрату й синтезу АТФ. За блокування IV комплексу дихального ланцюга мітохондрій ціанідом (CN^-) дихання цих органел і окисне фосфорилювання АДФ стрімко знизиться майже до мінімуму (рис. 11.1, А). З іншого боку, якщо синтез АТФ не відбувається, то перенесення електронів у дихальному ланцюгу також буде заблоковано.

Спряженість дихання і синтезу АТФ можна також довести у досліді, коли ізольовані мітохондрії додають до середовища, що має субстрат окиснення, але

немає АДФ (рис. 11.1, Б). За таких обставин реєструють тільки мінімальну швидкість дихання мітохондрій, а АТФ не синтезується взагалі.

Спряження окиснення та фосфорилювання можна також довести, використовуючи **олігоміцин** – антибіотик, здатний зв'язуватися з АТФ-синтазою в мітохондріях. Цей антибіотик однаково ефективно пригнічує як синтез АТФ, так і рух електронів до O_2 уздовж дихального ланцюга мітохондрій (рис. 11.1, Б). Відомо, що олігоміцин безпосередньо блокує повернення протонів у матрикс мітохондрій крізь АТФ-синтазу, однак не впливає на транспорт електронів. За цих умов транспорт протонів дихальним ланцюгом у міжмембранний простір мітохондрій створює значний протонний електрохімічний градієнт, тому протонорушійна сила зростає. Ці процеси триватимуть доти, поки не встановиться рівновага між енергією, що затрачається на відкачування протонів із матриксу мітохондрій, і енергією, що вивільняється за перенесення електронів від НАДН (чи ФАДН₂) на O_2 .

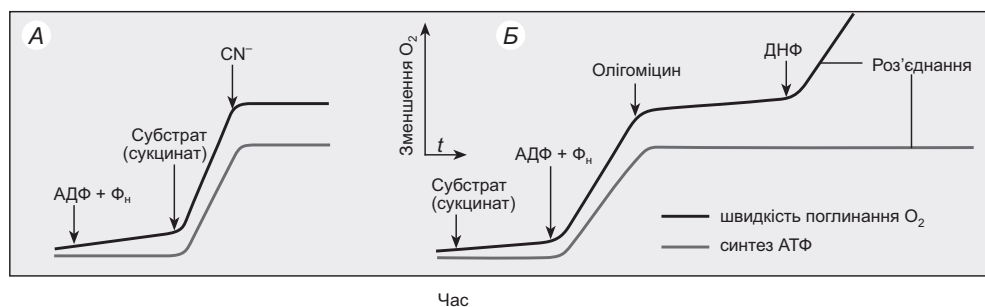


Рис. 11.1. Спряження дихання ізольованих мітохондрій і синтезу АТФ

Ці експериментальні дані підтвердили, що процеси перенесення електронів і синтезу АТФ спряжені, тому за нормальних умов, коли мітохондрії не пошкоджені, не можуть відбуватись один без одного.

За певних патологічних умов *in vivo* внутрішня мембрана мітохондрій може бути пошкоджена. Такі умови можна змоделювати експериментально *in vitro* за дії певних речовин. Пошкоджені мітохондрії зберігають здатність переносити електрони від НАД- чи ФАД-залежних субстратів, споживати кисень, але не синтезувати АТФ. До речовин, які роз'єднують процеси окиснення та фосфорилювання, належать карбонілціанід-*p*-трифторметоксифенілгідрозон (FCCP) і 2,4-динітрофенол (ДНФ) (рис. 11.1, Б). Ці гідрофобні слабкі кислоти у протонованій формі легко дифундують крізь внутрішню мембрану мітохондрій. Вони вивільняють свої протони на негативно зарядженій поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій і таким чином “розсіюють” протонний градієнт. За цих умов реєструють найбільшу швидкість дихання мітохондрій, яка характеризує максимальну окисну здатність цих органел [Hreniukh et al., 2016].

Процеси дихання і фосфорилювання можуть бути роз'єднані й іншими іонофорами, які полегшують перенесення неорганічних іонів крізь мембрану.

До таких речовин належить, наприклад, іонофор калію **валіноміцин**, який транспортує іони K^+ у матрикс мітохондрій і “розсіює” електричну частку електрохімічного градієнта протонів. Варто зазначити, що якщо крізь внутрішню мембрану мітохондрій експериментально створити протонний концентраційний градієнт (закисливши середовище), то такі мітохондрії будуть здатні синтезувати АТФ навіть за браку субстрату окиснення.

11.2. БУДОВА АТФ-СИНТАЗИ

Синтез АТФ з АДФ і Φ_H у мітохондріях відбувається за каталізу АТФ-синтазою. Цей ферментний комплекс F-типу локалізований у внутрішній мітохондріальній мембрані. Реакція спряжена з перенесенням протонів із додатньо зарядженого міжмембранного простору мітохондрій у від’ємно заряджений матрикс (рис. 11.2). АТФ-синтаза, яку ще називають п’ятим комплексом дихального ланцюга (рис. 10.1), складається з двох функціонально-структурних компонент. Перша з них – F_1 – це периферичний мембранний білок, а друга – F_0 – інтегральний білок, яка пронизує внутрішню мембрану мітохондрій (позначка «о» означає чутливість цієї компоненти до інгібітора синтезу АТФ олігоміцину).

На початку 1960-х рр. у лабораторії американського біоенергетика Ефраїма Рекера була ідентифікована компонента F_1 і досліджена її роль в окисному фосфорилуванні.

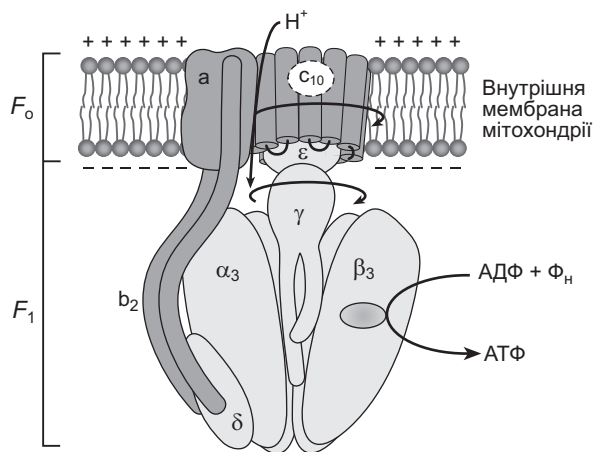


Рис. 11.2. Будова АТФ-синтази

Встановлено, що ізолювані мітохондрії та навіть везикули, утворені з фрагментів їхньої внутрішньої мітохондріальної мембрани, здійснюють синтез АТФ і перенесення електронів у дихальному ланцюгу, бо містять обидві компоненти АТФ-ази – F_1 і F_0 . Везикули, які позбавлені F_1 , можуть каталізувати перенесення електронів, але не можуть синтезувати АТФ. Причиною цього є не лише брак синтазних одиниць компоненти F_1 , але й “розсіювання” електрохімічного

градієнта протонів, оскільки F_o містить протонну пору, через яку вони повертаються назад у матрикс мітохондрій.

Експериментально встановлено, що ізолювана компонента F_1 може тільки гідролізувати, а не синтезувати молекулу АТФ. Саме тому АТФ-синтазу ще називають F_1 -АТФ-азою. Якщо ж до везикул з F_o , але без F_1 , додати очищену компоненту F_1 , то вона реасоціюється з F_o , протонна пора закривається і відновиться здатність мітохондріальної мембрани до спряження процесів транспорту електронів дихальним ланцюгом та окисного фосфорилювання.

Компонента F_1 АТФ-синтази складається із дев'яти субодиниць п'яти різних типів: по три α і β та по одній γ , δ і ϵ . Кожна з трьох β -субодиниць містить один каталітичний центр для синтезу АТФ і може набувати трьох різних конформацій.

Джон Вокер з колегами на підставі кристалографічних досліджень встановили, що куляста (схожа на мандарин) частина F_1 має висоту 8 нм і діаметр 10 нм, а α - та β -субодиниці розташовані почергово (рис. 11.2). Поліпептиди, що формують γ -субодиницю – “ніжку” компоненти F_1 , розташовані асиметрично. γ -Субодиниця має два домени, один із яких утворює центральний стрижень, що пронизує F_1 , а інший приєднується до однієї з трьох β -субодиниць. Усі три β -субодиниці ідентичні за амінокислотною послідовністю, але розрізняються конформаційно.



Джон Вокер
1941 р.н.

Протонний градієнт на внутрішній мітохондріальній мембрані постачає енергію у формі протонорушійної сили для синтезу АТФ з АДФ і P_i ферментом АТФ-синтазою, який складається з двох компонент – F_1 і F_o .

Спорідненість сайту зв'язування нуклеотидів до АТФ і АДФ кожної з трьох β -субодиниць завжди є різною та змінюється протягом циклу. Центр зв'язування однієї з них містить АТФ, іншої – АДФ, а центр зв'язування третьої β -субодиниці є порожнім (рис. 11.3). Зміна спорідненості цих субодиниць до нуклеотидів є дуже важливою для синтезу АТФ.

Компонента F_o АТФ-синтази формує протонну пору у внутрішній мембрані мітохондрій. Вона складається з трьох типів субодиниць: однієї a , двох b і 10–12 субодиниць c . Субодиниця c є невеликою (8000 кДа), містить два трансмембранні домени, з'єднані між собою петлями (рис. 11.2). N-кінцеві групи кожної з c -субодиниць утворюють внутрішнє кільце рухомої частини (ротора) F_o , а C-кінцеві групи – зовнішнє кільце діаметром 55 Å. Кільце c -субодиниць міцно утримує субодиниці γ та ϵ компоненти F_1 , які утворюють “ніжку та підшву” АТФ-синтази. Субодиниця b приєднана до субодиниці a і разом зі субодиницею δ (з компоненти F_1) вони утримують комплекс α - та β -субодиниць у нерухомому стані стосовно поверхні мембрани.

11.3. РОТАЦІЙНИЙ КАТАЛІЗ СИНТЕЗУ АТФ

Синтез АТФ АТФ-синтазою є неможливий без руху протонів у матрикс крізь її компоненту F_o . Енергія цього потоку протонів крізь пору в компоненті F_o обертає циліндр субодиниць c , до якого прикріплена γ -субодиниця. Цей дискретний обертовий рух здійснюється навколо довгої осі γ -субодиниці, яка розташована перпендикулярно до площини внутрішньої мембрани мітохондрії, тоді як β -субодиниці не обертаються, оскільки “зафіксовані” двома b та однією δ -субодиницями (рис. 11.2). Повсякчас, коли γ -субодиниця повертається на 120° , вона контактує з іншою β -субодиницею. Коли γ -субодиниця робить один повний оберт (на 360°), кожна з β -субодиниць по чергово набуває трьох різних конформацій (рис. 11.3).

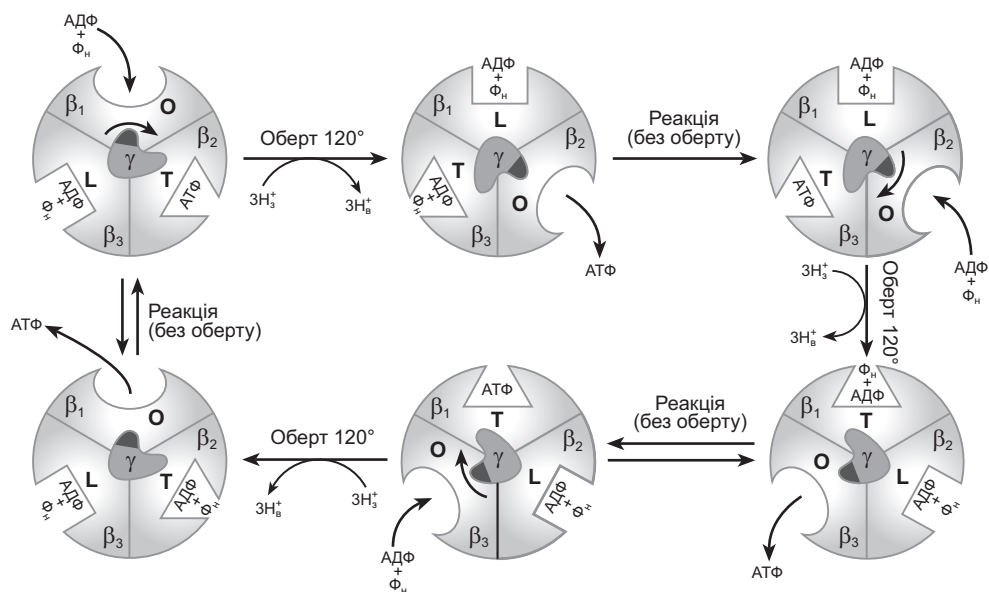


Рис. 11.3. Модель функціонування АТФ-синтази [за Boyer, 1997]

Ротаційний каталіз є основою механізму синтезу АТФ, згідно з яким три активних центри компоненти F_1 АТФ-синтази по чергово каталізують цей синтез. Спочатку одна з β -субодиниць (див. β_1 на рис. 11.3) у відкритому стані (О – open state) зв’язує наявні у середовищі АДФ та Φ_n . Після цього внаслідок обертання γ -субодиниці на 120° ця β -субодиниця переходить зі стану з низькою спорідненістю (О) у стан із помірною спорідненістю до АДФ та Φ_n (L – loose state). Потік протонів знову спричиняє обертання γ -субодиниці, внаслідок чого β_1 -субодиниця переходить у стан із високою (Т – tight state) спорідненістю до АДФ та Φ_n , з яких у цьому стані (без додаткового обертання) утворюється АТФ. Відтак на поверхні ферменту встановлюється рівновага між АДФ + Φ_n і АТФ. Наприкінці каталітичного циклу β -субодиниця переходить у відкритий стан (О), за якого АТФ від’єднується від ферменту, і далі цикл повторюється.

Дві інші β -субодиниці проходять такий самий цикл від зв'язування АДФ та Φ_n до від'єднання АТФ, але зі зміщенням фази обертання. Коли одна з β -субодиниць є у відкритому стані, то друга у стані з помірною спорідненістю до АДФ, а третя – у стані з високою спорідненістю до нуклеотидів. Тому за одного повного циклу синтезуються та від'єднуються від поверхні АТФ-синтази три молекули АТФ.

Масасукі Йошида з колегами експериментально встановили, що залежно від того, у який бік повертається γ -субодиниця, F_0F_1 -комплекс може або синтезувати АТФ, або гідролізувати її [Yasuda et al., 1998]. Спочатку у своєму експерименті вони прикріпили до γ -субодиниці генетично сконструйованої компоненти F_1 (без F_0) довгу помічену флюоресцентною міткою полімерну молекулу актину, а комплекс α - та β -субодиниць – через гістидинові залишки до предметного мікроскопічного скла, покритого нікелевим комплексом (рис. 11.4, А). Коли у середовище додали АТФ (як субстрат для АТФ-азної реакції), то спостерігали під флюоресцентним мікроскопом переміщення γ -субодиниці щодо комплексу α - та β -субодиниць (рис. 11.4, А). Це обертання було дискретним у три кроки по 120° . Отже, енергія розщеплення АТФ компонентою F_1 використовується для обертання γ -субодиниці.

Коли ж в експерименті дослідники використали повний комплекс АТФ-синтази ($F_1 + F_0$) і приєднали молекулу актину до c -субодиниці, то разом з γ -субодиницею оберталося все кільце c -субодиниць, але у протилежному напрямку, ніж за гідролізу АТФ (рис. 11.4, Б). Розрахунки виявили, що ефективність такої трансформації хімічної енергії у рухову є майже 100 %-ною.

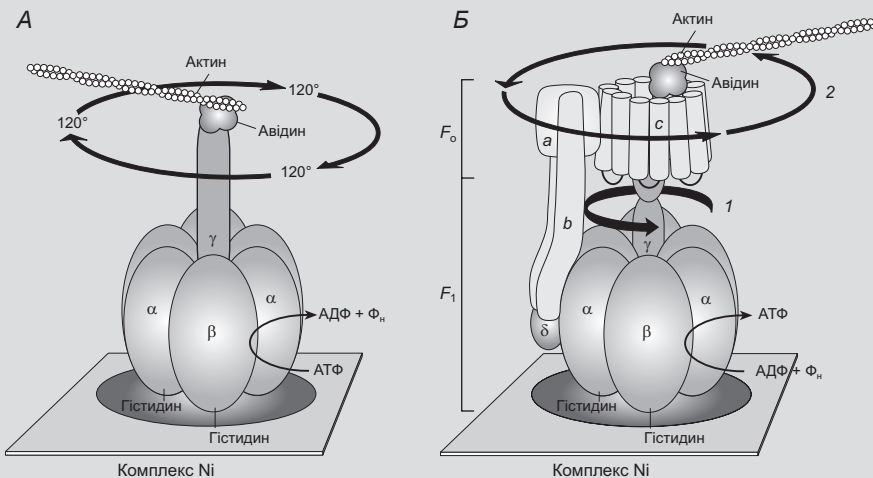


Рис. 11.4. Експеримент із підтвердження дискретного обертання компоненти F_0 і субодиниці γ за гідролізу (А) і синтезу (Б) АТФ [Yasuda et al., 1998]

11.4. СПІВВІДНОШЕННЯ МІЖ СПОЖИТИМ O_2 ТА СИНТЕЗОВАНИМ АТФ

Важливим показником для оцінювання ефективності окисного фосфорилювання у мітохондріях є співвідношення кількості неорганічного фосфату, використаного для синтезу АТФ, до кількості спожитого кисню. Цей показник традиційно позначають як Р/О ($P/2e^-$), і він еквівалентний кількості фосфорилюваного АДФ (АДФ/О).

Якщо ізольовані мітохондрії помістити в ізотонічне середовище у полярографічній комірці, що містить O_2 , субстрат окиснення (наприклад, піруват чи сукцинат) і Φ_H , то за їхньою швидкістю дихання після додавання АДФ можна оцінити швидкість синтезу АТФ. Теоретично співвідношення Р/О має дорівнювати 3 за окиснення НАД-залежних субстратів і 2 – за окиснення ФАД-залежного сукцинату, оскільки за окиснення цих субстратів залучені відповідно три і два пункти спряження дихання й окисного фосфорилювання у дихальному ланцюгу мітохондрій. Однак вимірювання відношення Р/О ускладнюється тим, що інтактні мітохондрії споживають кисень не тільки у процесі окисного фосфорилювання, а АТФ паралельно використовують у багатьох інших реакціях.

Згідно з хеміосмотичною теорією, кількість протонів, що виводяться у міжмембранний простір мітохондрій, у розрахунку на перенесену пару електронів від НАДН дорівнює 10, а від сукцинату – 6. Експериментально доведено, що кількість протонів, необхідна для забезпечення синтезу однієї молекули АТФ, дорівнює чотирьом, і з них один протон витрачається на транспортування Φ_H , АТФ і АДФ крізь мітохондріальну мембрану. Отже, якщо за окиснення однієї молекули НАДН викачується з матриксу десять протонів, а для забезпечення синтезу однієї молекули АТФ чотири з них повертається ($10/4$), то відношення Р/О становитиме 2,5. За окиснення сукцинату відношення Р/О становить 1,5 ($6/4$).

Співвідношення між синтезованим АТФ і спожитим O_2 залежить від кількості протонів, випомпованих із мітохондрій за перенесення електронів дихальним ланцюгом, кількості протонів, які необхідні для синтезу АТФ, а також транспорту АТФ, АДФ і Φ_H крізь внутрішню мембрану мітохондрій. Відношення Р/О для НАД-залежних субстратів становить $\sim 2,5$, а для ФАД-залежного сукцинату $\sim 1,5$.

11.5. ТРАНСПОРТНІ ПРОЦЕСИ КРІЗЬ ВНУТРІШНЮ МЕМБРАНУ МІТОХОНДРІЙ ЗА СИНТЕЗУ АТФ

Окрім постачання енергії для синтезу АТФ у мітохондріях, протонорушійна сила забезпечує перебіг низки транспортних процесів. Внутрішня мітохондріальна мембрана переважно непроникна для заряджених сполук, але має дві специфічні транспортні системи для перенесення АДФ та P_H у матрикс мітохондрій, а АТФ – із матриксу в цитоплазму. Перша з них – це інтегральний білок **аденіннуклеотидтранслоказа**, яка обмінює АДФ^{3-} із міжмембранного мітохондріального простору на АТФ^{4-} із матриксу (рис. 11.5). Унаслідок цього обміну один від’ємний заряд виводиться з матриксу, чому сприяє мембранний потенціал мітохондрій. Трансмембранний електрохімічний градієнт протонів, який формує значну частину мембранного потенціалу мітохондрій, є необхідною умовою функціонування АДФ/АТФ-антипортеру. Аденіннуклеотидтранслоказа специфічно інгібується **атрактилозидом** – токсичним глікозидом, який екстрагують із деяких видів чортополоху.

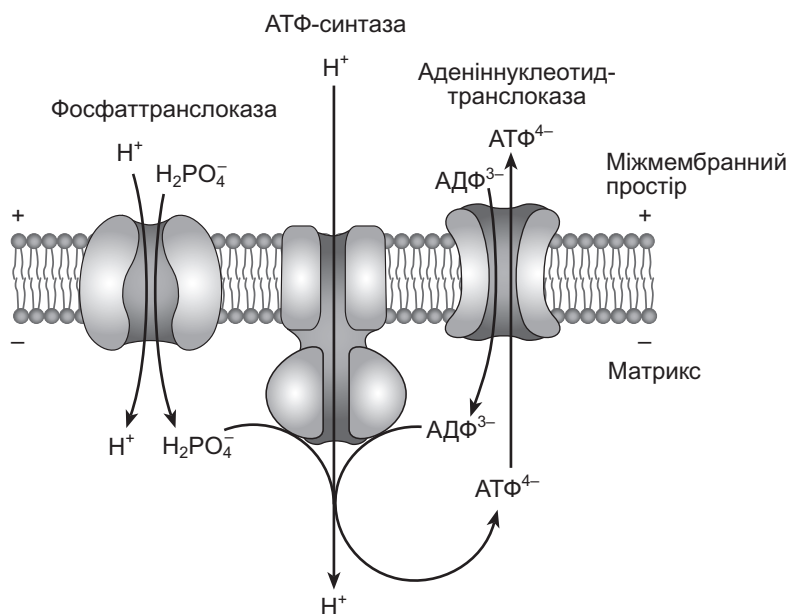


Рис. 11.5. Транслокази аденінових нуклеотидів і фосфату

Для повноцінного окисного фосфорилування необхідна ще одна транспортна система – **фосфаттранслоказа**, яка міститься у внутрішній мембрані мітохондрій і здійснює симпорт однієї молекули H_2PO_4^- та одного H^+ у матрикс (рис. 11.5). Цей процес залежить від протонного градієнта крізь мембрану.

Симпорт H_2PO_4^- та H^+ не супроводжується сумарним витоком заряду, але завдяки зменшенню протонного концентраційного градієнта, у матрикс мітохондрій одночасно транспортуються іони неорганічного фосфату.

Енергія трансмембранного електрохімічного градієнта протонів використовується для транспортування крізь внутрішню мітохондріальну мембрану ATP^{4-} , а також речовин, необхідних для окисного фосфорилювання – ADP^{3-} і H_2PO_4^- .

Внутрішня мітохондріальна мембрана непроникна для НАДН. Тому для транспорту відновлювальних еквівалентів цитозольного НАДН (утвореного, наприклад, у процесі гліколізу) в мітохондрії, функціонують особливі човникові системи. Це, зокрема, **малат-аспартатний шунт**, який виявлений у мітохондріях печінки, серця та нирок (рис. 11.6).

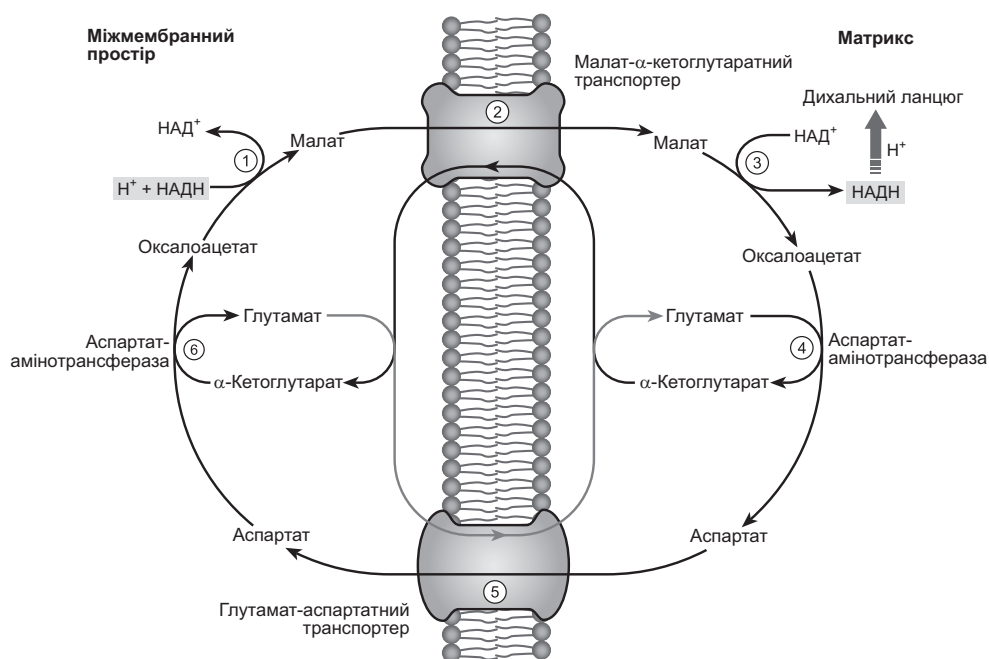


Рис. 11.6. Малат-аспартатна човникова система транспортування відновлювальних еквівалентів від цитозольного НАДН у мітохондріальний матрикс

Спочатку в цитозолі (міжмембранному просторі) відновлювальні еквіваленти від НАДН переносяться на оксалоацетат з утворенням малату (1). Цю реакцію каталізує цитозольна малатдегідрогеназа. Далі малат проникає у матрикс мітохондрій завдяки малат- α -кетоглутаратному обміннику (2). У матриксі малат віддає відновлювальні еквіваленти на NAD^+ у реакції, яку каталізує мітохондріальна малатдегідрогеназа (3), а утворений НАДН передає електрони безпосередньо в дихальний ланцюг. Мітохондріальний оксалоацетат, утворений

із малату, не може безпосередньо потрапити у цитозоль. Тому він спочатку трансамінується до аспартату (4), який виводиться з мітохондрій через глутамат-аспартатний обмінник (5). Для запуску нового циклу малат-аспартатного шунта необхідно, щоб відбулося відновлення цитозольного оксалоацетату в реакціях трансамінування за участі аспартату, α -кетоглутарату і глутамату (6).

У скелетних м'язах і мозку для перенесення відновних еквівалентів від НАДН використовують **гліцерол-3-фосфатну човникову систему** (див. розділ 10, рис. 10.1). Вона передає відновні еквіваленти від НАДН не на комплекс I, а безпосередньо на убіхінон, локалізований у ліпідному бішарі внутрішньої мембрани мітохондрій, і далі на комплекс III, тобто без участі мембранних транспортних систем. Спочатку дигідроксіацетонфосфат у цитозолі приєднує два відновлених еквіваленти від НАДН у реакції, яку каталізує цитозольна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа. Потім вже мітохондріальна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа, яка розміщена на поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій, переносить два відновних еквіваленти на убіхінон.

Відновлювальні еквіваленти від цитозольного НАДН передаються у дихальний ланцюг мітохондрій за допомогою малат-аспартатного шунта (через комплекс I) і гліцерол-3-фосфатної човникової системи (через кофермент Q).

Підсумки 11. СИНТЕЗ АТФ У ПРОЦЕСІ ОКИСНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ

- Згідно з хеміосмотичною теорією П. Мітчела, енергія протонного електрохімічного градієнта крізь внутрішню мембрану мітохондрій використовується для синтезу АТФ з АДФ та Φ_{H} .
- Фермент АТФ-синтаза складається з двох компонент – F_1 і F_0 . Компонента F_1 спрямована у матрикс мітохондрій і складається з трьох α - і трьох β -субодиниць та по одній γ -, δ - і ϵ -субодиниці. Компонента F_0 складається з однієї a -субодиниці, двох b -субодиниць і 10–12 c -субодиниць.
- Ротаційний каталіз синтезу АТФ – циклічно повторювана трифазна зміна конформації кожної β -субодиниці у складі компоненти F_1 АТФ-синтази внаслідок дискретного (з кроком 120°) обертання γ -субодиниці.
- Кожна з β -субодиниць проходить цикл від зв'язування АДФ та Φ_{H} до від'єднання АТФ, але зі зміщенням фази обертання. Коли одна з β -субодиниць є у відкритому стані, то друга перебуває у стані з помірною спорідненістю до АДФ, а третя – у стані з високою спорідненістю до нуклеотидів. Тому за одного повного циклу синтезуються та від'єднуються від поверхні АТФ-синтази три молекули АТФ.

- Ефективність окисного фосфорилування у мітохондріях оцінюють за відношенням Р/О (АДФ/О), яке для НАД-залежних субстратів становить приблизно 2,5, а для ФАД-залежних – 1,5.
- Енергія електрохімічного градієнта протонів використовується для транспортування крізь внутрішню мітохондріальну мембрану речовин, необхідних для синтезу АТФ.
- Оскільки внутрішня мітохондріальна мембрана непроникна для НАДН і НАД⁺, відновні еквіваленти потрапляють із цитозолу в дихальний ланцюг мітохондрій за допомогою човникових систем – малат-аспартатної (через комплекс І) і гліцерол-3-фосфатної (через кофермент Q).



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. **Роз'єднувачі окисного фосфорилування.** Роз'єднувачі FCCP і ДНФ порушують спряження процесів клітинного дихання й окисного фосфорилування.
 А) Ці роз'єднувачі *in vivo* підвищують температуру тіла. Поясніть це явище на молекулярному рівні.
 Б) Як зміниться відношення Р/О за наявності роз'єднувачів?
 В) Колись лікарі приписували ДНФ для схуднення. Чи може цей препарат насправді бути ефективним засобом для схуднення? Зафіксовано кілька смертельних випадків після використання роз'єднувачів. Яким чином вони можуть спричинити смерть?
2. **Малат- α -кетоглутаратна транспортна система** забезпечує перенесення малату й α -кетоглутарату крізь внутрішню мітохондріальну мембрану (див. рис. 11.6) і пригнічується *n*-бутилмалонатом. Припустимо, що цей інгібітор додали до суспензії аеробних клітин нирок, які як джерело енергії використовують виключно глюкозу. Як у цьому разі *n*-бутилмалонат вплине на (А) споживання кисню, (Б) гліколіз, (В) утворення лактату, (Г) окисне фосфорилування?
3. **Потреба в АТФ у серцевому м'язі щура** за аеробних умов на 90 % задовольняється завдяки окисному фосфорилуванню. Кожен грам міокарда поглинає кисень зі швидкістю 10 мкмоль/хв, якщо джерелом енергії є глюкоза.
 А) З якою швидкістю серцевий м'яз споживає глюкозу та синтезує АТФ?
 Б) Беручи до уваги, що стаціонарна концентрація АТФ у серцевому м'язі дорівнює 5,0 мкмоль/г тканини, обчисліть час, необхідний для повного оновлення клітинного пулу АТФ.
4. **Яка теорія стверджує**, що енергія електрохімічного градієнта протонів крізь внутрішню мітохондріальну мембрану використовується для синтезу АТФ за пасивного переміщення H⁺ назад у матрикс через протонну пору в молекулі АТФ-синтази?
 1) хеміосмотична;
 2) хімічна;
 3) конформаційна;
 4) електрохімічна.

5. Чому синтез АТФ у мітохондріях блокується за додавання олігоміцину?

- 1) блокується спрямований у матрикс потік H^+ через протонний канал АТФ-синтази;
- 2) “розсіюється” трансмембранний градієнт протонів на мембрані;
- 3) блокуються сайти зв’язування АДФ і Φ_n на F_1 субодиниці АТФ-синтази;
- 4) інгібується перенесення електронів між комплексами I і II дихального ланцюга.

6. Вибрати правильні характеристики ротаційного каталізу АТФ-синтазою:

- 1) потік протонів через компоненту F_o спричиняє циклічно повторювану зміну конформації кожного з нуклеотидзв’язувальних центрів компоненти F_1 ;
- 2) нуклеотидзв’язувальні центри компоненти F_1 спочатку зв’язують АДФ + Φ_n , далі АТФ, а потім стають порожніми;
- 3) за кожної з трьох ротаційних фаз, коли спостерігається зміна конформації нуклеотидзв’язувальних центрів компоненти F_1 , γ -субодиниця повертається на 360° ;
- 4) за кожного оберту γ -субодиниці на 360° синтезуються та від’єднуються від поверхні ферменту три молекули АТФ.

7. Вибрати правильні характеристики компоненти F_o АТФ-синтази:

- 1) містить центри зв’язування АТФ і АДФ;
- 2) складається з трьох субодиниць – a , b та c ;
- 3) формує протонну пору;
- 4) карбоксикінцеві спіралі кожної з його c -субодиниць утворюють зовнішнє кільце діаметром 55 Å.

8. Вибрати правильні характеристики компоненти F_1 АТФ-синтази.

- 1) периферичний мембранний білок;
- 2) інтегральний мембранний білок;
- 3) чутлива до олігоміцину;
- 4) зв’язує АДФ і АТФ.

9. Яким чином хімічні роз’єднувачі ДНФ і FCCP впливають на процеси перенесення електронів та окисне фосфорилювання?

- 1) зв’язують H^+ на зовнішньому боці мітохондріальної мембрани, проникають у матрикс, де вивільняють протони, тим самим “розсіюючи” протонний градієнт;
- 2) блокують спрямований у матрикс потік протонів крізь протонний канал АТФ-синтази;
- 3) блокують сайти зв’язування АДФ і Φ_n на F_1 субодиниці АТФ-синтази;
- 4) знижують активність НАДН-дегідрогенази.

10. Інтегральний білок аденіннуклеотидтранслоказа у внутрішній мітохондріальній мембрані:

- 1) зв’язує молекулу АДФ³⁻ у міжмембранному просторі і транспортує її у матрикс в обмін на молекулу АТФ⁴⁻;
- 2) є антипортером;
- 3) функціонує без трансмембранного електрохімічного градієнта;
- 4) специфічно інгібується атрактилозидом.

11. Які човникові системи переносять НАДН-залежні відновлювальні еквіваленти із цитозолу в матрикс мітохондрій?

- 1) малат-аспартатна;
- 2) гліцерол-3-фосфатна;
- 3) сукцинат-фумаратна;
- 4) піруват-оксалоацетатна.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. – М.: Мир, 1980. – 368 с.
- Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основы биохимии за Ленінджером. – Львів: Бак, 2015. – 1256 с.
- Boyer P.D. The ATP-synthase – a splendid molecular machine // *Ann. Rev. Biochem.* – 1997. – Vol. 66. – P. 717–749.
- Hreniukh V., Manko B., Sidorova O., Babsky A. Maximal oxidative capacity of NK/Ly lymphoma cells upon glucose, pyruvate and glutamine oxidation // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* – 2016. – Vol. 71(1). – P. 1–10.
- Karp G. *Cell and Molecular Biology.* – 5th ed. – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2008. – 194 p.
- Khan S. Rotary chemiosmic machines // *Biochem. Biophys. Acta* – 1997. – Vol. 1322. – P. 86–105.
- Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation // *Biological Reviews.* – 1966. – Vol. 41, N 3. – P. 445–502.
- Nicholls D.G., Ferguson S.J. *Bioenergetics* 3. – Amsterdam: Academic Press, 2002.
- Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP-synthase // *Science.* – 1999. – Vol. 286, N 5445. – P. 1700–1705.
- Yasuda R., Noji H., Kinosita K. Jr, Yoshida M. F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps // *Cell.* – 1998. – Vol. 93, N 7. – P. 1117–1124.

МІТОХОНДРІЇ Й АКТИВНІ ФОРМИ ОКСИГЕНУ

- Загальна характеристика та джерела активних форм оксигену в клітині
- Процеси пероксидного окиснення ліпідів: механізми, фізіологічне та патологічне значення
- Антиоксидантний захист клітини

У попередніх розділах ми детально ознайомилися з роллю мітохондрій у підтриманні енергетичного стану клітини. Ще одним важливим аспектом функціонування мітохондрій є їхня участь у вільнорадикальному метаболізмі. Для вищих форм життя надзвичайно важливим є кисень, реакція відновлення якого до води становить основу біоенергетики організму людини і тварин. Цей процес проходить у мітохондріях, забезпечуючи синтез АТФ. Одночасно з окисним фосфорилуванням, у якому використовується до 90 % кисню, що споживається організмом, у клітинах постійно відбуваються вільнорадикальні реакції з утворенням проміжних метаболітів оксигену, або **активних форм оксигену**.

12.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА Й ДЖЕРЕЛА АКТИВНИХ ФОРМ ОКСИГЕНУ В КЛІТИНІ

Активні форми оксигену є природними продуктами життєдіяльності клітин, що задіяні в реалізації різноманітних фізіологічних функцій, однак надмірне зростання їхньої кількості може спричинити патологічні зміни у клітині (рис. 12.1).

Активні форми оксигену (англ. Reactive Oxygen Species, ROS) – хімічно активні сполуки оксигену, зокрема, супероксид-аніон, пероксид-аніон, гідроксил-радикал.

Що ж таке активні форми оксигену і як вони пов'язані з мітохондріями? Для того щоб відповісти на це питання, необхідно пригадати, що серед активних

форм кисню чільне місце займають (поряд з іонами кисню та пероксидами) вільні радикали кисню. **Вільні радикали** – це молекули, атоми або іони, які мають неспарені електрони на зовнішній орбіталі, що визначає їхню високу реакційну здатність.

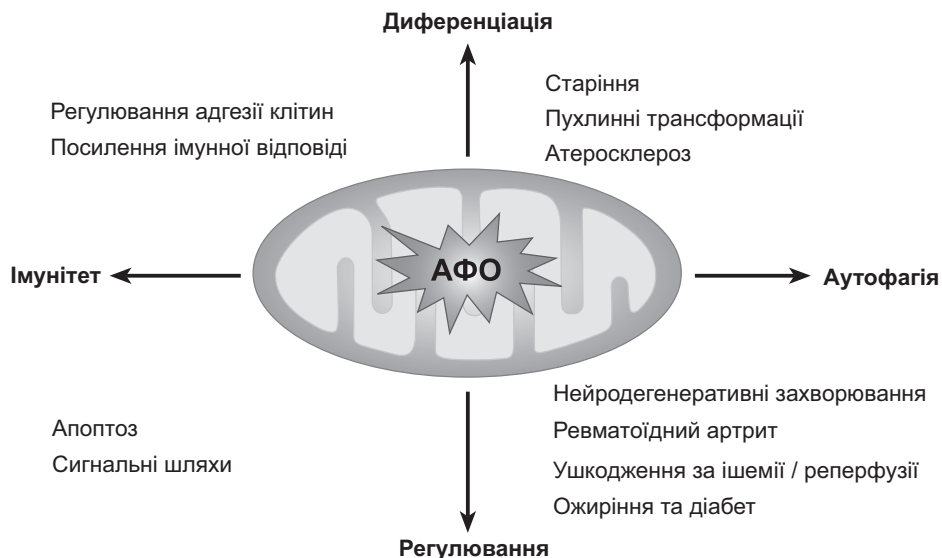


Рис. 12.1. Фізіологічна роль активних форм кисню в організмі

Кисень має таку молекулярну орбіталь, яка сприяє утворенню радикалів, і в основному стаціонарному стані має два неспарені електрони з *паралельними* спінами, що розміщені на різних π^* -орбіталях. За такого стану рівень вільної енергії є меншим порівняно зі синглетним киснем, коли електрони мають *протилежні* спіни і перебувають на одній або різних π^* -орбіталях. Унаслідок цієї особливості будови триплетний кисень не може одночасно прийняти два електрони від переважної більшості органічних молекул – донорів пари електронів із протилежними спінами.

У процесі клітинного дихання відновлення кисню до води здійснюється за рахунок приєднання чотирьох електронів. На першому етапі відновлення кисню до води задіяні оксидази (зокрема, НАД(Ф)Н-дегідрогеназа, цитохром-с-оксидази мітохондрій тощо). Одноелектронними донорами-кофакторами є іони змінної валентності (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+}) та/або органічні молекули, що можуть існувати у вільнорадикальному стані (хінони, флавіни). Вони зумовлюють одноелектронне відновлення кисню до супероксид-аніона (супероксидного радикала, супероксид-аніон-радикала, O_2^-) за фізіологічних значень рН:



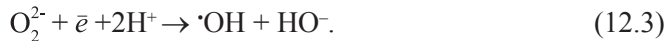
Супероксид-аніон – це заряджена частинка, яка не може пройти крізь біологічні мембрани і є джерелом інших активних форм кисню у клітині. Ця

сполука нестабільна у водних розчинах і швидко дисмутує з утворенням **пероксид-аніона** (O_2^{2-}):



У водному середовищі клітини пероксид-аніон існує у вигляді гідроген пероксиду (H_2O_2).

Одноелектронне відновлення пероксид-аніона (третій електрон на шляху поступового чотирьохелектронного відновлення кисню до води) спричиняє виникнення дуже реакційноздатного **гідроксил-радикала** ($\cdot OH$) та гідроксид-іона (OH^-):



Приєднання четвертого електрона до гідроксил-радикала зумовлює повне відновлення кисню – до молекули води (дигідроген оксиду, H_2O):



Детальніше механізм утворення активних форм кисню за відновлення кисню до води у живих клітинах представлений на рис. 12.2.

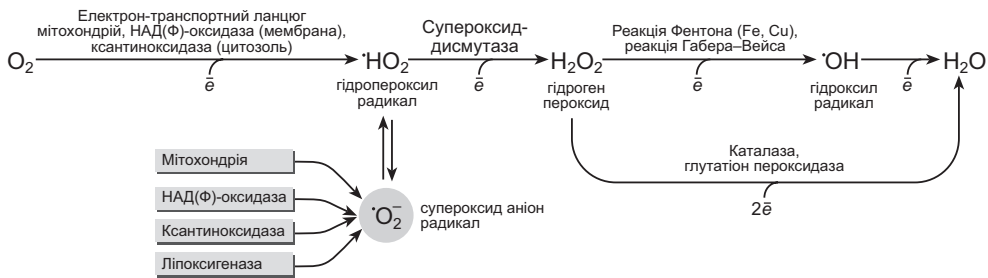


Рис. 12.2. Механізм утворення активних форм кисню за відновлення кисню до води

Отже, під час відновлення кисню до води у процесі мітохондріального дихання можуть утворюватися три активні форми кисню – два радикали та один іон кисню (реакції 12.1–12.3). Мітохондрії є основним джерелом активних форм кисню у клітині, хоча вони також можуть утворюватись у цитоплазмі, мікросомах, мембранах ядра й ендоплазматичного ретикулуму.

Основним генератором таких активних форм кисню як **супероксид-аніон, пероксид-аніон і гідроксил-радикал** є дихальний ланцюг мітохондрій.

Будь-який компонент дихального ланцюга мітохондрій в аеробних умовах потенційно може бути донором електрона для часткового відновлення кисню. Однак не всі дихальні комплекси роблять однаковий внесок у продукцію активних форм кисню мітохондріями. Найбільша кількість супероксид-аніона та

пероксид-аніона генерується комплексом I і комплексом III дихального ланцюга мітохондрій (рис. 12.3), а також за ферментативного відновлення кисню в реакціях, які каталізують ферменти НАДН-цитохром-с-редуктаза та НАДФН-цитохром-с-редуктаза.

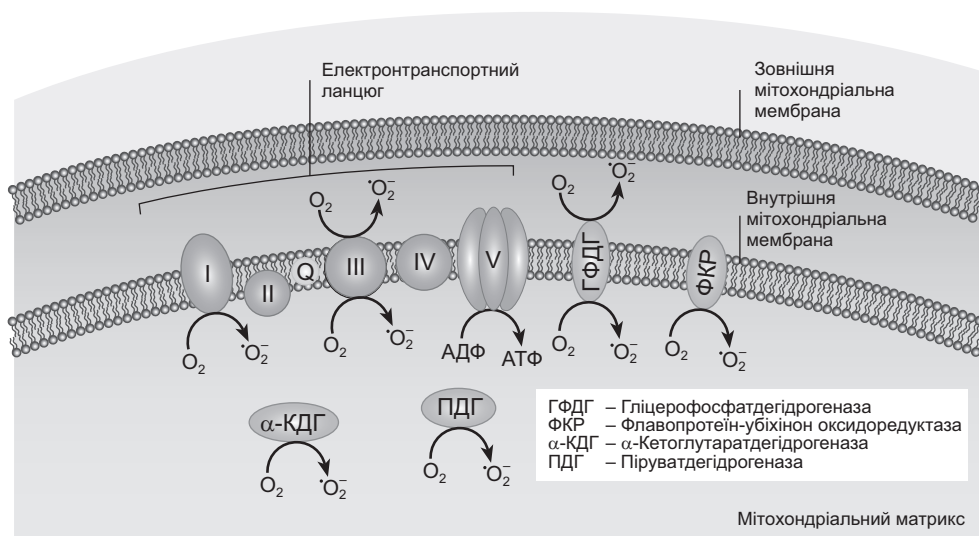


Рис. 12.3. Генерування активних форм кисню компонентами дихального ланцюга мітохондрій

Джерелом H_2O_2 може бути також (крім ферментів дихального ланцюга) НАДН-оксидаза зовнішньої мембрани мітохондрій. Матрикс мітохондрій містить високоактивні флавінові ферменти (дегідрогенази α-кетокислот, моноамінооксидази), які потенційно здатні реагувати з киснем, утворюючи супероксид-аніон і гідроген пероксид. Крім того, супероксид-аніон утворюється внаслідок реакцій, які каталізує ксантинооксидаза (рис. 12.4), та неферментативним способом у реакціях, індукованих різними токсичними чинниками, іонізуючим випромінюванням тощо.

За фізіологічних умов активні форми кисню в дихальному ланцюзі утворюються в невеликій кількості внаслідок “витоку” з мітохондрій 5–10 % електронів, що транспортуються ланцюгом. Швидкість утворення супероксид-аніона в мітохондріях прямо пропорційна ступеню спряженості дихального ланцюга і різко зростає за його блокування. Генерування супероксид-аніона зростає, зокрема, за інтенсивних м’язових скорочень у скелетних м’язах.

Отже, за наявності кисню генерація активних форм кисню є природним фізіологічним процесом. На відміну від кисню, проміжні продукти його відновлення є високо реакційноздатними і можуть неферментативно окиснювати білки, ліпіди, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. За фізіологічних умов активні форми кисню не нагромаджуються у клітинах, а дуже швидко метаболізують, тому їхня концентрація становить 10^{-11} – 10^{-8} М.

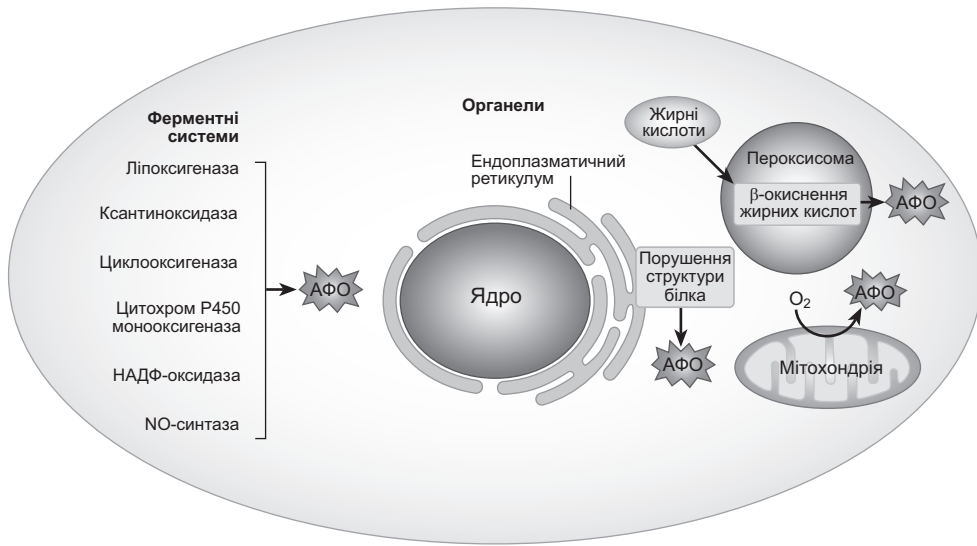


Рис. 12.4. Основні джерела активних форм оксигену у клітині

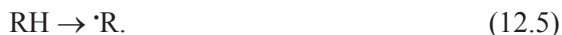
Тривалий час активні форми оксигену розглядали як побічні продукти кисневого метаболізму. На сьогодні доведено, що вони беруть участь у клітинних процесах як вторинні месенджери і відповідають за передавання регуляторного сигналу від міжклітинних сигнальних молекул і їхніх мембранних рецепторів до внутрішньоклітинних регуляторних систем, які контролюють експресію генів. З активними формами оксигену пов'язана передача сигналу від тромбоцитарного фактора росту, епідермального фактора росту, трансформуючого фактора росту β -1, фактора некрозу пухлин (TNF α). Фактор некрозу пухлин через підвищення утворення активних форм оксигену активує фактори транскрипції NF κ B і AP-1. Активні форми оксигену активують синтез мітохондріальної ДНК, регулюючи в такий спосіб дихальну активність клітин. Вони також залучені до процесів фагоцитозу та сприяють знищенню чужорідних клітин.

12.2. ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ: МЕХАНІЗМИ, ФІЗІОЛОГІЧНЕ ТА ПАТОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

За появи вільних радикалів чи інших активних форм оксигену у клітині розпочинається ланцюгова реакція вільнорадикального окиснення. Ця реакція є складним багатостадійним процесом, що відбувається за наявності субстратів окиснення, до яких належать переважно ненасичені жирні кислоти фосfolіпідів біологічних мембран, а також білки та нуклеїнові кислоти, і призводить до утворення органічних гідропероксидів (ROOH). Незалежно від того, проходить

окиснення ферментативним чи неферментативним способом, виділяють кілька стадій цього процесу – ініціювання, розгалуження та обрив ланцюга окиснення.

На стадії ініціювання ланцюга алкіл-радикал утворюється за дії різних чинників спонтанно:



За наявності кисню в реакції взаємодії з ним вільного радикала утворюється пероксил-радикал органічної речовини (ліпідів, білків, нуклеїнових кислот):



На стадії розгалуження ланцюга пероксил-радикал взаємодіє з іншою органічною молекулою та утворюється гідропероксид і ще один алкіл-радикал:



Крім того, гідропероксид може розпадатися з утворенням нових радикалів, що посилює розгалуження ланцюга:



де $\cdot OR$ – алкоксил-радикал, а $\cdot OH$ – гідроксил-радикал. Завдяки утворенню нових радикалів реакція набуває ланцюгового характеру.

Не всі вільні радикали залучені в ініціювання та розгалуження ланцюгових реакцій окиснення. Частина з них взаємодіють між собою з утворенням неактивних молекулярних продуктів, що зумовлює обрив (термінацію) ланцюга:



Переважаючим агентом вільнорадикального окиснення у клітині є активні форми кисню.

Утворення гідропероксидів ліпідів, ініційоване вільними радикалами, називається пероксидним окисненням ліпідів.

За фізіологічних умов саме пероксидам ліпідів належить важлива роль у метаболізмі певних речовин, у підтриманні гомеостазу організму та його адаптаційних реакцій. Пероксида ліпідів є необхідною проміжною ланкою у синтезі простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів, стероїдних гормонів. Процеси пероксидного окиснення ліпідів залучені до оновлення складу фосфоліпідів мембран. Близько 2–3 % ліпідів мембрани постійно перебувають у стадії окиснення. Інтенсифікація пероксидного окиснення ліпідів сприяє прискоренню обміну фосфоліпідів, зміні їхнього відносного складу, ліпід-білкових взаємозв'язків і, як наслідок, зміні структури мембрани. На сьогодні доведено, що функціонування мембранних білків-ферментів, рецепторів, іонних каналів і транспортерів залежить від їхнього ліпідного оточення. Тому зміна складу ліпідів, зумовлена зміною швидкості пероксидного окиснення ліпідів, змінює й активність мембранних білків.

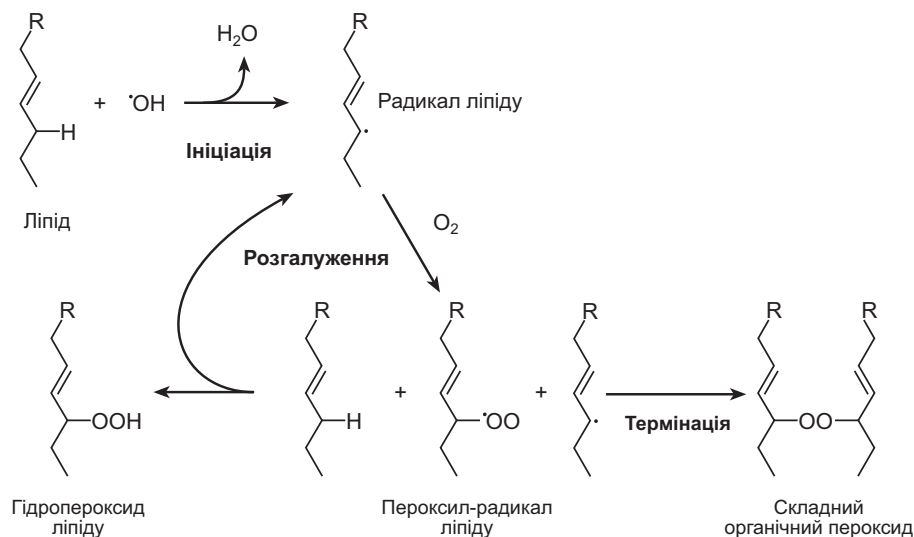
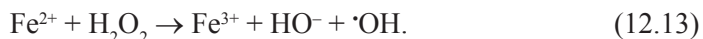


Рис. 12.5. Схематичне зображення стадій процесу пероксидного окиснення ліпідів

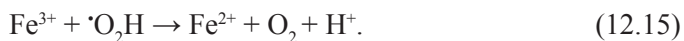
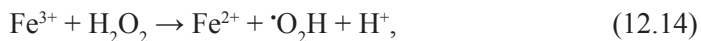
Фракції фосfolіпідів суттєво відрізняються за ступенем окиснення залежно від кількості й насиченості жирних кислот. Крім того, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин і фосфатидилінозит найбільше залучаються у процеси пероксидного окиснення ліпідів, а сфінгомієлін і фосфатидилхолін – найменше.

Важливу роль в ініціації та швидкості процесів пероксидного окиснення ліпідів відіграють катіони феруму, які є у мембранних структурах, що зв'язані з ферментами та білками-переносниками – трансферином і феритином. Частина катіонів феруму може бути зв'язана з фосфатними групами мембранних ліпідів і нуклеотидів. За взаємодії з киснем катіони Fe²⁺ залучені до утворення супероксид-аніона, гідроген пероксиду і гідроксил-радикала:

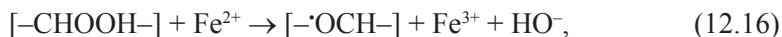


Катіони Fe²⁺ окиснюються гідроген пероксидом до катіонів Fe³⁺. Ця реакція має назву реакція Фентона [Fenton, 1894]. Її механізм запропонували Габер і Вейс [Haber, Weiss, 1934].

У свою чергу, Fe³⁺ може взаємодіяти з гідроген пероксидом з утворенням Fe²⁺:



Автоокиснювальна дія катіонів Fe²⁺ виявляється за їхньої концентрації вище 10⁻⁵–10⁻⁴ М. Взаємодія катіонів Fe²⁺ з гідропероксидами ліпідів супроводжується утворенням вільних радикалів, які дають початок новим ланцюгам окиснення:



Пероксиди ліпідів є нестабільними і розпадаються з утворенням альдегідів (капроновий альдегід, малоновий діальдегід, напівальдегід дикарбонової кислоти). Це відбувається унаслідок розриву в жирній кислоті С–С-зв'язку поряд із пероксидною групою. У такий спосіб можуть окиснюватись як вільні жирні кислоти, так і їхні залишки у складі інших ліпідів. Під час пероксидного окиснення ліпідів послідовно утворюється широкий спектр продуктів: вільнорадикальні інтермедіати, продукти початкового гідролізу ліпідів (гідропероксиди), проміжні або вторинні сполуки, які утворюються у результаті розпаду гідропероксидів (малоновий діальдегід), та кінцеві продукти – низькомолекулярні легколеткі вуглеводні (етан, пентан).

Процеси пероксидного окиснення ліпідів постійно відбуваються у нормі в усіх тканинах живих організмів, однак їхня інтенсифікація зумовлює порушення функціонування клітин унаслідок ушкодження клітинних мембран.

Надмірне зростання рівня продуктів пероксидного окиснення ліпідів може мати негативні наслідки для клітин, тканин і цілого організму. Зокрема, зростання генерування активних форм кисню й інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів є основними факторами розвитку оксидативного стресу, що виникає у відповідь на будь-який стресорний чинник: фізичні навантаження та гіподинамію, гіпероксію та гіпоксію, ішемію і т.п. Тобто активація процесів пероксидного окиснення ліпідів є неспецифічним компонентом стрес-реакції організму на будь-які тривалі й надмірні впливи та зумовлює розвиток різноманітних патологій і хвороб.

12.3. АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ КЛІТИНИ

Напруження (рівень) кисню у тканинах визначається як його надходженням, так і використанням у конкретних фізіологічних умовах, в яких перебувають клітини, тому коливається у досить широкому діапазоні значень. Такі коливання напруження кисню спричиняють коливання інтенсивності генерації активних форм кисню та процесів пероксидного окиснення ліпідів. Виникає потреба у специфічній системі, яка б могла захистити клітину від потенційно небезпечних ефектів, що супроводжують процеси пероксидного окиснення біологічних молекул.

Система **антиоксидантного захисту** нейтралізує потенційно небезпечний ефект активних форм кисню і підтримує їхню кількість на фізіологічному рівні.

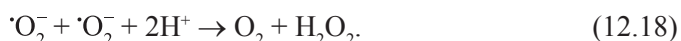
Механізм дії антиоксидантів може реалізуватися такими способами:

- 1) через зниження рівня генерації активних форм оксигену й утворення радикалів завдяки обриву ланцюгів вільнорадикальних реакцій, що забезпечується дією специфічної ферментативної і неферментативної систем антиоксидантного захисту;
- 2) через зв'язування катіонів металів змінної валентності (феруму і купруму) з білками (трансферином, лактоферином, церулоплазміном), що унеможливорює участь цих катіонів у вільнорадикальних реакціях.

Низьке напруження кисню у тканинах створює передумови для зниження генерації активних форм оксигену. Крім того, мітохондрії можуть безпосередньо регулювати утворення активних форм оксигену через зміни електрохімічного потенціалу іонів гідрогену. Одним із механізмів антиоксидантного захисту є відкриття пори транзієнтної проникності (ПТП) у внутрішній мембрані мітохондрій. Вона проникна для речовин масою до 1,5 кД, і її відкривання вирівнює всі градієнти, включаючи градієнти H^+ і енергетичних субстратів. Ця пора відкривається у відповідь на збільшення концентрації $\cdot O_2^-$, H_2O_2 або $\cdot OH$, що призводить до посилення транспорту протонів у матрикс мітохондрій, стимуляції дихання і швидкого зниження напруження кисню. Коли напруження кисню знижується, швидкість накопичення активних форм оксигену зменшується, і пора закривається.

Крім функціонального способу регулювання рівня активних форм оксигену, клітини мають низку антиоксидантних сполук ферментативної та неферментативної природи, зокрема, ферменти супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, а також хінони, α -токоферол, аскорбінову кислоту, глутатіон та ін. Завдяки взаємоузгодженому функціонуванню цих сполук формується багатокаскадна система антиоксидантного захисту клітин (рис. 12.6).

Супероксиддисмутаза (СОД) – фермент, який знешкоджує супероксид-аніони через механізм їхньої дисмутації та перетворення на менш реакційно-здатні молекули гідроген пероксиду:



СОД каталізує цю реакцію зі швидкістю, на три порядки вищою, ніж за спонтанної дисмутації. Завдяки такій ефективній дії вміст супероксид-аніона у клітині зменшується до 10^{-12} – 10^{-13} М. За різних функціональних та патологічних процесів вміст і активність різних форм супероксиддисмутази у різних тканинах змінюється.

Активний центр цього ферменту містить катіони металів зі змінною валентністю (Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{3+}), які безпосередньо беруть участь у дисмутації, а також катіони Zn^{2+} .

У матриксі мітохондрій є манганвмісна супероксиддисмутаза (СОД2), синтез якої інтенсифікується за збільшення рівня $\cdot O_2^-$. У загальній супероксиддисмутазній активності частка СОД2 невелика і становить близько 15 %. У бактерій поряд з манганвмісною СОД трапляється також ферумвмісна СОД.

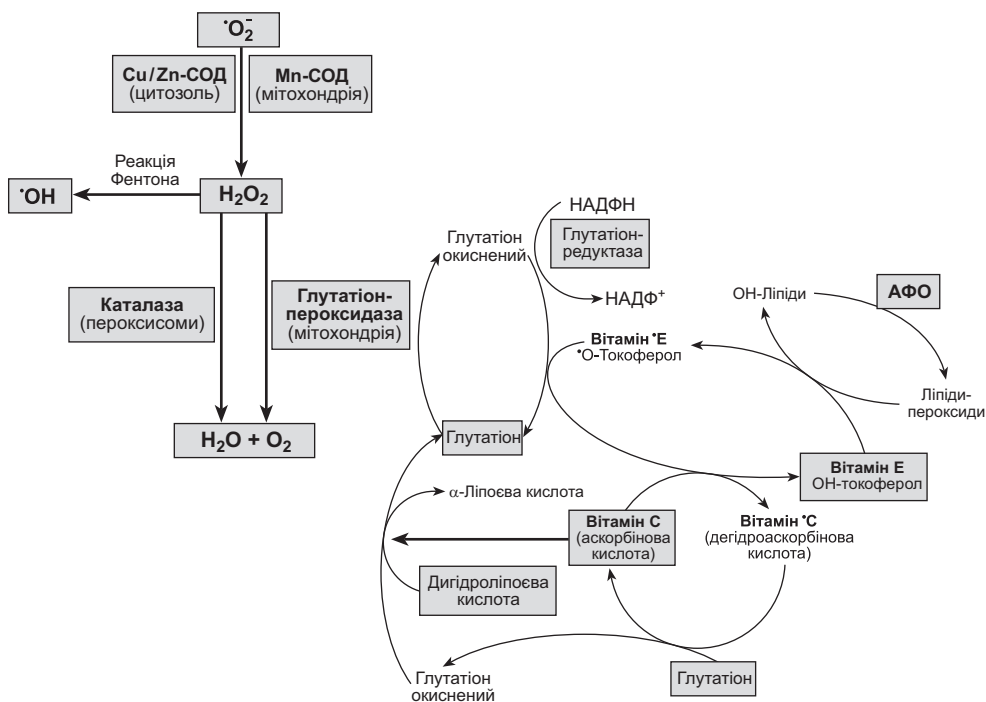


Рис. 12.6. Організація системи антиоксидантного захисту у клітині

Найрозповсюдженішим типом супероксиддисмутази є купрум/цинквмісна супероксиддисмутаза (в активному центрі одночасно містить Cu^{2+} і Zn^{2+}). Вона розташована у міжклітинному просторі (СОД3) чи у цитозолі клітин і міжмембранному просторі мітохондрій (СОД1).

Каталаза – фермент-гемопротеїн, який каталізує перетворення гідроген пероксиду:



У більшості випадків каталаза локалізована у пероксисомах, однак також наявна в мітохондріях. Вона має молекулярну масу 220–250 кДа і складається з чотирьох однакових субодиниць, кожна з яких містить один гем з Fe^{3+} . Крім H_2O_2 , каталаза взаємодіє з органічними гідропероксидами, утворюючи каталітично малоактивні комплекси.

Глутатіонпероксидаза – фермент, який бере участь у відновленні гідроген пероксиду (до води) та пероксидів ліпідів (до відповідних спиртів) за участю глутатіону:



де GSH – відновлений, GSSG – окиснений глутатіон.

У ссавців приблизно 70 % глутатіонпероксидази локалізовано в цитозолі, а 30 % – у мітохондріях. Структурно цей фермент є тетрамерним глікопротеїном із молекулярною масою 76–99 кДа. Глутатіонпероксидаза відіграє провідну роль в інактивації ліпідних гідропероксидів.

Глутатіонпероксидаза та каталаза задіяні в інактивації гідроген пероксиду. Який із цих двох ферментів буде активованим, залежить від концентрації пероксиду в клітині. За низького рівня гідроген пероксиду він розкладається переважно пероксидазою, а за збільшення його концентрації вступає у дію каталаза. Отже, каталаза та глутатіонпероксидаза є кооперативною внутрішньоклітинною системою, причому в метаболізмі H_2O_2 один ензиматичний механізм не виключає іншого.

Глутатіонредуктаза – фермент, головною функцією якого є підтримання достатнього рівня відновленого глутатіону через відновлення його дисульфідної форми за допомогою НАДФН як донора гідрогену:



Глутатіонредуктаза – флавопротеїн, молекула якого складається з двох ідентичних субодиниць із молекулярною масою 100–300 кДа. Це класичний цитозольний фермент усіх еукаріотичних клітин.

Глутатіонтрансферази – група ферментів, які призначені для детоксикації низки ксенобіотиків з утворенням меркаптидів:



Найбільша глутатіонтрансферазна активність притаманна гепатоцитам, але функціонують ці ферменти у тканинах різних органів.

Антиоксиданти неферментативної природи локалізуються як у гідрофобних, так і в гідрофільних компартментах клітин (наприклад, токоферол – у ліпофільному, глутатіон – у гідрофільному).

Основну кількість жиророзчинних антиоксидантів становлять жиророзчинні поліфеноли: токофероли, хінони, естрогени, каротиноїди. Ці речовини містять рухливий атом гідрогену, практично не взаємодіють з пероксидами ліпідів, але ефективно реагують з вільними радикалами. Унаслідок цього активний радикал замінюється на малоактивний радикал антиоксиданта, що призводить до обриву ланцюгової реакції. Тому інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів призводить до зниження рівня антиоксидантів.

Одним із найважливіших антиоксидантів мітохондрій є **кофермент Q_{10}** , або убіхінон, який є майже в усіх тканинах організму. Кофермент Q_{10} є переносником електронів у дихальному ланцюгу (див. розділ 10). Крім того, у своїй відновленій формі він ефективно захищає ліпіди біологічних мембран і ліпопротеїди крові від пероксидного окиснення, а також захищає ДНК та білки від окисної модифікації. Його основна функція полягає у відновленні токофероксильного радикала до токоферолу.

Токоферол – основні природні антиоксиданти у тварин. α -Токоферол (вітамін Е) локалізований у мембранах ядра (50 %), мітохондрій (30 %) і мікросом (20 %). Після взаємодії з пероксидними сполуками утворюється токофероксильний радикал, який є стабільним і не реагує з ненасиченими жирними кислотами, тому не бере участь у розгалуженні ланцюгових реакцій (рис. 12.7). За гіповітамінозу Е активуються процеси пероксидного окиснення ліпідів, порушується функціонування іонтранспортних систем, біосинтез білка та функціонування ядерного хроматинового апарату клітини.

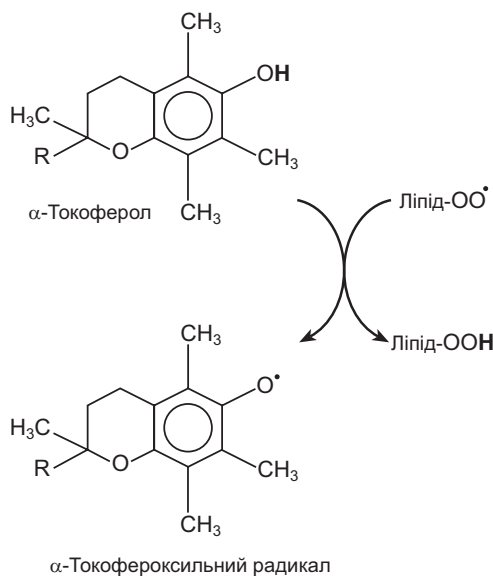


Рис. 12.7. Механізм дії жиророзчинних антиоксидантів (на прикладі α -токоферолу)

Естрогени (жіночі статеві гормони) є потужними антиоксидантами завдяки своїй ліпофільності й мембранотропним властивостям. Механізм їхньої антиоксидантної дії подібний до дії вітаміну Е.

Каротиноїди – жиророзчинні сполуки з менш чітко вираженими антиоксидантними властивостями. В організм людини надходять з їжею. Виявлені в усіх органах і тканинах тварин, проте найбільше їх є у печінці, жировій тканині та наднирниках. β -Каротини мають довгий ланцюг кон'югованих подвійних зв'язків, що дає змогу ефективно перехоплювати вільні радикали. β -Каротин може реагувати з пероксил-радикалом, перетворюючись на стабільний низькоактивний радикал. Свої антиоксидантні властивості β -каротин проявляє за умов низького напруження кисню, а гіпероксія зумовлює аутокаталітичний прооксидантний ефект.

Цитохром с – переносник електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, який здатний також ефективно інактивувати супероксид-аніон. Окиснений цитохром с може відновлюватись як у дихальному ланцюзі, приймаючи електрон, так і супероксид-аніоном, за регенерації мітохондріальною цитохром-с-оксидазою.

Аскорбінова кислота (вітамін С) – важливий водорозчинний антиоксидант, який в організмі людини не синтезується, а надходить із харчовими продуктами (переважно з овочами та фруктами), в тому числі у вигляді окисненої форми – дигідроаскорбінової кислоти. Однією з основних властивостей вітаміну С є здатність до окисно-відновних перетворень. Аскорбінова кислота здатна окиснюватися в дигідроаскорбінову кислоту. Разом з нею вони утворюють окисно-відновну пару, яка здатна приймати і віддавати електрони та протони. Вітамін С може взаємодіяти з радикалами токоферолу, глутатіону та сечової кислоти, відновлюючи їх, а також інактивувати водорозчинні пероксидальні радикали. Однак за високих концентрацій аскорбінова кислота може бути про-оксидантом.

Глутатіон є трипептидом і утворений цистеїном, глутаміновою кислотою та гліцином. Він може перебувати в окисненій (GS-SG) та відновленій (GSH) формах і входить до основного клітинного фонду мобільних сульфгідрильних груп. Антиоксидантна дія глутатіону пов'язана з ферментами глутатіонпероксидазою, глутатіонредуктазою та глутатіонтрансферазами (рис. 12.8). Як ефективний відновник глутатіон відіграє важливу роль у процесах детоксикації. Його відновлена форма легко реагує з гідроксильними та карбонільними вільними радикалами.

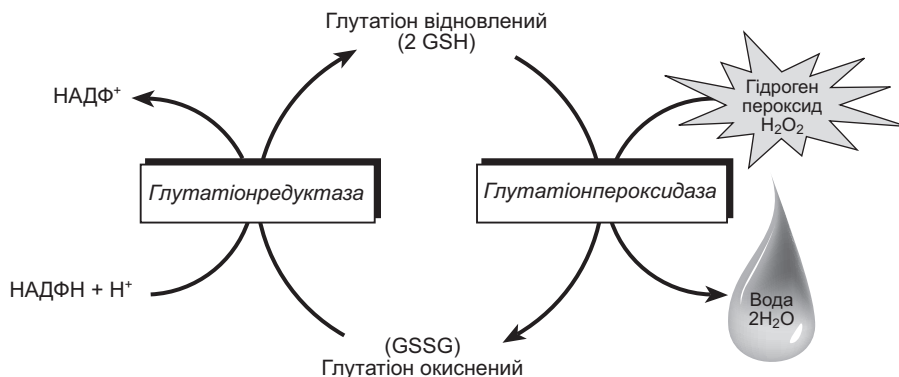


Рис. 12.8. Роль глутатіону в підтриманні антиоксидантного статусу клітини

Старіння – складний процес, який супроводжується поступовим розладом фізіологічних функцій організму та зменшенням його адаптивних можливостей. Багатогранність цього процесу є причиною багатьох теорій і гіпотез, які пояснюють закономірності й напрям вікових змін організму. Однією з найбільш загальноновизнаних є вільнорадикальна теорія Денгема Гармана (Denham Harman), запропонована у 1956 р. Згідно з цією теорією, старіння та захворювання, які його супроводжують, є наслідком нагромадження з віком вільнорадикальних ушкоджень



структур клітини. Д. Гарман стверджував, що середня тривалість життя може бути збільшена приблизно на п'ять років за дотримання низько-калорійної дієти та споживання антиоксидантів. У 1972 р. Д. Гарман зробив припущення, що так званим біологічним годинником живих організмів є мітохондрія, оскільки основна кількість активних форм кисню та його метаболітів утворюється в мітохондріальному ланцюгу переносу електронів, і модифікував свою початкову теорію в мітохондріальну теорію старіння. Згідно зі сучасною інтерпретацією теорії, основну роль в ушкодженні біологічних молекул і,

насамперед, ДНК відіграють активні форми кисню, які продукують мітохондрії. Накопичення цих ушкоджень зумовлює розвиток хворіб, старіння та смерть.

Однак, незважаючи на численні дослідження, докази кореляції між зниженням рівня активних форм кисню і збільшенням тривалості життя у кращому випадку фрагментарні й часто суперечливі. Зокрема, помилково прив'язувати вільнорадикальну теорію до "швидкості життя", спекулюючи на факті, що більші тварини зазвичай живуть довше і мають нижчі швидкості метаболізму. Відомо, що соматичні мутації в мтДНК накопичуються з віком і тоді, коли знижується функція дихального ланцюга. Тим не менш, ці процеси не можуть бути пов'язані між собою, бо навіть найінтенсивніші рівні мутацій або делецій (0,5–2 %) перебувають нижче порога, який міг би формувати біоенергетичний дефіцит. Тоді як вільнорадикальна теорія припускає, що підвищений рівень активних форм кисню призводить до функціонального погіршення, що супроводжує процес старіння, протилежний погляд завойовує довіру. Згідно з цим поглядом, помірні рівні активних форм кисню в підсумку мають протекторну функцію, бо включають систему антиоксидантного захисту, а це, врешті-решт, переважає будь-які початкові пошкодження. Це є прикладом концепції мітогормезису, в якому м'яке зберігаюче обмеження мітохондріальної біоенергетичної ємності активує компенсаторні шляхи, наприклад, за допомогою фактора транскрипції PGC1 α та/або АМФ-залежної кінрази, щоб збільшити мітохондріальний біогенез. Мітогормезис може лежати в основі парадоксального висновку, що метформін, слабкий інгібітор комплексу І дихального ланцюга, є ефективним засобом у боротьбі з цукровим діабетом другого типу, збільшуючи біоенергетичний потенціал мітохондрій печінки та пригнічуючи глюконеогенез. Так само 2,4-динітрофенол, класичний протоніофор, який у 1930-х роках пропонували як засіб для схуднення, може в ретельно контрольованих умовах обмежувати оксидативне пошкодження і трохи продовжити термін життя у мишей.



Підсумок 12: МІТОХОНДРІЇ Й АКТИВНІ ФОРМИ ОКСИГЕНУ

- Одночасно з окисним фосфорилуванням, у якому використовується до 90 % кисню, що споживається організмом, у клітинах постійно відбуваються реакції з утворенням активних форм оксигену, які є фізіологічними продуктами життєдіяльності клітин.
- Основним джерелом активних форм оксигену є мітохондрії, хоча вони також утворюються в цитоплазмі, мікросомах, мембранах ядра й ендоплазматичного ретикулу. Активні форми оксигену утворюються ферментативним і неферментативним способами.
- До основних активних форм оксигену, що утворюються в дихальному ланцюзі мітохондрій, належать супероксид-аніон, пероксид-аніон і гідроксил-радикал.
- Надмірна кількість активних форм оксигену сприяє окисному ушкодженню ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, тобто розвитку оксидативного стресу, що є причиною більшості патологічних процесів.
- Для підтримання фізіологічного рівня активних форм оксигену функціонує складна система антиоксидантного захисту, що включає ферментативну і неферментативну ланки. У клітинах антиоксидантну функцію виконують супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза, хінони, токоферолі, аскорбінова кислота, глутатіон та ін.

**ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

1. Яка роль мітохондрій в утворенні активних форм оксигену?
2. Охарактеризуйте загальне значення активних форм оксигену для організму.
3. Яким є фізіологічне і патологічне значення процесів пероксидного окиснення ліпідів для організму?
4. Виберіть реакцію, в якій наведено утворення супероксид-аніона:
 - 1) $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^- + \cdot O_2^-$;
 - 2) $2\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2$;
 - 3) $H_2O_2 + e^- \rightarrow \cdot OH + OH^-$;
 - 4) $\cdot R + O_2 \rightarrow \cdot O_2R$.
5. Вкажіть, які комплекси дихального ланцюга мітохондрій є основними джерелами активних форм оксигену:
 - 1) I і III комплекси;
 - 2) III і IV комплекси;
 - 3) II і III комплекси;
 - 4) II і IV комплекси.

6. Фермент, який знешкоджує супероксид-аніон, – це:

- 1) каталаза;
- 2) супероксиддисмутаза;
- 3) глутатіонпероксидаза;
- 4) глутатіонредуктаза.

7. Реакція $\cdot\text{O}_2^- + \cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ каталізується:

- 1) каталазою;
- 2) супероксиддисмутазою;
- 3) глутатіонпероксидазою;
- 4) глутатіонредуктазою.

8. Виберіть ферменти, що можуть здійснювати розкладання гідроген пероксиду:

- 1) каталаза;
- 2) супероксиддисмутаза;
- 3) глутатіонпероксидаза;
- 4) глутатіонредуктаза.

9. Найбільшу здатність до пероксидного окиснення мають:

- 1) фосфатидилдетаноламін і фосфатидилсерин;
- 2) сфінгомієлін і фосфатидилхолін;
- 3) фосфатидилхолін і холестерин;
- 4) сфінгомієлін і глікозиди.

**ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

- Дробот Л.Б., Самойленко А.А., Воротніков А.В.* та ін. Reactive oxygen species in signal transduction // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 6. – С. 209–217.
- Becker L.B.* New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology // Cardiovascular Research. – 2004. – Vol. 61. – P. 461–470.
- Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L.* et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Am. J. Physiol. – 2004. – Vol. 287, N 4. – P. 817–833.
- Grivennikova V.G., Vinogradov A.D.* Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1827(3). – P. 446–54.
- Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. – 1956. – Vol. 11, N 3. – P. 298–300.
- Harman D.* A biologic clock: the mitochondria? // J. Am. Geriatric Soc. – 1972. – Vol. 20, N 4. – P. 145–147.
- Salgado P., Melin M., Contreras D.* et al. Fenton reaction driven by iron ligands // Chil. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 58, N 4. – P. 1842–1847.

“БУРШТИНОВА” ЕНЕРГЕТИКА

- Структура та властивості сукцинату і сукцинатдегідрогенази
- Нові дані про функціональну та структурну організацію циклу Кребса
- Лімфоцити крові – “вікно” в енергетику організму
- Терапевтична дія сукцинату й інших субстратів циклу Кребса

Сукцинат займає особливе місце в біоенергетиці та сигналізації клітин. Він є важливим проміжним продуктом обміну живих організмів, що бере участь у процесах клітинного дихання. Інші назви цієї двохосновної насиченої карбонової кислоти – бурштинова кислота, янтарна кислота, бутандіонова кислота, етан-1,2-дикарбонова кислота.

13.1. СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ СУКЦИНАТУ І СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ

Уперше сукцинат був отриманий у XVII ст. перегонкою бурштину (лат. *succinum* – бурштин). У незначних кількостях він міститься в бурому вугіллі та смолах, а також у деяких рослинах (соняшникове насіння, зелений агрус та ін.), сухих винах і пиві, надаючи їм комбінованого смаку солоного, гіркого та кислого. Чиста кислота має вигляд безколірних кристалів з температурою плавлення 185 °С і температурою кипіння 235 °С. Сукцинат розчиняється у воді та спирті, але нерозчинний у бензолі, бензині, хлороформі. Метиленові групи бурштинової кислоти мають високу реакційну здатність завдяки впливу карбоксильних груп.

Завдяки своїм хімічним властивостям сукцинат є важливим і особливим проміжним продуктом обміну живих організмів, що бере участь у процесах клітинного дихання та внутрішньоклітинної сигналізації.

У промисловості сукцинат отримують гідруванням малеїнового альдегіду або фумарової кислоти. У харчовій промисловості сукцинат використовують як добавку під кодом E363. У фармацевтичній промисловості сукцинат випус-

кають у таблетках “Бурштинова кислота”, “Янтарна кислота” і “Янтавіт”. Бурштинову кислоту використовують для синтезу деяких барвників, інсектицидів, пластмас, ароматичних сполук, лікарських засобів. Також використовують у сільському господарстві як добриво, оскільки вона прискорює дозрівання плодів, підвищує холодо- та посухостійкість, стійкість до захворювань, урожайність, збільшує вміст вітамінів і цукрів у плодах. Щорічна продукція сукцинату становить 16 000–30 000 т зі щорічним зростанням на 10 %.

Сукцинат утворюється зі сукциніл-КоА на п'ятому етапі циклу Кребса у три стадії. На останній із них фосфатна група ферменту сукцинаттіокінази переноситься з гістидинового залишку на кінцевий фосфат молекули ГДФ чи АДФ.

Утворення сукцинату зі сукциніл-КоА на п'ятому етапі у циклі Кребса й енергетичний “профіль” цієї реакції проаналізовано в розділах 9 і 10 (див. також рис. 9.4). Ця реакція відбувається у три стадії. На першій із них пірофосфатна група заміщує КоА, зв'язаний з молекулою сукциніл-КоА, утворюючи високоенергетичний ацилфосфат. На наступній стадії сукцинілфосфат віддає свою фосфатну групу на залишок гістидину в молекулі ферменту сукциніл-КоА-синтети (інша назва – сукцинаттіокіназа), утворюючи високоенергетичний фосфогістидиловий фермент. Далі фосфатна група переноситься з гістидинового залишку на молекулу кінцевого фосфату, яким є ГДФ (чи АДФ), утворюючи ГТФ (чи АТФ).

На шостому етапі циклу Кребса сукцинатдегідрогеназа каталізує окиснення сукцинату до фумарату (рис. 13.1) з відновленням убіхінону до убіхінолу. У цій реакції два атоми гідрогену вилучаються зі субстрату (сукцинату) за допомогою ФАД, який слугує простетичною групою, міцно приєднаною до сукцинатдегідрогенази. Два електрони із комплексу сукцинатдегідрогеназа-ФАДН₂ передаються до убіхінону – розчинного компонента дихального ланцюга. Потік електронів у дихальному ланцюгу від сукцинату до кінцевого акцептора електронів – О₂ спряжений зі синтезом близько 1,5 молекули АТФ на пару електронів.

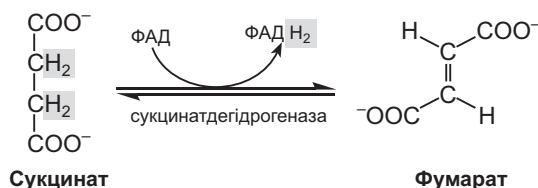


Рис. 13.1. Окиснення сукцинату до фумарату

Сукцинатдегідрогеназа (інші назви – сукцинат-КоQ-редуктаза, комплекс II дихального ланцюга) – це флавопротеїновий ферментний комплекс у внутрішній мембрані мітохондрій. Це єдиний фермент, який бере участь і в циклі Кребса, і в транспорті електронів дихальним ланцюгом.

Сукцинатдегідрогеназа є у внутрішній мембрані мітохондрій еукаріотів і бере участь як у циклі Кребса, так і у транспорті електронів дихальним ланцюгом. Вона складається з двох гідрофільних і двох гідрофобних субодиниць.

Сукцинатдегідрогеназа складається з чотирьох субодиниць – двох гідрофільних і двох гідрофобних (рис. 10.2). Перші дві субодиниці – флавопротеїн (SdhA) і ферум-сульфурний білок (SdhB) – є гідрофільними. SdhA містить ковалентно приєднаний кофактор ФАД і сукцинатзв’язувальний сайт. SdhB містить три ферум-сульфурних кластери: $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ і $[3\text{Fe}-4\text{S}]$. Дві інші субодиниці – SdhC і SdhD – це гідрофобні “заякорені” у мембрану білки. SdhC і SdhD утворюють мембранозв’язаний комплекс зі шістьма трансмембранними сегментами, що містять один гем *b* і убіхінонзв’язувальний сайт. Дві фосфоліпідні молекули (одна із них – кардіоліпін, а інша – фосфатидилетаноламін) також знайдені у SdhC і SdhD. Убіхінонзв’язувальний сайт розташований поміж SdhB, SdhC і SdhD субодиницями, а сайт зв’язування субстрату – на SdhA. Загальна довжина шляху перенесення електронів від центру зв’язування сукцинату до ФАД, і далі через ферум-сульфурні протеїни до центру зв’язування Q, становить понад 40 Å. Проте довжина окремих ланок шляху не перевищує 11 Å. Саме такий розмір є оптимальним для швидкого перенесення електронів.

Механізм окислення сукцинату передбачає, що ФАД, а також амінокислотні залишки Glu255, Arg286, His242 зі субодиниці A можуть ініціювати процес його депротонування. Після того як електрони від’єднуються від сукцинату, вони відновлюють ФАД і далі проходять через ферум-сульфурні кластери, доки не досягнуть кластеру $[3\text{Fe}-4\text{S}]$. Далі електрони передаються до активного сайту убіхінону. Для повного відновлення убіхінону до убіхінолу потрібно два протони і два електрони.

Гем *b* субодиниць SdhC/SdhD, очевидно, не задіяний безпосередньо у перенесенні електронів, натомість він може слугувати для зменшення “витоку” електронів зі системи під час їхнього руху від сукцинату до кисню. Поява таких електронів може приводити до утворення активних форм оксигену – гідроген пероксиду (H_2O_2), супероксид-аніона (O_2^-) та ін. (розділ 12).

Інгібітори сукцинатдегідрогенази з’єднуються зі сукцинатним або з убіхіноновим сайтом зв’язування. До першої групи інгібіторів належить структурний синтетичний аналог сукцинату – малонат (рис. 10.2), а також два інтермедіати циклу Кребса – малат і оксалоацетат. До інгібіторів другої групи належать карбоксин і теноїлтрифлуороацетон.

У циклі Кребса сукцинатдегідрогеназа каталізує окиснення сукцинату до fumarату з відновленням убіхінону в дихальному ланцюгу мітохондрій. У цій реакції два атоми водню вилучаються зі сукцинату за допомогою ФАД. Потік електронів від сукцинату в дихальному ланцюгу мітохондрій спряжений зі синтезом 1,5 молекули АТФ на пару електронів.

Ключова роль сукцинатдегідрогенази у транспорті електронів підкреслюється тим, що за вилучення її з геному ембріони мишей гинуть. Мутація *SdhA* призводить до синдрому Лі (Leigh), мітохондріальної енцефалопатії та оптичної атрофії. Мутації *SdhB* спричиняють утворення злоякісних пухлин у хроматинових клітинах, парагангліому, родинну феохромоцитому, скорочення життя і стимулюють утворення супероксид-аніона. За мутацій *SdhD* виникають доброякісні пухлини в ділянці голови та шиї.

Сукцинатдегідрогеназа, окрім генерування енергії в мітохондріях, відіграє важливу роль у чутливості до кисню (oxygen sensing) і супресії ракових пухлин. Особи, у яких є точкові мутації в субодиницях комплексу II поблизу гему *b* чи убіхінон-зв'язувального центру, хворіють на спадкову парагангліому, для якої характерні пухлини в каротидному тілі – органі, що розташований у ділянці внутрішніх сонних артерій і чутливий до рівня O_2 у крові. Такі мутації призводять до утворення більшої кількості АФО і, можливо, до більшого ушкодження тканини за окиснення сукцинату.

13.2. НОВІ ДАНІ ПРО ФУНКЦІОНАЛЬНУ ТА СТРУКТУРНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ЦИКЛУ КРЕБСА

У сучасних монографіях цикл Кребса описують як стехіометрично збалансовану послідовність перетворення одного ацетил-КоА і восьми трикарбонових кислот: цитрату, *цис*-аконітату, ізоцитрату, α -кетоглутарату, сукциніл-КоА, сукцинату, фумарату, малату й оксалоацетату. Конденсація оксалоацетату з ацетил-КоА, який утворюється за окиснення пірувату (або жирних кислот і амінокислот), приводить до утворення лимонних кислот (цитрату й ізоцитрату) і підтримує цикл. Традиційно вважають, що за переходу від спокою до активного стану прискорюється перебіг усіх етапів циклу Кребса. Найповільнішими ферментами циклу Кребса є початкові – цитратсинтетаза й ізоцитратдегідрогеназа. Згідно з класичними біохімічними уявленнями, саме найповільні-



М.М. Кондрашова
1928 р.н.

ші реакції визначають інтенсивність усіх подальших етапів перетворень. Проте відомо, що цикл Кребса не є замкнутою системою: виявлено низку шляхів відтоку інтермедіатів із циклу і притоку в нього (розділ 9). Відповідно до прийнятих тверджень, ці реакції не змінюють перебігу циклу, оскільки компенсують одна одну. Отже, вважається, що окислення всіх інтермедіатів циклу Кребса робить однаковий внесок в енергозабезпечення фізіологічних функцій. Однак дослідженнями професора Марії Кондрашової і співавт. (1977–2017) було виявлено, що активація дихання у тканинах за функціонального навантаження чи за певних патологічних умов може бути зумовлена посиленням окислення одного

з інтермедіатів циклу Кребса – сукцинату, тоді як окислення НАД-залежних субстратів істотно не підвищується. Аналіз цього феномена привів авторів до думки, що за активації фізіологічних функцій чи певних патологічних відхилень у тканині відбувається інший, коротший і швидший цикл, ніж повний цикл Кребса [Кондрашова, 1989].

Згідно з принципом найменшої дії, який є універсальним фізичним законом, із усіх можливих шляхів системи у конфігураційному просторі реалізується той, який відповідає мінімальному значенню дії. За П'єром Ферма, «*природа завжди обирає найкоротший шлях*» (мовою оригіналу: *à savoir que la nature agit toujours par les voies les plus courtes et les plus simples*). Професор Сімон Шноль вважає, що цей принцип спостерігається і в хімічних системах розгалужених реакцій, де реалізується найшвидший механізм і найкоротший шлях. Однак прийняттю цього уявлення в біохімії та фізіології заважає традиційна думка про те, що саме найповільніші реакції утворення цитрату й ізоцитрату визначають перебіг циклу Кребса.

Функціональні та структурні зв'язки в організації процесів окиснення у мітохондріях дали змогу запропонувати механізм істотного прискорення утворення сукцинату за активного функціонування органа чи організму. Треба зазначити, що більшість описаних механізмів надходження субстратів у цикл Кребса реалізуються через утворення сукциніл-КоА, сукцинату і α -кетоглутарату. Марія Кондрашова (1989, 1991) віддає перевагу надходженню високо-ефективного сукцинату через сукциніл-КоА із α -кетоглутарату, який, у свою чергу, утворюється не через ланку лимонних кислот циклу Кребса, а через переамінування глутаміну й оксалоацетату, що здійснюється аспартатамінотрансферазою (рис. 13.2; див. також розділ 8).

Вибіркова активація окиснення сукцинату в клітинах за функціонального навантаження чи за певних патологічних умов може забезпечувати підвищені енергетичні потреби завдяки функціонуванню коротшого, а відтак швидшого циклу карбонових кислот, ніж повний цикл Кребса.

Цей шлях, згідно з літературними даними [Кондрашова, 1984–1992; Бабський и др., 1985; Parlo, Coleman, 1986], можна вважати важливим механізмом інтенсивного утворення сукцинату за інтенсифікації функціональної активності клітини. Зростання ролі сукцинату в енергозабезпеченні клітин спостерігають за посилення процесів життєдіяльності організму, а також за патологічних станів. Як і початок цього шляху (утворення α -кетоглутарату), так і його кінець (утворення оксалоацетату), відрізняються від таких процесів у класичному циклі Кребса.

Поповнення запасів оксалоацетату для аспартатамінотрансферази здійснюється через карбоксилювання пірувату. Методом ЯМР на живих тваринах встановлено, що за умов *in vivo* піруват переважно не декарбоксилюється, постачаючи ацетил-КоА, згідно з класичною схемою циклу лимонної кислоти,

а переважно карбоксилується до оксалоацетату (рис. 13.2, 2), з якого утворюється глутамат [Stromski, Arias-Mendoza, 1986]. Окрім цього, за дії різних гормонів (зокрема, глюкагону і кортизолу) зростає надходження у мітохондрії малату із цитозолу, що підвищує інтенсивність дихання [Leverve et al., 1986; Bobyleva-Guarriero, Lardy, 1989]. Цей ефект відтворюється завдяки введенню тваринам екзогенного малату. Марія Кондрашова (1989) вважає, що малат є попередником оксалоацетату аспаратамінотрансферазного компартменту мітохондрій. Сильна активація малатом дихання мітохондрій, очевидно, зумовлена ендогенним сукцинатом, що утворюється з α -кетоглутарату. Процес утворення ендогенного сукцинату за участі трансаміназ та α -кетоглутаратдегідрогенази є досить швидким процесом і не гальмується регуляторами, які інгібують цитратсинтазу й ізоцитратдегідрогеназу. Фізіологічне значення такої послідовності перетворень полягає у швидкому утворенні ендогенного сукцинату, окислення якого є потужним джерелом потоку протонів і електронів у дихальний ланцюг, що значно перевищує потік від інших субстратів циклу Кребса (або лимонної кислоти) (рис. 13.2).

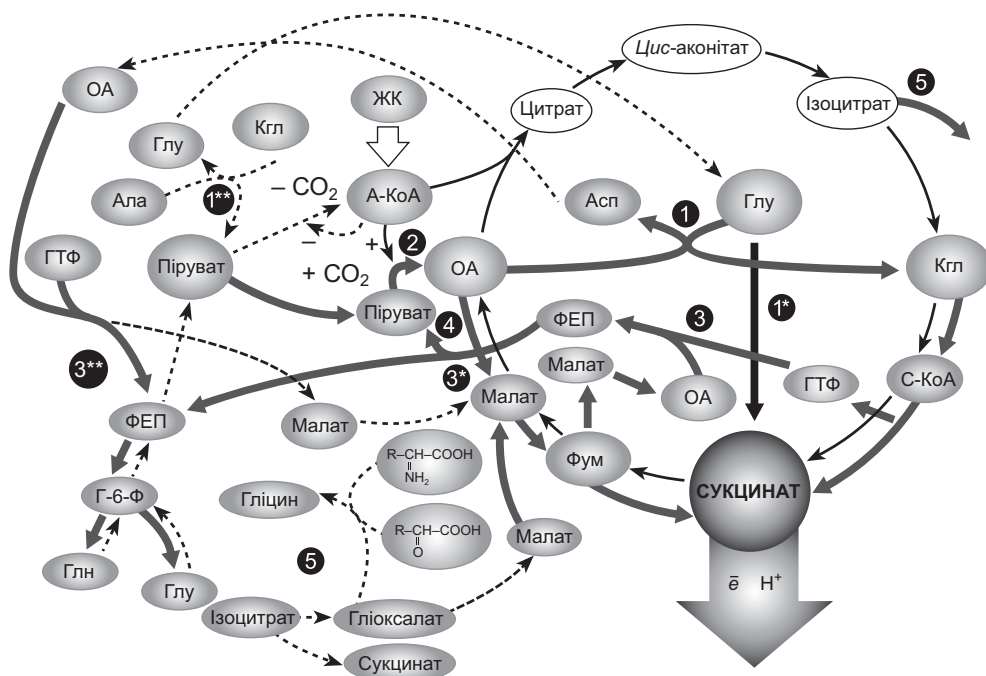


Рис. 13.2. Повний (повільний – тонкі суцільні лінії) і короткий (швидкий – товсті лінії) шляхи окиснення субстратів у клітині; пунктиром позначено додаткові до короткого циклу метаболічні перетворення. 1, 1*, 1** – трансамінази; 2 – піруваткарбоксилаза; 3, 3*, 3** – утворення та метаболічні перетворення фосфоенолпірувату; 4 – зворотний шлях циклу Кребса за гіпоксії; 5 – гліоксала́тний цикл; скорочення: Ала – аланін; Асп – аспарат; А-КоА – ацетил-КоА; Глн – глутамін; Глу – глутамат; Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат; ЖК – жирні кислоти; Кгл – α -кетоглутарат; ОА – оксалоацетат; С-КоА – сукциніл-КоА; ФЕП – фосфоенолпіруват; Фум – фумарат. Інші пояснення див. у тексті [Кондрашова, 1989]

Трансамінази є такими ж необхідними учасниками енергетичного метаболізму, як і ферменти циклу Кребса. Актуальність трансаміназного шляху надходження сукцинату була виявлена навіть за адаптації клітин до кисневого голодування [Маевський и др., 2000]. За гіпертрофованого утворення холестерину в мітохондріях вони повністю втрачають здатність окислювати цитрат, і в них функціонує, за висловом авторів, “відрубаний” цикл трикарбонових кислот [Parlo, Coleman, 1986], який, по суті, збігається з наведеною на рис. 13.2 схемою. Ці та інші дані вказують на те, що ацетил-КоА, перетворюючись на цитрат, переважно є матеріалом швидше для синтетичних процесів, ніж для окислення. Утворений з ацетил-КоА цитрат переходить в цитозоль і у великих кількостях використовується для синтезу жирних кислот, холестерину, ацетилхоліну, а також у самих мітохондріях залучений в елонгацію жирних кислот (див. розділ 5).

Представлена схема спряженого функціонування трансаміназного циклу та циклу Кребса, акцентуючи увагу на переважному окисленні сукцинату за умов функціональних навантажень організму чи за патології, не заперечує і можливість використання енергії окислення інших субстратів, зокрема, α -кетоглутарату після довготривалої адаптації [Доліба, 1993]. Таке “перемикання” використання різних енергетичних субстратів має свою функціональну доцільність. Окислення сукцинату, незважаючи на його високу інтенсивність, має менший коефіцієнт корисної дії (к.к.д.), зумовлений включенням у роботу тільки двох пунктів спряження дихання й окисного фосфорилування. Тому за величиною спожитого кисню для синтезу АТФ окислення сукцинату є менш ефективним під час довготривалої адаптації, ніж окислення НАД-залежних субстратів.

Структурна організація ферментів матриксу мітохондрій добре погоджується з вищенаведеними даними про тісний зв'язок аспартатамінотрансферази з процесами окислення в мітохондріях. Встановлено, що ферменти циклу Кребса, які розміщені в матриксі, не просто “плавають” у розчині, а організовані в мультиферментний комплекс – метаболон¹ [Любарев, Курганов, 1987]. Об'єднання ферментів у комплекс створює умови для прискорення їхньої взаємодії і кооперативного функціонування. Особливо важливою властивістю такої системи є можливість обміну субстратами й енергією через фізичну взаємодію (тунелювання)² без вивільнення метаболітів у розчин.

Виявилося, що ферменти швидкого циклу, а саме окислення дикарбонових кислот і трансамінування, формують тісний асоційований агрегат у центрі комплексу (рис. 13.3). Натомість ферменти окислення трикарбонових кислот розміщені на периферії. Беручи до уваги таку структурну організацію, швидкий цикл (цикл дикарбонових кислот) можна уявити як вкладений у цикл трикарбонових кислот [Кондрашова, 1989].

¹ Метаболон – тимчасовий структурно-функціональний комплекс, сформований ферментами одного метаболічного шляху, які утримуються разом нековалентними взаємодіями і адсорбовані на частині клітинної структури (наприклад, ділянці мембрани чи цитоскелету)

² Тунелюванням у квантовій механіці називають здатність електронів проникати крізь потенційний бар'єр навіть у тому разі, коли для цього недостатньо енергії. Якщо між білковими молекулами є хоча б кілька молекул H_2O , ефективність тунелювання різко зростає

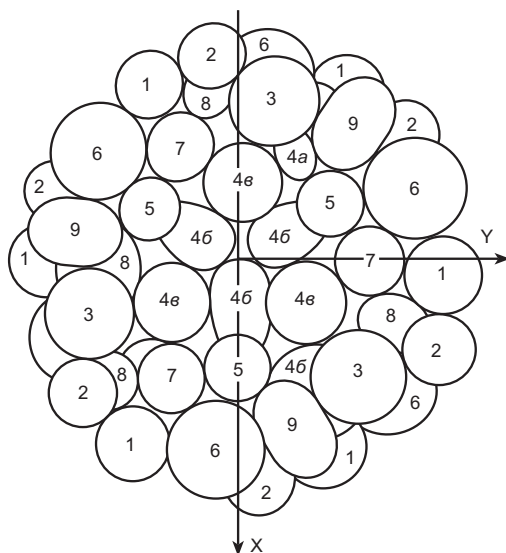


Рис. 13.3. Реконструкція структурної організації ферментів окислення у мітохондріях: 1 – цитратсинтаза; 2 – аконітаза; 3 – ізоцитратдегідрогеназа; 4а – кетоглутаратдегідрогеназа; 4б – трансукцинілаза; 4в – сукцинаттіюкіназа; 6 – фумараза; 7 – малатдегідрогеназа; 8 – аспартатамінотрансфераза; 9 – нуклеозиддифосфокіназа [за Любаревим, Кургановим, 1987]

Виявлено також цікаві дані про взаємодію ферментів, а також про алостеричні властивості субстратів циклу Кребса, які здатні регулювати функціональну організацію комплексу дегідрогеназ дикарбонових кислот, аспартатамінотрансферази і цитратсинтази. Особливо важливим для розуміння швидкого циклу є встановлення альтернативного зв'язку між компонентами комплексу: фумараза–малатдегідрогеназа з цитратсинтазою або з аспартатамінотрансферазою [Beeckmans, Kanarek, 1981]. Ця альтернативна взаємодія є ніби “залізничною стрілкою” перемикання метаболічних шляхів, наприклад, перетворення оксалоацетату на цитрат чи α -кетоглутарат. Аспарагін посилює взаємодію між глутаматдегідрогеназою і аспартатамінотрансферазою, а малат послаблює цю взаємодію. Цитрат і α -кетоглутарат можуть спричинити відщеплення малатдегідрогенази від комплексу α -кетоглутаратдегідрогенази з аспартатамінотрансферазою [Fahien et al., 1988].

Отже, на основі структурно-функціональної організації мітохондріальних процесів показано, що за зростання клітинної активності в мітохондріях вмикається швидкий механізм утворення сукцинату через спряження аспартатамінотрансферазної (глутаматоксалоацетаттрансаміназної) і α -кетоглутаратдегідрогеназної реакцій. Встановлено, що цей шлях замикається в цикл за участю цитозольних трансаміназ, які підтримують надходження глутаміну, пірувату й малату в мітохондрії, і, таким чином, оминається початкова повільна ділянка циклу Кребса.

Ілюстрація потенційно важливої ролі амінотрансферазних реакцій у забезпеченні енергетичних процесів наведена вище (див. розділ 8).

13.3. ЛІМФОЦИТИ КРОВІ ЯК “ВІКНО” В ЕНЕРГЕТИКУ ОРГАНІЗМУ

Останніми роками цікавим об’єктом біоенергетичних процесів стали лімфоцити крові. Відомо, що рівень лімфоцитів відображає стан імунної системи та рівень катехоламінів у крові. У клінічних дослідженнях цитохімічна активність сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах, визначена за рівнем відновлення тетразолієвих барвників у мазку крові, є інформативним показником інтенсивності метаболізму в організмі [Нарцисов, 1969; Зарецька, 1983; Петричук и др., 2005]. Клінічна цитохімія розглядає клітину як інформативну функціональну систему, що відображає зміни стану цілого організму. У лабораторії Марії Кондрашової в Інституті теоретичної та експериментальної біофізики РАН розроблений новий цитобіохімічний метод визначення сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах крові, що поєднує переваги біохімічних і цитохімічних методів [Хундерякова, 2008].

Встановлено, що є кілька типів патернів фізіологічних станів організму здорових тварин або людей, які можуть слугувати чутливою індивідуальною характеристикою організму. Автори виділяють п’ять таких функціональних патернів:

- 1) глибокий спокій;
- 2) оперативний спокій;
- 3) стан помірної активації;
- 4) гіперактивація;
- 5) пригнічення.

Рівень обмеження чи пригнічення активності сукцинатдегідрогенази автори оцінюють за “деінгібуючим” впливом ізоцитрату, як це раніше встановлено на ізольованих мітохондріях у разі впливу стресорних доз адреналіну чи під час тривалого іммобілізаційного стресу [Бабский, Кондрашова, 1986]. Механізм такого “деінгібування” ще не до кінця з’ясований, але вважається, що таким чином нівелюється інгібування сукцинатдегідрогенази оксалоацетатом.

Використовуючи розроблений цитобіохімічний метод, виявлено посилення дії адреналіну в організмі, що спостерігали за зміною функціональних патернів із чітко вираженими стадіями помірної активації, гіперактивації та пригнічення. У новонароджених щурят активність сукцинатдегідрогенази лімфоцитів є вищою, ніж у дорослих тварин, і в спокої, і за фізіологічної активації адреналіном. У разі іммобілізаційного стресу щурів зареєстровано виражений перехід від гіперактивації до пригнічення сукцинатдегідрогенази.

Аналогічні переходи між функціональними патернами виявлено також у людей. Зокрема, у групі умовно здорових добровольців виявлено чотири типи функціональних патернів активності сукцинатдегідрогенази. А у пацієнтів із харчовою алергією і гіпертонією, на відміну від здорових людей, виявлено

збільшення амплітуди активності ферменту і виражену “деінгібуючу” дію ізоцитрату. Активність сукцинатдегідрогенази суттєво збільшується під час розвитку патології (це явище названо метаболічною гіпертрофією) і може слугувати чутливішим показником, ніж вимірювання артеріального тиску, для виявлення гіпертонії, а також оцінювання її розвитку й ефективності лікування.

Отже, проведені дослідження підтверджують клінічні дані про високу інформативність величини активності сукцинатдегідрогенази у лімфоцитах як показника функціонального стану організму.

Моніторинг активності сукцинатдегідрогенази (як і НАД-залежних дегідрогеназ) у клітинах лімфоцитів може бути використаний для експрес-оцінювання енергетичного обміну *in vivo* за різних фізіологічних і патологічних станів організму та для контролю ефективності лікування.

Активність сукцинатдегідрогенази й інших дегідрогеназ у лімфоцитах новонароджених з 1969 року досліджують у лабораторії Рюрика Нарцисова. На рис. 13.4 наведено стадії реакції клітинної популяції лімфоцитів у процесі розвитку перинатальної патології. Як видно, за кривою розподілу лімфоцитів із різною активністю сукцинатдегідрогенази можна діагностувати початок і перебіг захворювання, а також початок ремісії та клінічного одужання.

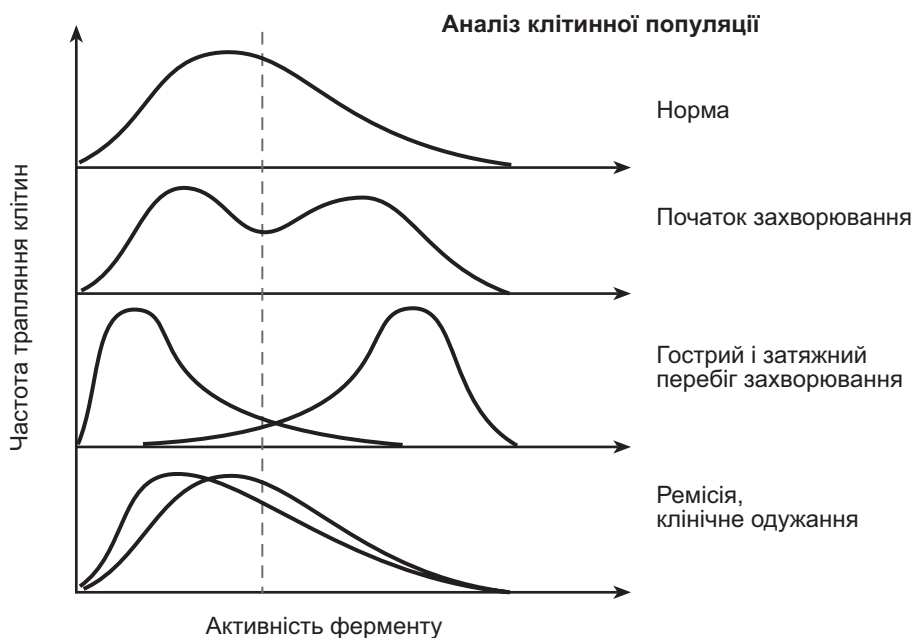


Рис. 13.4. Криві розподілу лімфоцитів за активністю сукцинатдегідрогенази у процесі розвитку перинатальної патології та її лікування [за Р. П. Нарцисовим]

Варіації активності сукцинатдегідрогенази за умови різних функціональних станів свідчать про реалізацію в організмі множинної регуляції цього ферменту. У більшості випадків висока активність сукцинатдегідрогенази у лімфоцитах корелює з великою кількістю лімфоцитів у крові. Літературні джерела підтверджують, що сукцинатдегідрогеназа є чутливою до багатьох природних речовин і лікарських препаратів. Деякі з них наведено на рис.13.5. Кола різного діаметра на рисунку – це різна активність сукцинатдегідрогенази у разі дії певних чинників. Мале коло всередині – активність у стані спокою. Гострий стрес (зигзагоподібні стрілки) спричиняє збільшення діапазону активності аж до максимального (зовнішнє коло). Проте ця тенденція стримується збільшенням кількості чинників, що обмежують гіперактивацію (прямі стрілки), завдяки чому реалізується не максимальна, а субмаксимальна відповідь (зубчасте коло). За хронічної дії стресорних чинників розвивається стійке пригнічення активності сукцинатдегідрогенази аж до нуля.

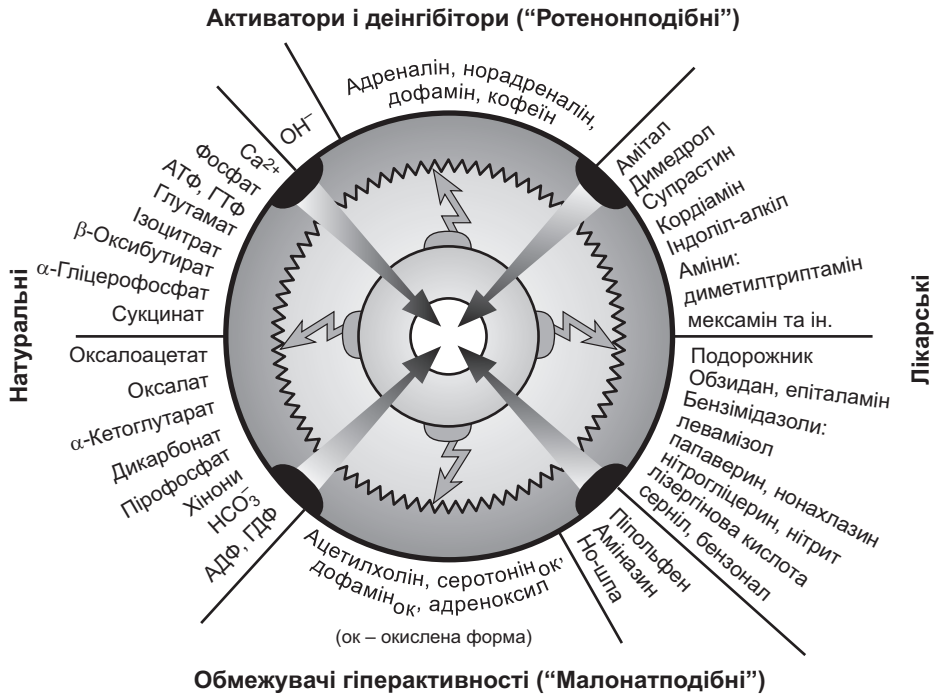


Рис. 13.5. Множинна модуляція активності сукцинатдегідрогенази природними речовинами та лікарськими препаратами. Пояснення див. у тексті [за результатами багаторічних досліджень М. Кондрашової та співроб.]

За образним висловлюванням професора Кондрашової, модуляція активності сукцинатдегідрогенази може бути своєрідним “кермом” мітохондріальної енергетики, що дає змогу обрати потрібний курс енергозабезпечення.

13.4. ТЕРАПЕВТИЧНА ДІЯ СУКЦИНАТУ

Унікальні біохімічні особливості сукцинату як потужного субстрату, окиснення якого, водночас, добре регулюється, зумовили підвищений інтерес до нього з боку медико-біологічної науки та практичної медицини. Ця зацікавленість зросла, коли у 70–80-х роках минулого століття широке коло патологічних відхилень почали пов'язувати з порушеннями метаболізму в мітохондріях (т. зв. мітохондріальні хвороби, див. розділ 17).

Унікальні особливості сукцинату як енергетичного субстрату і сукцинат-дегідрогенази як ферменту, що перебуває під множинною модуляцією природних і лікарських препаратів, можуть бути використані для розробки процедур лікування.

Унікальні терапевтичні властивості сукцинату були описані в 1996 р. у збірнику “Янтарная (сукцинат) кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве” за редакцією проф. М.М. Кондрашової. Деякі з цих властивостей наведено нижче.

Часто позитивні ефекти сукцинату пов'язані з його здатністю підтримувати **адаптаційну реакцію активації** (Л. Гаркаві та О. Квакіна). Ростовським фізіологам вдалося у більш ніж 85 % випадків підтримувати стійку реакцію активації, вводючи щурам сукцинат калію в дозах від 0,5 до 50 мг на 100 г маси тіла. Проте суттєвих змін лейкоцитарної формули за цих умов не було, як і збільшення наднирників чи зменшення маси тимусу. За допомогою сукцинату також вдалося підтримувати реакцію активації у тварин зі саркомою чи у пацієнтів із ішемічною хворобою серця, які перебували у стані хронічного стресу.

Сукцинат натрію (0,24–0,47 мМ) послаблював **метаболічний ацидоз** у печінці, що виникав після хіміотерапії туберкульозу в легенях, не тільки знижуючи концентрацію лактату (на 19 %), але і підвищуючи концентрацію пірувату (на 20 %; І. Височина та ін.). В. Малюк і Т. Сокирко відзначають зростання ефективності туберкулостатичних препаратів – іоназиду і поліазиду, коли паралельно вводили зараженим туберкульозом морським свинкам сукцинат натрію в дозі 200 мг/кг маси щоденно. У цих дослідках сукцинат сприяє нормалізації коефіцієнта АДФ/О для мітохондрій печінки, який сильно завищений у хворих на туберкульоз. Наприклад, у заражених тварин за окислення добавленого в полярографічну комірку сукцинату АДФ/О становить 2,80, а після введення поліазиду зі сукцинатом натрію – 1,99. Автори стверджують, що сукцинат, не маючи специфічної бактеріостатичної активності, має мембраностабілізуючу дію (можливо, завдяки зсувові жирнокислотного складу мітохондрій печінки в бік ненасичених компонентів), що значно знижує індекс туберкульозного пошкодження після хіміотерапії.

І. Дауранов та ін. використовували сукцинат натрію (150 мг/кг маси *per os*) для лікування **пневмонії немовлят**, яка часто є наслідком незрілості лімфоїдних

тканин. Окрім загального лікувального ефекту, дослідники встановили суттєві зміни імунної системи після впливу сукцинату, а саме запобігання підвищенню кількості В-клітин у крові хворих, зниження кількості малодиференційованих Т-клітин, прискорення дозрівання Т-клітин у тимусі й інші зміни. Позитивні зміни імунної системи внаслідок лікування гострих респіраторних захворювань у дітей встановлені також В. Івановою і співроб. Використання сукцинату натрію поряд зі звичайною патогенетичною терапією достовірно збільшувало продукцію імуноглобуліну А, сироваткового інтерферону, кількості Т-лімфоцитів, а за складних форм пневмонії – і В-клітин. Б. Резнік і Ж. Крайня для лікування одnorічних дітей, хворих на пневмонію, використовували пероральне введення сукцинату натрію в дозі 30 мг/кг маси. Окрім загальних показників одужання (зниження температури тіла, підвищення апетиту, зменшення токсикозу), автори виявили підвищення активності сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах, зростання рівня АТФ, нормалізацію кислотно-лужної рівноваги, відновлення нормальної серцевої діяльності. Ці дані підтверджують результати Н. Колеснікової і співроб. з Іжевського медінституту, які після використання сукцинату натрію для лікування дітей, хворих на пневмонію, спостерігали нормалізацію активності сукцинатдегідрогенази, α -гліцерофосфатдегідрогенази та кислої фосфатази у тромбоцитах.



Ю. Заржецький і співроб. продемонстрували позитивний вплив сукцинату **в реанімаційний період після стану клінічної смерті**, яку спричиняли 10-хвилинним перетисканням внутрішньоторакального судинного пучка серця у щурів. Використання сукцинату натрію (20 мг/кг) на 3–7 добу постреанімаційного періоду (але не раніше) знижувало рівень вільнорадикальних процесів у мозку та сироватці крові, послаблювало деструкцію мембранних елементів нейронів, сприяло більш повному відновленню функцій і структури мозку (зокрема, мозочка), запобігало появі факторів ризику розвитку атерогенезу (такі як збільшення вмісту холестерину, триацилгліцеролів і ліпопротеїдів крові) у віддаленому постреанімаційному періоді (А. Мутускін та ін.). Використання сукцинату натрію за гострого періоду експериментальної важкої черепно-мозкової травми у собак запобігало виснаженню катехоламінової та серотонінергійної систем у мозку і сприяло нормалізації реологічних властивостей крові (Л. Усенко, Е. Клігуненко).

О. Рачков і М. Рачкова звертають увагу на “піруватогенну” дію сукцинату натрію (100 мг/кг маси, 7 днів, у т.ч. і в комбінації з папаверином) у серці та стінці аорти **за різних видів гіпертонії** завдяки посиленому утворенню фосфенолпірувату в швидкому циклі карбонових кислот. Збільшення вмісту пірувату є характерним ефектом сукцинату натрію у разі метаболічного ацидозу. За цих умов сукцинат відновлював рівень внутрішньоклітинного і тканинного Na^+ , підвищував вміст K^+ , Ca^{2+} і Mg^{2+} у тканині серця. Фізіологічну активність низьких

концентрацій сукцинату ($0,5\text{--}1\text{ мг/кг}$ маси тіла) й α -кетоглутарату **за різних форм серцевої патології** (міокардит, тахікардія, атеросклероз, мігрень та ін.) досліджували І. Саакян та Г. Саакян. Автори наголошують на можливості потенціювання сукцинатом терапевтичної дії засобів традиційної терапії (сердечні глікозиди, діуретики та ін.), що, у свою чергу, робить можливим зниження дози вживання специфічних препаратів і зниження їхньої токсичної побічної дії. Сукцинат викликав дозозалежне посилення скорочення ізольованого м'яза передсердя у молодих щурів, причому в нижчих (10^{-7} М) концентраціях, ніж адреналін (10^{-6} М) чи строфантин К (10^{-5} М). Введення сукцинату в проточний розчин Тіроде вдвоє скорочувало час відновлення роботи м'яза передсердя після перенесеної ішемії. Ішемічна резистентність серцевого м'яза після введення сукцинату підвищувалася на 14-ту добу експерименту (М. Спірідонов та ін.).

Унікальні дані були отримані Є. Козиревою у співавторстві з московськими лікарями під час **лікування раку**. Виходячи з теорії Варбурга про “мітохондріальні передумови” ракового переродження клітин, лікарям-онкологам було запропоновано додаткову терапію сумішшю сукцинату, цитрату й α -кетоглутарату разом із деякими вітамінами і травами. Через п'ять років лікування смертність хворих із карциномою ший-

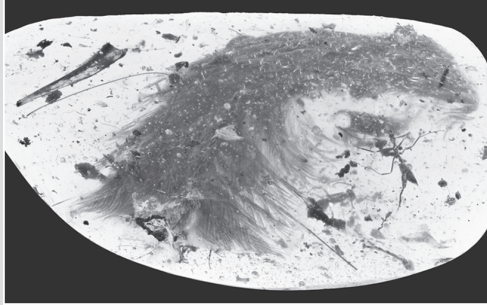


ки матки та раком прямої кишки зменшувалась у вісім разів, з раком яєчників – у три рази, молочної залози – у шість разів. З 15 хворих на міому матки ніхто не помер, тоді як у контрольній групі померло 50 % хворих.

Радіопротекторні властивості сукцинату описані за внутрішньочеревинної ін'єкції сукцинату натрію (200 мг/кг маси). Введення сукцинату за 30 хв до опромінення в сублетальній дозі 8 Гр збільшувало виживання щурів, за даними О. Косенко і Ю. Камінського, на 40–70 %. Автори пояснюють отримані результати зниженням до норми співвідношення кетонових тіл (ацетоацетат/3-D-гідроксибутират), а відповідно і відношення НАД⁺/НАДН у мітохондріях печінки опромінених тварин.

Оригінальний спосіб **зниження рівня глюкози у разі цукрового діабету** запропонований О. Косенко і співроб. Одночасна з гіперглікемією гіперліпідемія наштотхнула авторів на думку, що рівень глюкози у крові, її транспорт у клітини й утилізація у периферичних тканинах може бути нормалізована зниженням концентрації кетонових тіл. Сукцинат натрію успішно “робив” це у печінці молодих щурів. За алоксанового діабету ін'єкція сукцинату натрію (50 мг/кг маси) вже через 30 хв приводила до зниження вмісту 3-D-гідроксибутирату й ацетоацетату, а, найважливіше, концентрація глюкози у крові зменшувалася з 30,0 до 16,4 мМ. Правда, конкретного механізму цього феномена автори не встановили, а пов'язали його із загальною інтенсифікацією енергетичного обміну та синтезом більшої кількості АТФ.

Бурштин може бути не тільки джерелом енергетичного субстрату – сукцинату, але й консерватором доісторичних істот. Як повідомив журнал *Current Biology* [Xing et al., 2016], на ринку в М'янмі продавали хвіст динозавра у бурштині. Цій знахідці не менше 99 мільйонів років.



Шматочок бурштину мав діаметр приблизно 3,6 см. Швидше за все, динозавр загруз хвостом у смолі та загинув. Виявлений фрагмент складається із восьми хребців, а повна довжина хвоста була щонайменше втричі більшою. Очевидно, хвіст належав мініатюрному пернатому динозавру з підряду тероподів – двоногих хижаків. Він був розміром з горобця, проте літати не міг. Хімічним аналізом доведено, що м'які тканини навколо кісток містять сліди двовалентного феруму. Науковці вважають, що це плями крові, а ферум має гемове походження. Місцями пір'я на хвості динозавра, який нагадував мишачий, навіть зберегло свій первісний колір. До тероподів належить і тиранозавр – один із найбільших хижаків у історії планети, довжина скелета якого могла сягати 12 метрів, а маса – майже семи тонн.

Підсумок 13. “БУРШТИНОВА” ЕНЕРГЕТИКА

- Утворення сукцинату зі сукциніл-КоА на п'ятому етапі циклу Кребса відбувається у три стадії, на кінцевій із яких у результаті субстратного фосфорилування синтезується ГТФ.
- Сукцинатдегідрогеназа – це флавопротеїновий ферментний комплекс внутрішньої мембрани мітохондрій тварин. Це єдиний фермент, який бере участь і в циклі Кребса, і у дихальному ланцюгу мітохондрій.
- На шостому етапі циклу Кребса сукцинатдегідрогеназа каталізує окислення сукцинату до фумарату з відновленням убіхінону до убіхінолу. У цій реакції два атоми гідрогену спочатку переносяться зі сукцинату на простетичну групу сукцинатдегідрогенази ФАД і далі – на убіхінон.
- Сукцинатдегідрогеназа складається з двох гідрофільних і двох гідрофобних субодиниць: SdhA, SdhB, SdhC і SdhD. Потік електронів зі сукцинату до кінцевого акцептора електронів – O_2 спряжений зі синтезом 1,5 молекули АТФ на кожен пару електронів.

- Активация дихання у тканинах під час функціональних навантажень чи за певних патологічних умов може бути зумовлена посиленням окислення сукцинату, тоді як окислення НАД-залежних субстратів істотно не підвищується. Отже, створюються умови для перебігу іншого, коротшого і швидшого циклу, ніж повний Кребса.
- Рівень енергетичного обміну організму можна оцінювати за активністю дегідрогеназ мітохондрій у лімфоцитах. Високі показники сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах у більшості випадків корелюють зі збільшенням вмісту цих клітин у крові за активації імунної системи.
- Унікальні терапевтичні властивості сукцинату і можливість множинної модуляції сукцинатдегідрогенази дають змогу широко використовувати його у медицині, харчовій промисловості й сільському господарстві.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Запасання енергії у циклі Кребса.** У реакції, яку каталізує сукциніл-КоА-синтаза, утворюється високоенергетична сполука ГТФ. Яким чином вільна енергія, що міститься у ГТФ, переходить до клітинного пулу АТФ?
- Компартменталізація ферментів циклу Кребса.** Ізоцитратдегідрогеназа є тільки у матриксі мітохондрій, а малатдегідрогеназа – і в цитозолі, і в мітохондріях. Яку роль відіграє цитозольна малатдегідрогеназа?
- Скільки протонів виводиться у міжмембранний простір мітохондрій за перенесення пари електронів дихальним ланцюгом від НАДН і сукцинату відповідно?**
 - 1) 10 і 6;
 - 2) 3 і 2;
 - 3) 38 і 30;
 - 4) 2,5 і 1,5.
- Для окисно-відновної пари фумарат/сукцинат стандартний відновний потенціал (ΔE^0) становить +0,031 В, а для пари O_2/H_2O – +0,816 В. Розрахувати зміну стандартної вільної енергії за перенесення пари електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій від сукцинату до O_2 за формулою $\Delta G^0 = -nF \times \Delta E^0$.**
 - 1) -160 кДж/моль;
 - 2) 160 кДж/моль;
 - 3) -210 В;
 - 4) 96,5 кДж/В × моль.
- У якій реакції циклу Кребса в результаті субстратного фосфорилування утворюється ГТФ?**
 - 1) перетворення сукциніл-КоА на сукцинат;
 - 2) у реакції, що каталізується сукциніл-КоА-синтазою;
 - 3) перетворення фосфоенолпірувату на піруват;
 - 4) перетворення сукцинату на фумарат.

6. **Сукцинат, утворений зі сукциніл-КоА, окислюється до фумарату:**
 - 1) флавопротеїновою сукцинатдегідрогеназою;
 - 2) НАДН-залежною піруватдегідрогеназою;
 - 3) сукциніл-КоА-синтазою;
 - 4) фумаразою.
7. **Транспорт однієї пари електронів від сукцинату до O_2 спряжений зі синтезом:**
 - 1) 1,5 молекули АТФ;
 - 2) 3 молекул АТФ;
 - 3) 1 молекули АТФ;
 - 4) 32 молекул АТФ.
8. **Який фермент дихального ланцюга мітохондрій складається з чотирьох субодиниць (двох гідрофільних і двох гідрофобних) та містить убіхінонзв'язувальний сайт?**
 - 1) сукцинатдегідрогеназа;
 - 2) піруватдегідрогеназа;
 - 3) фумараза;
 - 4) убіхіназа.
9. **Яка субодиниця сукцинатдегідрогенази має кофактор ФАД і сукцинатзв'язувальний сайт?**
 - 1) SdhA;
 - 2) SdhB;
 - 3) SdhC;
 - 4) SdhD.
10. **Виберіть інгібітори сукцинатдегідрогенази, що блокують приєднання сукцинату:**
 - 1) малонат;
 - 2) оксалоацетат;
 - 3) карбоксин;
 - 4) теноїлтрифлюороацетон.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Бабский А.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий // Фізіол. журн. – 1985. – Т. 31, № 3. – С. 301–309.
- Доліба М. Холінергічна регуляція енергетичного обміну в міокарді і травних залозах: дис. ... д-ра біол. наук. – 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Львів, 1993. – 253 с.
- Кондрашова М.Н. Двигатель живого. В кн.: Биология. Проблемы биоэнергетики. – Москва: Знание, 1985. – С.17–38.
- Кондрашова М.Н. Структурно-кинетическая организация цикла трикарбоновых кислот при активном функционировании ткани // Биофизика. – 1989. – Т. 34, № 3. – С. 450–458.
- Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 3. – С. 388–406.
- Любарев А.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Молекуляр. биология. – 1987. – Т. 21, № 5. – С. 1286–1296.

- Нарциссов Р.П.* Применение *n*-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1969. – Т. LVI, № 5. – С. 85–91.
- Петричук С.В., Шищенко В.М., Духова З.Н.* и др. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии. – Москва, 2005. – 74 с.
- Маевский Е.И., Гришина Е.В., Розенфельд А.С.* и др. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления: возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию // Биомед. журн. – 2000. – Т. 1. – С. 32–36.
- Хундерякова Н.В.* Разработка метода определения активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов как показателя адренергической регуляции в организме: дис. ... канд. биол. наук. – 03.00.02 – биофизика. – Пущино, 2008. – 121 с.
- Шостаковська І.В., Кургалюк Н.М., Бергтраум Д.І., Доліба М.М.* Ефект парантерального введення α -кетоглутарату на резистентність до іонізуючої радіації та холінергічну систему щурів // Фізіол. журн. – 1999. – Т. 45. – С. 119–126.
- Янтарная (сукцинат) кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве / под ред. М.Н. Кондрашовой. – Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1996. – 300 с.
- Beeckmans S., Kanarek L.* Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate-malate shuttle. A study involving fumarase, malate dehydrogenase, citrate synthesis and aspartate aminotransferase // Eur. J. Biochem. – 1981. – Vol. 117, N 3. – P. 527–535.
- Bobyleva-Guarriero V., Battelli D., Bellei M., Lardy H.A.* Sources of intramitochondrial malate // FASEB J. – 1989. – Vol. 3, N 10. – P. 2208–2211.
- Fahien L.A., Kmiotek E.H., MacDonald M.J.* et al. Regulation of malate dehydrogenase activity by glutamate, citrate, α -ketoglutarate, and multienzyme interaction // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263, N 22. – P. 10687–10697.
- Kondrashova M.N., Maevsky E.I., Grigorenko E.V.* et al. The interaction of Krebs cycle with sympathetic and parasympathetic nervous system. Substrate – hormonal system // International Conference on Mitochondria, from Molecular Insight to Physiology and Pathology. 40 Years of Bari Meetings. – Bari, Italy. – 2005. – P. 74.
- Kondrashova M., Volkova S., Kuznetsova E.* et al. Succinic acid as a physiological signal molecule. In: Signal Molecules and Behavior, Eds. W. Winlow et al. – Manchester: University Press, 1991. – P. 294–301.
- Leverve X.M., Verhoeven A.J., Groen A.K.* et al. The malate/aspartate shuttle and pyruvate kinase as targets involved in the stimulation of gluconeogenesis by phenylephrine // Eur. J. Biochem. – 1986. – Vol. 155, N 3. – P. 551–556.
- Parlo R.A., Coleman P.S.* Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259, N 16. – P. 9997–10003.
- Stromski M.E., Arias-Mendoza F., Alger J.R., Shulman R.G.* Hepatic gluconeogenesis from alanine: ^{13}C nuclear magnetic resonance methodology for *in vivo* studies // Magn. Reson. Med. – 1986. – Vol. 3, N 1. – P. 24–32.
- Xing L., McKellar R.C., Xu X.* et al. A feathered dinosaur tail with primitive plumage trapped in mid-cretaceous amber // Current Biology. – 2016. – Vol. 26, N 24. – P. 3352–3360.

ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ

- Активний і пасивний транспорт речовин крізь біологічні мембрани
- Загальна характеристика транспортувальних систем у мітохондріях
- Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій

Важливою функцією мітохондріальних мембран є підтримання фізіологічних концентрацій метаболітів та іонів у клітині. Цю функцію забезпечують численні транспортувальні системи зовнішньої та внутрішньої мембран. Зовнішня мембрана містить пороутворювальні білки, які роблять її проникною для низькомолекулярних сполук. Пошкодження зовнішньої мембрани зумовлює витікання білків міжмембранного простору в цитоплазму, що спричиняє смерть клітини.

Внутрішня мембрана мітохондрій відмежовує вміст мітохондрій – матрикс від міжмембранного простору. Вона проникна для кисню, вуглекислого газу, води, аміаку, пірувату, ацетату, інших монокарбонових кислот, транспорт яких здійснюється дифузійно. Водночас внутрішня мембрана практично непроникна для катіонів K^+ , Na^+ , H^+ , аніонів Cl^- , Br^- , коферментів НАД, НАДФ, більшості амінокислот. Тому транспорт майже всіх іонів і молекул потребує специфічних транспортерів. Непроникність внутрішньої мембрани підсилюється наявністю специфічного фосфоліпіду – кардіоліпіну. Все це створює передумови для виникнення крізь внутрішню мембрану мітохондрій електрохімічного потенціалу H^+ .

14.1. АКТИВНИЙ І ПАСИВНИЙ ТРАНСПОРТ РЕЧОВИН КРІЗЬ БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ

Транспортування речовин крізь будь-яку біологічну мембрану може бути пасивним і активним (рис. 14.1).

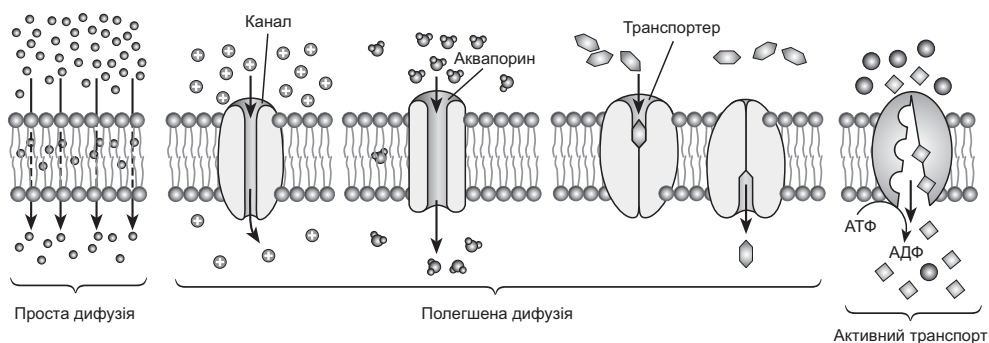


Рис. 14.1. Механізми транспортування речовин крізь біологічні мембрани

Пасивний транспорт – це переміщення речовин способом дифузії за їхнім електрохімічним (а коли транспортуються незаряджені молекули, концентраційним) градієнтом, без затрат сторонньої енергії. Активний транспорт – це перенесення речовин проти електрохімічного градієнта з використанням енергії АТФ.

Дифузія може бути простою та полегшеною (рис. 14.1). Проста дифузія – це рух гідрофобних (ліпофільних) речовин крізь ліпідний бішар мембрани. Швидкість простої дифузії залежить від товщини мембрани і від розчинності речовини у ліпідах. Полегшена дифузія може здійснюватися неселективними чи селективними іонними каналами або специфічними мембранними транспортерами.

Активний транспорт може бути первинним або вторинним. Якщо для переміщення речовин крізь мембрану безпосередньо використовується енергія АТФ, то це первинно-активний транспорт.

Вторинно-активний транспорт – це перенесення крізь мембрану речовини проти її електрохімічного (або концентраційного) градієнта завдяки енергії електрохімічного градієнта іншої речовини, який, у свою чергу, виникає у процесі первинно-активного транспорту. Одна речовина транспортується за своїм електрохімічним градієнтом, а інша – проти свого градієнта.

Є три основних типи транспортерів:

- 1) уніпорт – транспортування однієї речовини за її електрохімічним (концентраційним) градієнтом;
- 2) симпорт – транспортування двох і більше речовин одним переносником в одному напрямку;
- 3) антипорт – переміщення різних речовин одним переносником у протилежних напрямках.

Переміщення іонів і молекул крізь мітохондріальні мембрани здійснюється або за електрохімічним чи концентраційним градієнтом (пасивний транспорт), або проти електрохімічного градієнта з використанням енергії АТФ (активний транспорт).

14.2. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ У МІТОХОНДРІЯХ

Зовнішня мембрана містить велику кількість інтегральних білків – поринів, які формують широкі канали і забезпечують проникнення крізь мембрану речовин із молекулярною масою до 5 кДа. Основним класом поринів зовнішньої мембрани мітохондрій є т. зв. потенціалзалежні аніонні канали (voltage-dependent anion channels, VDAC), що забезпечують транспорт АТФ, АДФ, НАДН, пірувату, малату і багатьох інших метаболітів та іонів (рис. 14.2). Окремо можна виділити канали для транспортування води – аквапорини (див. рис. 14.1).

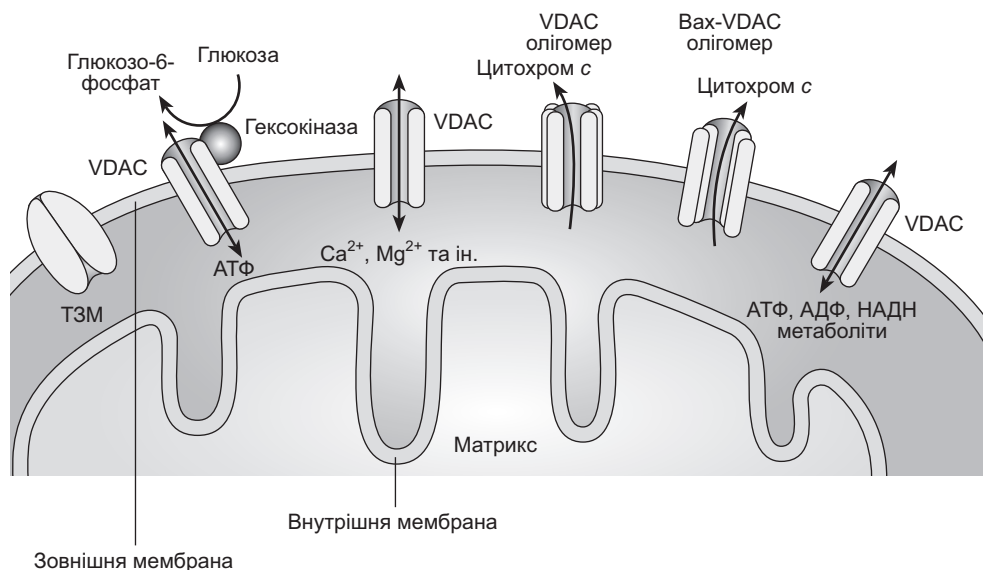


Рис. 14.2. Основні транспортні системи зовнішньої мембрани мітохондрій

Білкові молекули, які мають розміри, більші ніж 5 кДа, можуть проникати у міжмембранний простір мітохондрій після взаємодії їхніх сигнальних послідовностей, розміщених на N-кінці, з транслоказою зовнішньої мембрани (ТЗМ).

Транспортування речовин крізь внутрішню мембрану мітохондрій потребує різноманітних транспортних систем. До найважливіших речовин, які

потребують мітохондрії для виконання своєї основної функції – синтезу АТФ, необхідними є субстрати окиснення, відновні еквіваленти, неорганічний фосфат, АДФ і кисень.

Проникність зовнішньої мембрани мітохондрій для субстратів окиснення і фосфорилування, відновних еквівалентів (у вигляді НАДН і НАДФН), неорганічних іонів, води й інших речовин зумовлена наявністю у ній порутовувальних каналів і транслоказ.

Транспортування субстратів окиснення та карбонових кислот. Монокарбонові жирні кислоти – β -оксипутират, ацетоацетат і ацетат вільно дифундують крізь внутрішню мембрану мітохондрій завдяки хорошій розчинності в ліпідах.

За перенесення довголанцюгових жирних кислот відповідає спеціальна карнітинова транспортна система. Активовані жирні кислоти у формі ацил-КоА стають транспортабельними з цитоплазми у матрикс мітохондрій після взаємодії з карнітином і утворенням ацилкарнітину. Ацилкарнітин транспортується карнітиновим переносником, обмінюючись на вільний карнітин. У матриксі ацильні залишки знову зв'язуються з КоА (див. розділ 7).

Транспортування аніонів ди- і трикарбонових кислот тісно пов'язане з транспортуванням неорганічного фосфату. Неорганічний фосфат (у формі іонів H_2PO_4^-) надходить у матрикс мітохондрій через симпорт з H^+ за механізмом вторинно-активного транспорту (транслоказою), генеруючи електрохімічний градієнт H_2PO_4^- (рис. 14.3). Енергію цього електрохімічного градієнта використовують транспортери ди- і трикарбонових кислот для транспорту у матрикс мітохондрій сукцинату, фумарату й малату. За інших умов (наприклад, коли у матриксі надмірно утворюється сукцинат чи малат) цей антипортер може функціонувати у зворотному режимі (рис. 14.4).

Транспортування цитрату, ізоцитрату і *цис*-аконітату системою транспорту трикарбонових кислот відбувається в обмін на перенесення малату у зворотному напрямку. Важливо, що перенесення цитрату крізь мітохондріальну мембрану залежить не тільки від транспорту малату, але й від транспорту неорганічного фосфату. α -Кетоглутарат також надходить у мітохондрії в обмін на малат (рис. 14.4). Піруватдегідрогеназний комплекс здійснює одночасне перенесення крізь внутрішню мембрану мітохондрій пірувату і протонів, тобто переносник пірувату функціонує за принципом симпорту, з використанням градієнта протонів (рис. 14.3).

Транспортування відновних еквівалентів. НАДН і ФАДН₂ є донорами високоенергетичних електронів, що далі транспортуються дихальним ланцюгом мітохондрій і використовуються у процесів окисного фосфорилування. Незалежно від того, де утворюються ці сполуки (у матриксі мітохондрій чи у цитоплазмі), протони надходять у дихальний ланцюг з матриксу. Значні кількості НАДН, що утворюються у цитоплазмі в процесі гліколізу, також є джерелом відновних еквівалентів для дихального ланцюга мітохондрій. Але у цьому разі

транспортування протонів, донором яких є НАДН чи ФАДН₂, здійснюється за участю гліцерофосфатного й малат-аспартатаного човникового механізмів (див. розділи 10, 11).

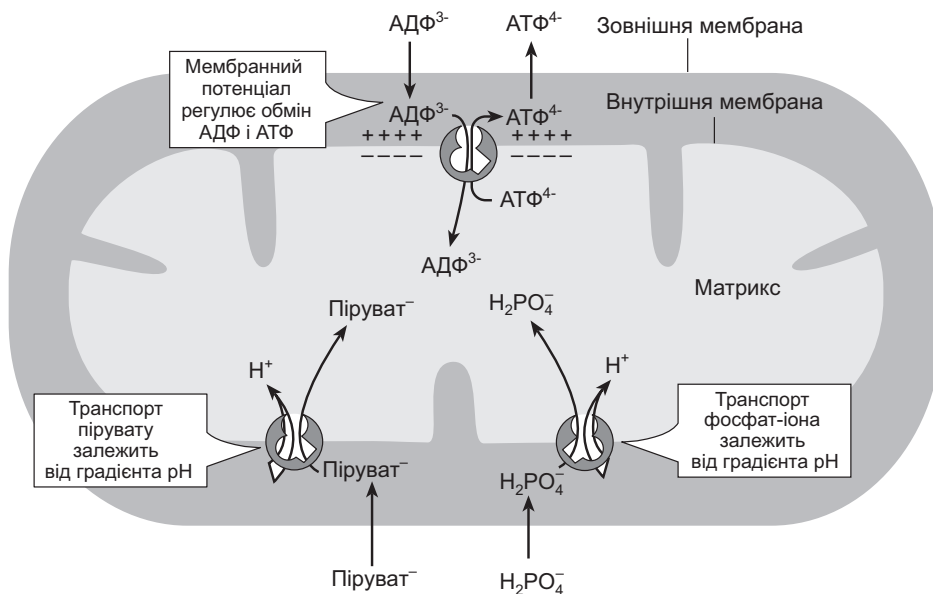


Рис. 14.3. Залежність транспортування АДФ, фосфат-іона і пірувату крізь внутрішню мембрану мітохондрій від електрохімічного градієнта протонів

Транспортування АДФ. Синтез АТФ неможливий за відсутності АДФ. Транспорт АДФ у мітохондрії здійснюється за участю специфічного транспортного білка – аденіннуклеотидтранслокази (див. розділ 11) в обмін на АТФ, яка виводиться у цитоплазму. Процес обміну АТФ на АДФ є електрогенним і частково забезпечується електричною компонентою ($\Delta\psi$) електрохімічного градієнта протонів (рис. 14.4).

Системи транспортування катіонів калію. Негативне значення і значна величина мембранного потенціалу мітохондрій (заряд внутрішньої поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій становить приблизно -180 мВ) сприяє надходженню катіонів у їхній матрикс. Незважаючи на те, що внутрішня мембрана мітохондрій є майже непроникною для них, незначна частина катіонів все ж таки дифундує у матрикс. Зокрема, катіони K^+ , яких є найбільше у цитоплазмі, повільно, але безперервно надходять за електрохімічним градієнтом у матрикс мітохондрій крізь K^+ -канали витоку. Для того, щоб компенсувати цей вхід катіонів K^+ та запобігти порушенню осмотичної цілісності мітохондрій, у їхній внутрішній мембрані наявний K^+/H^+ -антипортер. Цей антипортер використовує енергію протонного градієнта і видаляє K^+ з матриксу в міжмембранний простір (рис. 14.5). Отже, специфічними системами транспорту катіонів K^+ у внутрішній мембрані мітохондрій є K^+ -канали витоку та K^+/H^+ -антипортер, які й формують калієвий цикл.

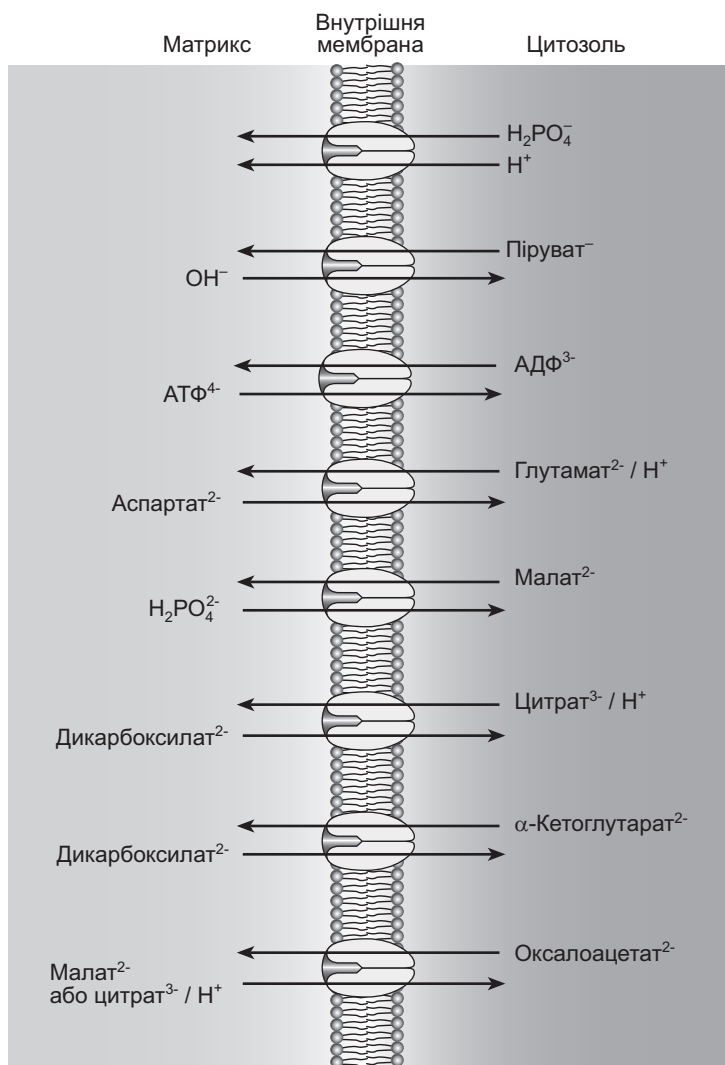
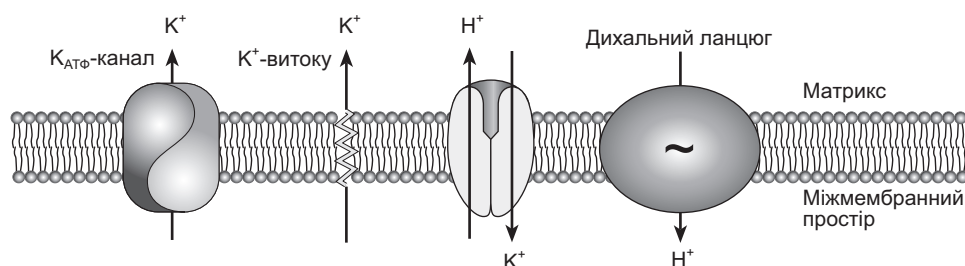


Рис. 14.4. Транспортування ди- і трикарбонових кислот та інших метаболітів крізь внутрішню мембрану мітохондрій

У внутрішній мембрані мітохондрій є також АТФ-чутливі K^+ -канали ($K_{\text{АТФ}}$ -канали). За нормальних умов вони заінгібовані внутрішньоклітинною АТФ і відкриваються у разі енергетичного дефіциту в клітині. У закритому стані $K_{\text{АТФ}}$ -канали запобігають неконтрольованому набряканню мітохондрій. Відкриття АТФ-чутливого K^+ -каналу короточасно зсуває баланс між K^+ -каналами витоку та K^+/H^+ -антипортером – до тих пір, поки швидкість виходу не дорівнюватиме швидкості входу. У мітохондріях серця відкриття $K_{\text{АТФ}}$ -каналів унаслідок зниження електрохімічного потенціалу запобігає перевантаженню мітохондрій катіонами Ca^{2+} внаслідок порушення функціонування Ca^{2+} -уніпортера.

Рис. 14.5. Системи транспортування іонів K^+ у мітохондріях

У внутрішній мембрані мітохондрій, крім дихального ланцюга, що генерує трансмембранний протонний градієнт, функціонують транспортні системи, які підтримують фізіологічні концентрації іонів (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} та інші) й метаболітів (енергетичні субстрати, нуклеотиди та інші).

14.3. Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ

Крім синтезу АТФ, мітохондрії також відіграють важливу роль у Ca^{2+} -сигналізації, оскільки вони є внутрішньоклітинним депо Ca^{2+} , забезпечують зниження Ca^{2+} у цитозолі, а також здатні змінювати характер Ca^{2+} -сигналу та його поширення у клітині. Також мітохондрії слугують для енергетичного забезпечення Ca^{2+} -помп (Ca^{2+} -АТФ-аз) плазматичної та внутрішньоклітинних мембран, спрямованого на зниження концентрації катіонів Ca^{2+} у цитозолі.

Перш ніж потрапити до матриксу мітохондрій, катіони Ca^{2+} мають пройти крізь їхню зовнішню мембрану. Їхнє надходження у міжмембранний простір мітохондрій відбувається потенціалзалежними аніонними каналами (VDAC), які теж можуть регулювати надходження Ca^{2+} у матрикс. Однак вагоміший внесок у регуляцію рівня Ca^{2+} в матриксі мітохондрій вносять структури, розташовані у внутрішній мембрані (рис. 14.6). Їх можна розподілити на такі, що забезпечують надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, і такі, що забезпечують його вивільнення у цитозоль.

Характерною особливістю транспортування Ca^{2+} крізь внутрішню мембрану мітохондрій є значно менша швидкість вивільнення Ca^{2+} , ніж швидкість його надходження. Системи вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій, на відміну від таких систем у інших депо Ca^{2+} , не генерують фізіологічних Ca^{2+} -сигналів [Манько, 2011].

Особливістю депонування Ca^{2+} в матриксі мітохондрій є те, що майже 99 % їхнього Ca^{2+} перебуває у зв'язаному стані. Лише 1 % акумульованого Ca^{2+} є в іонізованому, тобто вільному стані.

Системи надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій. До основних систем, що забезпечують надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, належить Ca^{2+} -уніпортер (MCU), система швидкого поглинання Ca^{2+} (Rapid Mode of Ca^{2+} uptake,

RaM) та мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали (mRyR) (рис. 14.6). Крім того, є припущення, що і мітохондріальна пора транзйентної проникності може функціонувати за певних умов як система надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій. За деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій нагромадження катіонів Ca^{2+} у матриксі може відбуватися також і за участю $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера.

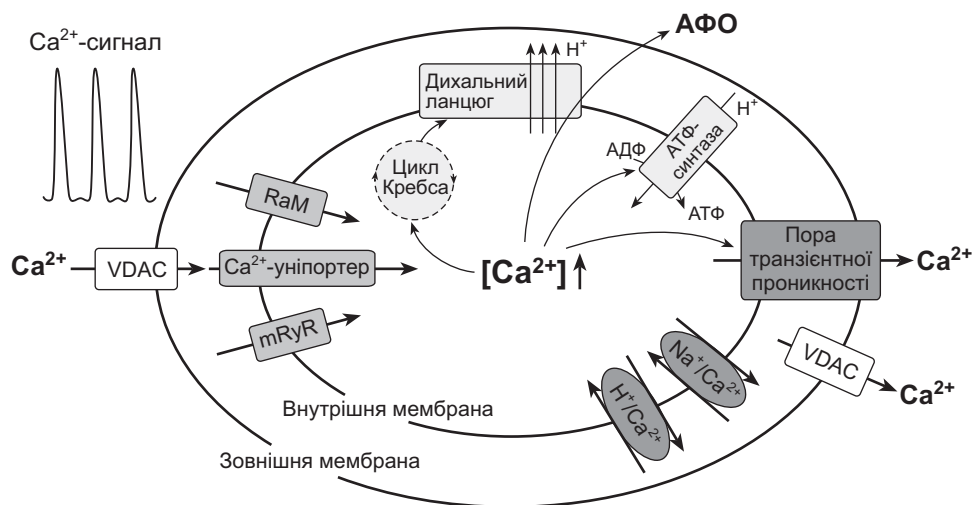


Рис. 14.6. Основні Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій

Найбільш дослідженою системою транспортування Ca^{2+} всередину мітохондрій є **Ca^{2+} -уніпортер**, рушійною силою якого слугує електрохімічний градієнт Ca^{2+} крізь внутрішню мембрану (рис. 14.7). Ця транспортувальна система характеризується низькою спорідненістю до Ca^{2+} ($K_{0.5}$ 1–25 мкМ). Активність уніпортера залежить від концентрації цитозольного Ca^{2+} : підвищення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі може активувати або інгібувати акумуляцію катіонів у мітохондріях, і це залежить від тривалості періоду підвищення концентрації.

Рутенієвий червоний, гексавалентний полікатіонний барвник, неконкурентно інгібує Ca^{2+} -уніпортер із константою інгібування (K_i) 30 нМ. Для повного блокування акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях його використовують у концентраціях 1–10 мкМ. Рутенієвий червоний є високоафінним, але низько селективним до Ca^{2+} -уніпортера. Він також інгібує і системи швидкого поглинання Ca^{2+} , мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, Ca^{2+} -керовані канали вивільнення Ca^{2+} зі саркоплазматичного ретикулу, Na^+ -залежне виведення Ca^{2+} з мітохондрій і зв'язується з поліфосфоінозидами.

На ізольованих мітохондріях серця та печінки описана система **швидкого поглинання Ca^{2+}** , рушійною силою якої теж є електрохімічний градієнт Ca^{2+} . Вона функціонує транзйентно протягом початкової фази збільшення позамітохондріальної концентрації цього катіона. Надходження катіонів Ca^{2+} у матрикс мітохондрій за участю системи швидкого поглинання Ca^{2+} відбувається щонайменше у 300 разів швидше, ніж завдяки Ca^{2+} -уніпортерів (рис. 14.8).

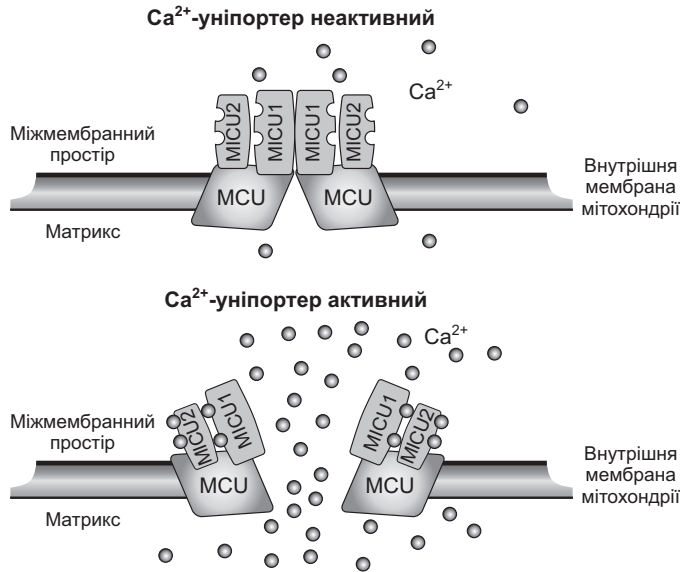


Рис. 14.7. Ca^{2+} -уніпортер внутрішньої мембрани мітохондрій: MICU1 і MICU2 – регуляторні Ca^{2+} -чутливі субодиниці

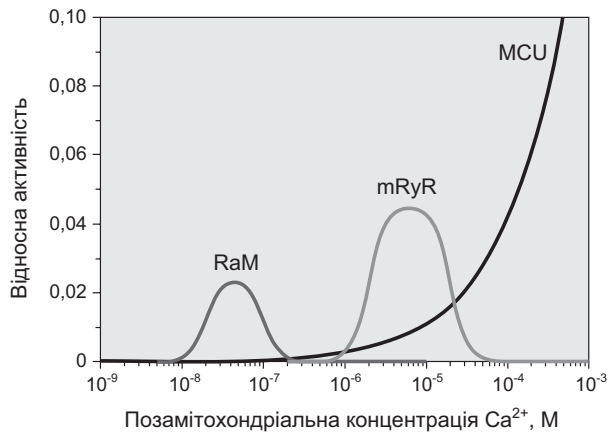


Рис. 14.8. Залежність відносної активності систем надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій від позамітохондріальної концентрації Ca^{2+}

Система швидкого поглинання Ca^{2+} інактивується завдяки зв'язуванню Ca^{2+} зі сайтами на зовнішній поверхні мембрани. Цю систему транспортування Ca^{2+} теж блокує рутенієвий червоний, а активує АТФ (у мілімолярних концентраціях). Однак її молекулярну природу не встановлено, а сам факт її наявності є суперечливим. Деякі вчені вважають, що швидке поглинання забезпечує саме Ca^{2+} -уніпортер, але в іншій конформації.

Ще однією системою надходження Ca^{2+} в мітохондрії є **мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали**. Вони названі так, оскільки рослинний алкалоїд ріанодин, виділений із кори *Ryania speciosa*, специфічно впливає на ці канали. Мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали ідентифіковані спочатку в кардіоміоцитах і нейронах [Beutner et al., 2001; Jakob et al., 2014], а згодом

у гепатоцитах [Купиняк зі співавт., 2017]. З'ясувалося, що вони подібні до типу 1 ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів саркоплазматичного ретикулулу за біохімічними, фармакологічними та функціональними властивостями і залучені в акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями.

Для мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів характерна дзвоноподібна залежність від концентрації іонів Ca^{2+} (рис. 14.8). Зважаючи на те, що мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали мають вищу провідність Ca^{2+} за його фізіологічних концентрацій, ніж Ca^{2+} -уніпортер, вони відповідають, ймовірно, за поглинання Ca^{2+} з мікродоменів у ділянці МАМ (див. розділ 3).

Системи вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій. Концентрація іонізованого Ca^{2+} у мітохондріях залежить від концентрації фосфату й аденінових нуклеотидів, які утворюють комплекси з цими катіонами. Баланс між вільним і зв'язаним Ca^{2+} залежить також від рН матриксу: його закислення, індуковане дією протоніформів, перешкоджає утворенню Ca^{2+} -комплексів, що значно зменшує Ca^{2+} -буферну ємність мітохондрій і збільшує вихід Ca^{2+} з цих органел.

Протягом тривалого часу панувала думка, що вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій у цитозоль забезпечується двома типами механізмів: Na^{+} -залежними та Na^{+} -незалежними обмінниками Ca^{2+} . Проте зараз доведена можливість вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій Ca^{2+} -уніпортером (у деполяризованих мітохондріях) і мітохондріальною порою транзисентної проникності.

$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник — трансмембранний білок, що забезпечує виведення Ca^{2+} з клітини та з матриксу мітохондрій (рис. 14.9). Він є у плазматичній мембрані та внутрішній мембрані мітохондрій збудливих тканин (серце, скелетні м'язи, мозок). Na^{+} -залежне виведення Ca^{2+} з мітохондрій можливе, оскільки наявний електрохімічний градієнт Na^{+} крізь внутрішню мембрану. $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник виводить із матриксу мітохондрій один катіон Ca^{2+} в обмін на три катіони Na^{+} , тобто він є електрогенний. Вважають, що він транспортуватиме катіони Ca^{2+} з матриксу мітохондрій до тих пір, поки катіони Na^{+} , що надійшли у матрикс, повертатимуться в цитозоль $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -обмінником.

$\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -обмінник локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій і забезпечує електронейтральне виведення іонів Na^{+} з матриксу в цитозоль. Саме через $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -обмінник виведення іонів Ca^{2+} з мітохондрій спряжене з транспортуванням протонів під час дихання (рис. 14.9).

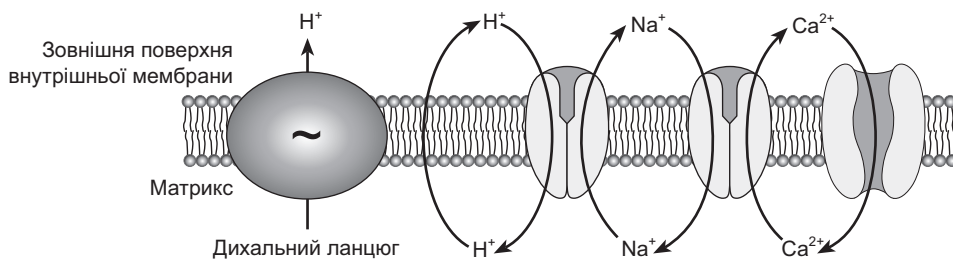


Рис. 14.9. Спряженість між процесами транспортування протонів, катіонів Na^{+} і Ca^{2+} крізь внутрішню мембрану мітохондрій

$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник властивий переважно електронезбудливим тканинам: печінки, нирок та інших вісцеральних органів. Він функціонує в електронейтральному режимі – виведення одного Ca^{2+} цією системою супроводжується входом у матрикс мітохондрій двох H^+ .

Ще одним механізмом вивільнення іонів Ca^{2+} з мітохондрій, який переважно розглядають як патологічний, – є **мітохондріальна пора транзйентної (неспецифічної) проникності**. Ця пора відкривається за дії низки стресових чинників (гіпоксія, ішемія), насамперед через перевантаження мітохондрій катіонами Ca^{2+} . Відкривання цієї пори зумовлює вихід із мітохондрій речовин із молекулярною масою до 1,5 кДа. Цей процес супроводжується вивільненням Ca^{2+} , зниженням мембранного потенціалу і набряканням мітохондрій, що врешті призводить до апоптозу чи некрозу. Питання про роль мітохондріальної пори у підтриманні фізіологічного стану мітохондрій на сьогодні залишається дискусійним, хоча деякі автори вважають, що за часткової активації цієї системи мітохондрії позбавляються надлишкової кількості Ca^{2+} .

На стан пори впливають концентрація Ca^{2+} в матриксі, значення рН, аденінові нуклеотиди, вільні радикали та величина мембранного потенціалу. Крім того, чинники, які впливають на формування Ca^{2+} -комплексів у матриксі, регулюють пороговий рівень Ca^{2+} для активації пори транзйентної проникності.

Природа цієї пори остаточно не з'ясована. Вважається, що такий канал є мультибілковим комплексом, до складу якого входять аденіннуклеотидтрансфераза, потенціалзалежний аніонний канал зовнішньої мембрани, циклофілін D, білок транслокатор (TSPO) і АТФ-синтаза.

Мітохондрії відіграють важливу роль у регулюванні Ca^{2+} -залежних процесів. Для надходження і виходу іонів Ca^{2+} з мітохондрій функціонують специфічні Ca^{2+} -транспортувальні системи. До систем, що забезпечують надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, належить Ca^{2+} -уніпортер, система швидкого поглинання Ca^{2+} та мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали. Вивільнення іонів Ca^{2+} відбувається за участю $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та пори транзйентної проникності.

Поглинання та вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій відіграє важливу роль у регулюванні фундаментальних функцій клітини, зокрема, енергетичного метаболізму. За фізіологічних умов підвищення концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі приводить до збільшення його поглинання мітохондріями, внаслідок чого активуються Ca^{2+} -залежні дегідрогенази і зростає продукція АТФ. Як мінімум три ферменти матриксу мітохондрій (піруват-, α -кетоглутарат-, ізоцитратдегідрогеназа) у різний спосіб активуються катіонами Ca^{2+} : піруватдегідрогеназа – завдяки Ca^{2+} -залежному дефосфорилуванню, а α -кетоглутарат та ізоцитратдегідрогеназа – внаслідок безпосереднього зв'язування Ca^{2+} з регуляторною субодиницею ферментів. Активування цих ферментів зумовлює зростання рівня НАДН і, як наслідок, посилення синтезу АТФ.

Тобто передача цитоплазматичного кальцієвого сигналу до мітохондрій дає змогу модулювати мітохондріальний метаболізм відповідно до енергетичних потреб клітини. Т. Калі зі співавт. [Cali et al., 2012] припускають, що катіони Ca^{2+} можуть активувати синтез АТФ також завдяки безпосередньому зв'язуванню з АТФ-синтазою.

Катіони Ca^{2+} можуть безпосередньо активувати транспортування метаболітів до матриксу мітохондрій. Зокрема, аспартат-глутамат- і $[\text{АТФ-Mg}]^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -переносники містять у своїй структурі Ca^{2+} -зв'язувальні ділянки, які мають високий ступінь гомологічності з відповідними ділянками кальмодуліну¹. Наслідком активації цих структур є збільшення ступеня поляризації мітохондріальної мембрани, що, у свою чергу, сприяє збільшенню надходження катіонів Ca^{2+} до матриксу. Зміна протонного потенціалу мітохондрій після поглинання іонів Ca^{2+} також буде впливати на процеси окисного фосфорилування і як наслідок – на продукцію АТФ. Крім того, Ca^{2+} стимулює розщеплення глікогену і/чи глюкози, що також приводить до збільшення рівня АТФ.

Як встановлено експериментальними дослідженнями, за одночасного додавання до суспензії мітохондрій катіонів Ca^{2+} , АДФ і Φ_{H} органели спочатку поглинають Ca^{2+} , а потім синтезують АТФ. Це додатково підкреслює важливу роль мітохондрій у регуляції рівня цитозольного Ca^{2+} .

Роль мітохондрій як Ca^{2+} -буфера залежить від їхнього розміщення в клітині й може бути різною у різні фази життя клітини. Оскільки активація поглинання мітохондріями Ca^{2+} є результатом тісного контакту між ними й ендоплазматичним ретикулулом (див. розділ 4), було запропоновано концепцію Ca^{2+} -мікродоменів. Ця концепція полягає у тому, що надходження Ca^{2+} ззовні чи вивільнення його з внутрішньоклітинних немітохондріальних депо створює у цитоплазмі мікродомени з високою концентрацією Ca^{2+} (>20 мкМ), яка є достатньою для активації низькоафінного Ca^{2+} -уніпортера сусідньої мітохондрії. Встановлено, що мітохондрії починають акумулювати Ca^{2+} вже за концентрації 100 нМ Ca^{2+} у цитозолі, незважаючи на те, що афінність Ca^{2+} -уніпортера становить 10 мкМ. Власне однією з функцій Ca^{2+} -мікродоменів є їхня роль у нагромадженні мітохондріями Ca^{2+} . Поглинання Ca^{2+} мітохондріями впливає на динаміку цитозольних Ca^{2+} -сигналів. Крім того, було виявлено, що дихання мітохондрій визначає активаційні/деактиваційні властивості депокерованого входу Ca^{2+} , що має важливе значення для повторного наповнення депо катіонами Ca^{2+} , витраченим під час стимуляції клітин агоністами.

Отже, мітохондрії, виконуючи роль Ca^{2+} -буфера, впливають на поширення Ca^{2+} -сигналу, модулюють активність Ca^{2+} -каналів і транспортерів плазматичної мембрани та прискорюють повернення Ca^{2+} до внутрішньоклітинних пулів.

¹ Цитозольний Ca^{2+} -зв'язувальний білок, задіяний у регуляції багатьох клітинних функцій. Має чотири сайти зв'язування Ca^{2+} . Після зв'язування четвертого катіона Ca^{2+} -кальмодуліновий комплекс запускає сигнальний механізм регуляції активності білків-мішеней, зокрема, мембранних каналів, кіназ чи фосфатаз

Підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} (цитозольні Ca^{2+} -спайки) веде до підвищення внутрішньомітохондріальної концентрації Ca^{2+} (мітохондріальні Ca^{2+} -спайки) і має важливе значення для стимуляції окисного фосфорилування у мітохондріях [Манько, 2011].

Тромбоцити мають незначну кількість мітохондрій, проте вони відіграють досить цікаву роль у цих клітинах. Згідно з останніми даними, мітохондрії не лише забезпечують тромбоцит АТФ, але й залучені у процес посилення його активації, внаслідок чого частина тромбоцитів переходить у суперактивований стан. У разі ушкодження стінки судини АДФ, тромбін, колаген і тромбоксан A_2 , взаємодіючи зі своїми рецепторами на плазматичній мембрані тромбоцита, активують фосфоліпазу C і спричиняють тим самим генерацію Ca^{2+} -сигналу. Зростання рівня Ca^{2+} в цитозолі тромбоцита зумовлює збільшення його поглинання мітохондріями. Коли концентрація Ca^{2+} в мітохондріях перевищує критичну межу, запускається процес індукованого мітохондріями некрозу тромбоцитів: відкривається мітохондріальна пора транзійтної проникності, у цитозоль виходять Ca^{2+} і активні форми кисню, цитоскелет клітини руйнується, а тромбоцит сильно збільшується в об'ємі та стає купеподібним (рис. 14.10). У такому суперактивованому тромбоциті внаслідок перегрупування ліпідних молекул мембрани на поверхню клітини транслюється фосфатидилсерин, що сприяє прилипанню факторів зсідання крові, а зсідання крові пришвидшується у 1000–10 000 разів.

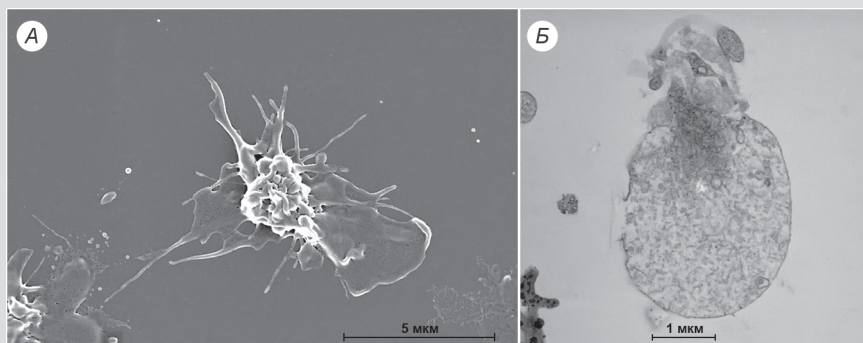


Рис. 14.10. Мікрофотографія активованого (А) та суперактивованого тромбоцита внаслідок запуску індукованого мітохондріями некрозу (Б)

Підсумок 14. ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ

- Важливою функцією мітохондріальних мембран є підтримання фізіологічних концентрацій метаболітів та іонів у клітині. Цю функцію забезпечують численні транспортувальні системи зовнішньої та внутрішньої мембран мітохондрій.

- Транспортування іонів і молекул крізь мітохондріальні мембрани здійснюється або за електрохімічним (чи концентраційним) градієнтом (пасивний транспорт), або проти градієнта з використанням енергії АТФ (активний транспорт).
- Зовнішня мембрана містить інтегральні білки – порини, які формують широкі канали і забезпечують проникнення крізь неї речовин із молекулярною масою до 5 кДа. Основним класом поринів зовнішньої мембрани мітохондрій є т. зв. потенціалзалежні аніонні канали (VDAC).
- Внутрішня мембрана мітохондрій проникна для кисню, вуглекислого газу, води, аміаку, пірувату, ацетату, інших монокарбонових кислот, транспорт яких здійснюється внаслідок простої або полегшеної дифузії.
- Внутрішня мембрана мітохондрій практично непроникна для катіонів K^+ , Na^+ , H^+ , аніонів Cl^- , Bg^- , коферментів НАД, НАДФ, більшості амінокислот.
- У внутрішній мембрані мітохондрій, крім дихального ланцюга мітохондрій, що генерує трансмембранний протонний градієнт, функціонують транспортні системи, які підтримують у матриксі фізіологічні концентрації іонів (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} та інші) та метаболітів (енергетичні субстрати, нуклеотиди та ін.)
- Мітохондрії відіграють важливу роль у регулюванні Ca^{2+} -залежних процесів. Для надходження і вивільнення катіонів Ca^{2+} з мітохондрій функціонують специфічні Ca^{2+} -транспортні системи. До систем, що забезпечують надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, належить Ca^{2+} -уніпортер, система швидкого поглинання Ca^{2+} та мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали. Вихід іонів Ca^{2+} відбувається за участю Na^+/Ca^{2+} -обмінника, H^+/Ca^{2+} -обмінника та пори транзієнтної проникності.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які транспортні системи залучені до обміну речовин між цитоплазмою та матриксом мітохондрій?
2. Рушійною силою транспорту яких речовин є протонний градієнт?
3. Яка будова та функція пори транзієнтної проникності мітохондрій?
4. Яка роль катіонів Ca^{2+} в генеруванні мембранного потенціалу мітохондрій?
5. Непроникність ліпідного матриксу внутрішньої мембрани мітохондрій для іонів зумовлена наявністю:
 - 1) термогеніну;
 - 2) кардіоліпіну;

- 3) діацилгліцеролу;
 - 4) карнітину.
- 6. Для підвищення спортивних результатів рекомендовано вживати препарат, який містить карнітин. Який процес активується цією сполукою?**
- 1) транспорт жирних кислот;
 - 2) транспорт амінокислот;
 - 3) транспорт іонів Ca^{2+} ;
 - 4) транспорт іонів K^+ .
- 7. Переміщення катіонів Ca^{2+} уніпортером мітохондрій здійснюється з використанням енергії:**
- 1) електрохімічного градієнта Ca^{2+} крізь внутрішню мембрану;
 - 2) електрохімічного градієнта Na^+ крізь внутрішню мембрану;
 - 3) концентраційного градієнта H^+ крізь внутрішню мембрану;
 - 4) АТФ.
- 8. У якій тканині відкривання $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів унаслідок зниження електрохімічного потенціалу запобігає перевантаженню мітохондрій катіонами Ca^{2+} ?**
- 1) печінки;
 - 2) серця;
 - 3) м'язів;
 - 4) нирок.
- 9. До основних систем, що забезпечують надходження катіонів Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, належать:**
- 1) Ca^{2+} -уніпортер, система швидкого поглинання Ca^{2+} , мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали;
 - 2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, пора транзієнтної проникності;
 - 3) Ca^{2+} -уніпортер, мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник;
 - 4) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, Ca^{2+} -уніпортер.
- 10. Вкажіть, які з наведених дегідрогеназ є Ca^{2+} -залежними:**
- 1) піруватдегідрогеназа;
 - 2) α -кетоглутаратдегідрогеназа;
 - 3) ізоцитратдегідрогеназа;
 - 4) малатдегідрогеназа.
- 11. Яка з Ca^{2+} -транспортних систем залучена в індукцію апоптозу?**
- 1) Ca^{2+} -уніпортер;
 - 2) $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник;
 - 3) пора транзієнтної проникності;
 - 4) мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали.
- 12. Яка транспортна система виведення Ca^{2+} з мітохондрій пов'язана з транспортом протонів під час дихання?**
- 1) Na^+/H^+ -обмінник;
 - 2) $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник;
 - 3) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник;
 - 4) Ca^{2+} -уніпортер.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Костерін С. О. Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів // Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86, № 6. – С. 18–30.
- Манько В.В. Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз. – Львів, 2011. – 271 с.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. – 4th edition. – New York: Garland Science, 2002. – 1392 p.
- Bazil J.N., Dash R.K. A Minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca^{2+} uptake mechanism // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 6. – P. 21324–21329.
- Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? // Front. Physiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 95–100.
- Calì T., Ottolini D., Brini M. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of mitochondrial activities // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – Vol. 942. – P. 53–73.
- Dolce V., Cappello A. R., Capobianco L. Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate-tricarboxylate carriers: from animals to plants // IUBMB Life. – 2014. – Vol. 66, N 7. – P. 462–471.
- Gutiérrez-Aguilar M., Baines C. P. Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carrier // Biochem. J. – 2013. – Vol. 454, N 3. – P. 371–386.
- McCommis K. S., Finck B. N. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions// Biochem. J. – 2015. – Vol. 466, N 3. – P. 443–454.
- Nury H., Dahout-Gonzalez C., Trézéguet V. et al. Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier // Annu. Rev. Biochem. – 2006. – Vol. 75. – P. 713–741.
- Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology // Mol. Asp. Med. – 2013. – Vol. 34, N 2–3. – P. 465–484.
- Pochini L. Scalise M., Galluccio M. et al. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health // Front. Chem. – 2014. – Vol. 2. – P.1–22.
- Szabadkai G., Duchen M. Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling // Physiology. – 2008. – Vol. 23, N 2. – P. 84–94.

ЕНЕРГЕТИКА РУХУ

- Енергетика скелетних м'язів
- Енергетичне забезпечення роботи серця
- Рух війок і джгутиків

Рух – це одна з типових властивостей живого. До основних типів руху належать амебоїдний, джгутиковий і м'язовий. Усі ці типи руху наявні у вищих тварин, але найбільші енергетичні затрати виникають під час скорочення м'язів. Згідно з морфофункціональною класифікацією, м'язи поділяють на поперечносмугасті (скелетні), серцеві та гладенькі. І хоча перші м'язові клітини з'являються вже у плоских червів, власне найбільш енергоефективними є поперечносмугасті м'язи членистоногих. Цьому сприяє високе співвідношення багаторазових скорочень на кожне нервово збудження. Частота помахів крил за секунду у бджоли становить 200–300, у хатньої мухи 330–345, а в комара – 600.

15.1. ЕНЕРГЕТИКА СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ

Скелетні м'язи працюють за принципом механо-хімічного двигуна, перетворюючи хімічну енергію на механічну. У 1954 р. Г'ю Гакслі й Емілін Джін Гансон сформулювали *гіпотезу ковзання*, згідно з якою тонкі протофібрили втягуються у проміжки між товстими і переміщуються у напрямку до центрів саркомерів (рис. 15.1). У межах одного саркомера тонкі протофібрили переміщуються назустріч одна одній, не зменшуючи своєї довжини, а видимі структурні зміни у процесі скорочення виявлено тільки за зменшенням довжини самого саркомера, зони Н і диска І [Клевець та ін., 2011].

Процес скорочення запускається потенціалом дії, який спричинений деполяризацією постсинаптичної мембрани сарколеми (плазматичної мембрани) внаслідок виділення ацетилхоліну зі синаптичних терміналей нервових закінчень. Варто зазначити, що і синтез ацетилхоліну, і його екзоцитоз у синаптичну щілину пов'язані з енергетичними процесами. Зокрема, ацетилхолін утворюється у пресинаптичних закінченнях холінергічних нейронів з ацетил-КоА

і холіну за участі ферменту холінацетилтрансферази. Ацетил-КоА утворюється із пірувату або жирних кислот у мітохондріях (див. розділи 6 і 7). Цей метаболіт, зокрема, поєднує гліколіз із циклом Кребса.

Холін синтезується у печінці та надходить до нейронів із крові. У синаптичній щілині ацетилхолін розщеплюється ацетилхолінестеразою. Утворений у цій реакції холін транспортується назад у нервові закінчення і повторно використовується для синтезу ацетилхоліну.

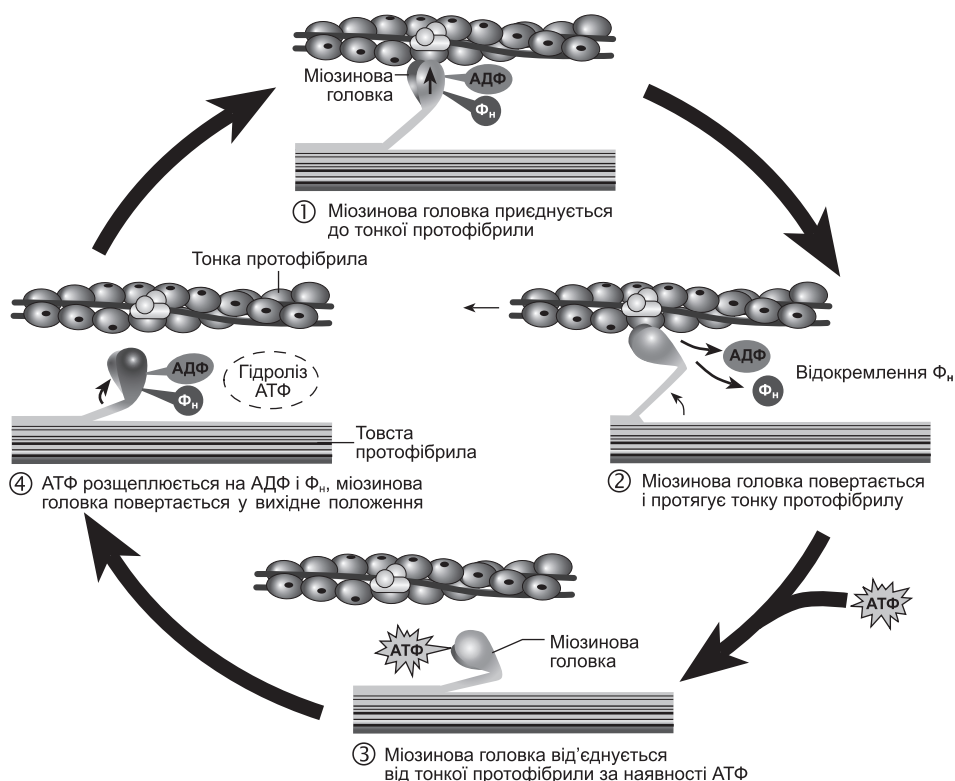


Рис. 15.1. Механізм скорочення м'язів

Варто зауважити, що в ацетилхолінових міхурцях у синапсі є також АТФ у співвідношенні одна молекула АТФ на 3–7 молекул ацетилхоліну. Відтак ацетилхолін виділяється в синаптичну щілину разом із АТФ. АТФ у цьому разі відіграє роль нейротрансмітера, функція якого до кінця ще не з'ясована.

Ацетилхолін зв'язується зі своїми рецепторами на волокнах посмугованих м'язів (Н-холінорецепторами), активація яких приводить до деполяризації сарколеми. Ця деполяризація за досягнення критичного рівня спричиняє активацію потенціалкерованих Na⁺-каналів і, відтак, генерацію потенціалів дії. Потенціали дії поширюються сарколемою вздовж м'язового волокна, а Т-трубочками – у глибину м'язового волокна і запускають скорочення скелетного м'яза.

У розслабленому м'язі, коли концентрація Ca^{2+} в саркоплазмі низька (10^{-8} М), головки міозину не можуть взаємодіяти з актиновими протофібрилами, оскільки цьому просторово заважає тропонін–тропоміозиновий комплекс. Унаслідок деполяризації мембрани Т-трубочок, зумовленої потенціалом дії, катіони Ca^{2+} надходять у клітину потенціалкерованими Ca^{2+} -каналами та водночас вивільняються з термінальних цистерн саркоплазматичного ретикулуму крізь ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали.

Підвищення концентрації катіонів Ca^{2+} у саркоплазмі до порогового рівня (10^{-6} М) супроводжується активацією скоротливого апарату внаслідок їхньої взаємодії з тропоніном С. Процес вивільнення Ca^{2+} з депо припиняється після закінчення піку потенціалу дії. Скорочення триває до тих пір, поки активація Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму не призведе до зниження концентрації катіонів Ca^{2+} у саркоплазмі. Отже, послідовність процесів, які ведуть до скорочення, є такою: потенціал дії сарколеми – потенціал дії поперечних Т-трубочок – активація мембрани термінальних цистерн ретикулуму – вихід Ca^{2+} з депо – скорочення.

Переміщення тонких протофібрил здійснюється завдяки циклічній роботі міозинових головок, які формують поперечні місточки. За наявності АТФ і Ca^{2+} у саркоплазмі міозинові головки періодично прикріплюються до тонких протофібрил, відхиляються на 45° , притягують і протягують тонкі протофібрили між товсті. Потім головки відокремлюються від тонких протофібрил, розміщуються під кутом 90° стосовно товстих протофібрил і прикріплюються на нових ділянках тонких протофібрил (рис. 15.1).

Це є можливим тоді, коли комплекс тропонінів із тропоміозином зміщується таким чином, що міозинові головки можуть приєднуватися до тонких протофібрил. Після такого приєднання енергія гідролізу АТФ використовується скоротливим апаратом міоцитів для відхилення поперечних місточків. За один “веслувальний” рух поперечного місточка саркомер вкорочується на 1 %, а за поодинокого скорочення м'яза саркомер вкорочується за 100 мс на 50 %. Для цього поперечні місточки мають зробити близько 50 циклів з частотою прикріплення та відокремлення 5–50 Гц.

Приєднання міозинових головок до тонких протофібрил спричиняє конформаційні зміни і протягування тонких протофібрил у проміжки між товстими, на що затрачається енергія гідролізу АТФ.

На одне відхилення поперечного місточка витрачається одна молекула АТФ. АТФ нековалентно приєднується до головки міозину, переводячи його у перший конформаційний стан. Коли міозин каталізує гідроліз зв'язаної АТФ і взаємодіє з актином, АДФ і P_i відщеплюються від головки міозину, яка переходить у свій другий конформаційний стан аж до приєднання наступної АТФ. Таке приєднання є необхідним для відщеплення головки міозину від актину. За повного браку АТФ виникає необоротне приєднання головки міозину до актинових протофібрил, як це спостерігають у разі **трупного заляккання** організму.

АТФ також необхідна для роботи Na^+/K^+ - та двох Ca^{2+} -помп. Перша з них підтримує електрохімічний градієнт іонів Na^+ і K^+ крізь плазматичну мембрану, а дві інші транспортують Ca^{2+} у саркоплазматичний ретикулум або позаклітинний простір. Коли рівень АТФ знижується, рівень Ca^{2+} у саркоплазмі залишається високим, розслаблення сповільнюється і виникає **контрактура втоми**. Контрактура – це стан оборотного стаціонарного скорочення, яке не здатне поширюватись.

Енергія гідролізу АТФ необхідна для відновлення низької концентрації катіонів Na^+ і Ca^{2+} у саркоплазмі, а отже, для розслаблення м'язового волокна.

Для синтезу АТФ у стані спокою, під час помірної активності й у періоди максимального навантаження м'язи використовують різні субстрати (рис. 15.2). У стані спокою джерелом енергії для м'язів слугують жирні кислоти з жирової тканини та кетонові тіла з печінки. Ці субстрати у м'язах розщеплюються до ацетил-КоА, який потрапляє у цикл Кребса і повністю окиснюється до CO_2 . Процес окиснення супроводжується перенесенням електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій до O_2 з вивільненням енергії у формі трансмембранного протонного градієнта, який мітохондрії використовують для синтезу АТФ. У разі помірного навантаження м'язи додатково використовують ще й глюкозу крові. Глюкоза спочатку фосфорилується, а потім гліколітично розщеплюється до пірувату, який перетворюється на ацетил-КоА. Помірне навантаження супроводжується збільшенням м'язового кровообігу \sim у 20 разів, зростанням хвилинного об'єму серця і дихання у 2–3 рази. Швидкість розщеплення АТФ за цих умов може збільшуватись у 100 разів і більше.



Рис. 15.2. Енергетичне забезпечення скорочення м'язів [Nicols, Cox, 2012]

У разі максимального навантаження м'язів потреба в АТФ зростає настільки, що задовольнити її лише аеробним способом немає змоги. За таких умов м'язи використовують власний глікоген, який, оминаючи гексокіназну реакцію, ферментативно розщеплюється до глюкозо-6-фосфату, а далі – до лактату, утворюючи *три молекули АТФ* (рис. 15.2). Таке розщеплення забезпечує енергією синтез більшої кількості необхідної АТФ. Використання глікогену м'язів як пального для енергетичного забезпечення їхньої роботи значно зростає за посиленої секреції адреналіну, котрий стимулює його розщеплення.

Протягом певного часу після максимально інтенсивного навантаження зберігається посилене легеневе дихання й інтенсивне окисне фосфорилювання у печінці, і цей період називають **відновлювальним**. Як вказано вище, джерелом енергії у скелетних м'язах є глікоген, з якого утворюється велика кількість лактату. У відновлювальний період частина утвореного лактату переноситься кров'ю в печінку, перетворюється на піруват, окиснюється у циклі Кребса і забезпечує синтез АТФ у цьому органі.

Інша частина лактату в печінці витрачається на синтез глюкози у процесі глюконеогенезу з використанням утвореного АТФ. Регенована глюкоза надходить у кров і далі до м'язів, де забезпечує відновлення запасів глікогену. Цей цикл має назву **циклу Корі** (рис. 15.3).

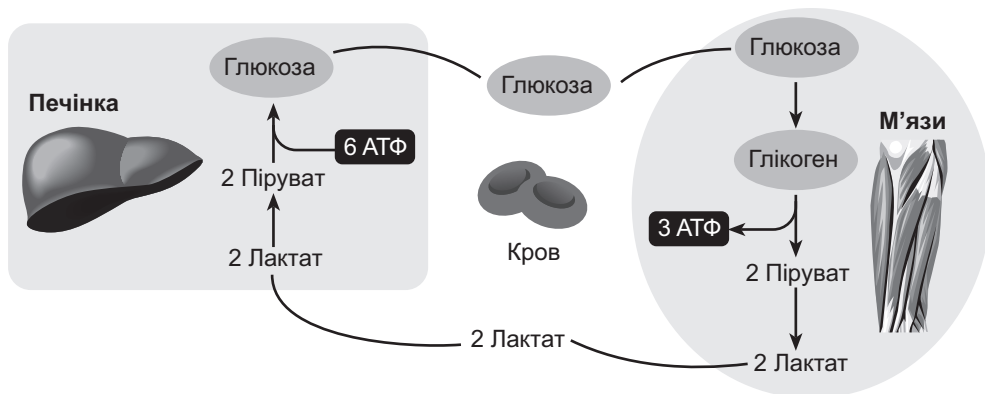


Рис. 15.3. Цикл Корі



Цикл названо на честь американських вчених Герті та Карла Корі. Вони досліджували метаболізм глікогену в період з 1925 по 1950 рр. спочатку в Баффало, штат Нью-Йорк, а з 1931 р. – у Вашингтонському університеті в Сент-Луїсі. У 1947 р. Герті та Карл отримали Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини. У 1940–1950-х роках лабораторія Корі в Сент-Луїсі стала міжнародним дослідницьким центром. Принаймні шість науковців, які працювали з подружжям Корі, стали Нобелівськими лауреатами.

У стані спокою м'яз потребує безперервного забезпечення АТФ для підтримання гомеостазу та постійного перебігу метаболічних процесів. Скелетний м'яз відрізняється від інших органів і тканин тим, що рівень АТФ у них може миттєво збільшуватись у десятки і сотні разів. Швидкість утворення АТФ за окиснення вуглеводів чи ацетоацетату є цілком достатньою для м'яза у стані спокою, але далеко не завжди для працюючого м'яза. За максимальної роботи м'язів жаби і ссавців швидкість зменшення концентрації АТФ становить відповідно 0,1 і 1 мМ за 1 хв. Проте за спокою у м'язі є тільки 5 мМ АТФ. Ця АТФ забезпечує енергетичні потреби тільки в перші 0,5 с інтенсивної роботи, коли, наприклад, у м'язі жаби швидкість утилізації АТФ збільшується у 1000 разів порівняно зі станом спокою. Максимально можливе збільшення поглинання O_2 є недостатнім, щоб аеробний метаболізм забезпечив енергетичні потреби м'яза на цьому етапі. Тому необхідне залучення інших механізмів отримання енергії.

Виокремлюють дві великі групи м'язових волокон – білих і червоних, котрі відрізняються своєю фізіологічною роллю і використанням енергетичного пального. **Білі м'язові волокна**, які також називають швидкими, мають менше мітохондрій і кровоносних судин, проте вони здатні скорочуватися швидше та сильніше. Але ці волокна швидше втомлюються, оскільки в активному стані використовують АТФ швидше, ніж можуть її синтезувати. **Червоні м'язові волокна** є повільними, але більш витривалими. Червоні м'язові волокна збагачені мітохондріями та пронизані густою сіткою кровоносних судин, що забезпечує постійне надходження кисню, необхідного для процесу окисного фосфорилювання. Саме цитохроми мітохондрій, міоглобін і гемоглобін крові надають цим м'язам характерного червоного забарвлення. Співвідношення м'язових волокон в організмі зумовлене генетично, але тренування дає змогу покращити ефективність роботи відповідної групи м'язів.

У дрібних і середніх тварин кров забезпечує м'язи киснем достатньо швидко, і потреби в анаеробному розщепленні глікогену практично не виникає. Навіть у перелітних птахів, які під час міграції долають величезні відстані практично без відпочинку, не виникає кисневої заборгованості. Натомість у великих тварин і людини постачання м'язів киснем не є таким ефективним, і ці організми посилюють м'язову активність лише за нагальної потреби, адже кожен спалах м'язової активності потребує відносно довгого періоду відновлення та компенсації кисневої заборгованості.

Кисневою заборгованістю називають ту кількість кисню, яка необхідна для синтезу АТФ у кількості, достатній для регенерації у печінці та м'язах креатинфосфату і глікогену, "позичених" під час інтенсивної роботи м'язів. Так, спринтер за 10 с бігу на 100 м споживає 1 л кисню, хоча у стані спокою – тільки 40 мл. Після фінішу певний час дихання спортсмена є прискореним і глибоким. У цей період він споживає додатково 4 л кисню. Отже, для компенсації енергетичних затрат під час бігу на 100 м потрібно сумарно 5 л кисню, 4/5 якого використовується після фінішу. Цей додатковий кисень необхідний для перетворення лактату на глікоген і для відновлення концентрації креатинфосфату.



Гліколіз робить суттєвий внесок у регенерацію АТФ, але за цих умов розвивається втом, особливо у білих м'язових волокнах. Цей спосіб отримання енергії характерний, зокрема, для великих рептилій, які зазвичай пересуваються повільно та мляво. Однак ті ж алігатори здатні блискавично атакувати, хоча після короткотривалого спалаху фізичної активності потребують досить довгого періоду відновлення, впродовж якого вони посилено використовують кисень для ресинтезу АТФ, відновлення рівня глікогену, який швидко вичерпується, та зниження лактату, нагромадженого у м'язах під час інтенсивної роботи.

Гліколіз, скоріш за все, був джерелом енергії для роботи м'язів і у динозаврів. Ці тварини також потребували тривалого періоду відновлення, але вони не були пристосовані до високого рівня кисню в атмосфері планети. Дрібніші тварини, які ефективніше на той час використовували O_2 , були, таким чином, краще пристосовані до тривалої м'язової роботи.

Серед сучасних тварин є види, які живуть у середовищі з низьким рівнем кисню. Так, у тканинах риби латимерії, яка живе в океані на глибині 4000 м, переважають анаеробні метаболічні перетворення, а більша частина утвореного лактату виводиться з організму.

Гідроліз АТФ у м'язовому скороченні. Зазвичай АТФ постачає енергію не завдяки простому гідролізу, а внаслідок перенесення фосфатної групи. Спочатку ця група переноситься на молекулу субстрату або на амінокислотний залишок ферменту з утворенням ковалентного зв'язку, що приводить до підвищення вмісту вільної енергії у перетворюваному проміжному продукті (див. розділ 4, рис. 4.4). Але у м'язовій клітині процес скорочення супроводжується безпосереднім гідролітичним розщепленням АТФ. Саме процес гідролізу молекули АТФ до АДФ і P_i забезпечує хімічною енергією перехід білків міозину з одного конформаційного стану в інший, що лежить в основі механічного руху.

Роль креатинфосфату. Запаси глікогену в скелетних м'язах становлять лише приблизно 1 % від загальної маси м'язів, що зменшує його роль за макси-

мально тривалого навантаження. Більше того, через накопичення лактату і зниження рН ефективність гліколізу та глікогенолізу в м'язах знижується у разі високої фізичної активності. Проте скелетні м'язи мають інше джерело енергії для ресинтезу АТФ – креатинфосфат, завдяки якому АТФ може швидко регенеруватися з АДФ у реакції, каталізованій креатинкіназою (див. рис. 4.8, В). У період активного скорочення м'язів ця реакція відбувається переважно у бік синтезу АТФ, а в період відновлення – той самий фермент забезпечує синтез креатинфосфату з креатину з використанням АТФ. Величина зміни стандартної вільної енергії гідролізу креатинфосфату становить -43 кДж/моль, що перевищує цей показник за гідролізу АТФ ($-30,5$ кДж/моль). Швидкість утворення АТФ за участі креатинфосфату значно перевищує швидкість синтезу АТФ у інших катаболічних реакціях. Тобто креатинфосфат виконує роль доступного депо фосфатних груп, необхідних для забезпечення швидкого синтезу АТФ з АДФ.

Концентрація креатинфосфату в клітинах м'язів є дуже високою порівняно з іншими тканинами (див. табл. 4.1) і становить приблизно 30 мМ, що у кілька разів перевищує концентрацію АТФ. В інших тканинах і органах, таких як гладенькі м'язи, мозок та нирки, концентрація креатинфосфату коливається в межах 5 – 10 мМ. Загалом, у стані спокою скелетний м'яз має достатню кількість креатинфосфату для, як мінімум, 30 – 100 поодиноких скорочень.

На рис. 15.4 представлено графік використання основних джерел енергії у перші секунди чи хвилини роботи м'язів. У найперші секунди роботи м'язи повністю використовують наявні запаси АТФ. У наступні 40 с енерговитрати забезпечуються розщепленням креатинфосфату. Якщо тривалість роботи є довшою, активуються процеси анаеробного метаболізму з піком активності на 40 – 50 с з подальшою активацією аеробних енергетичних процесів через $1,5$ – 2 хв після початку роботи.

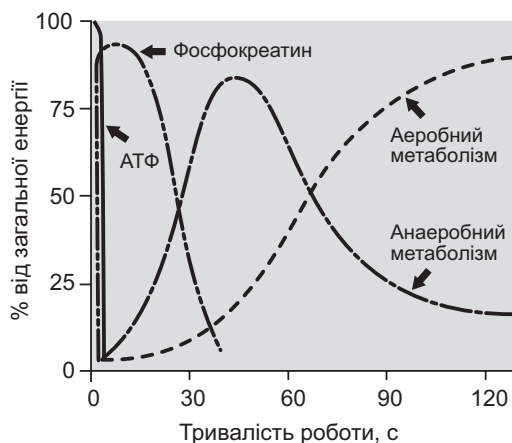


Рис. 15.4. Динаміка використання основних джерел енергії у перші дві хвилини роботи м'язів

У м'язах функціонує ще один спосіб використання енергії АТФ – за допомогою **аденілаткіназної** (міокіназної) **реакції**:



Традиційно вважається, що у процесі скорочення швидкість цієї реакції змінюється несуттєво. Давно відомо, що АМФ є позитивним ефектором фосфофруктокінази, а відтак активатором гліколізу. Коли потреба в АТФ зменшується, аденілаткіназа каталізує зворотний процес – утворення АДФ з АТФ і АМФ (див. розділ 5).

Поряд із цим, аденілаткіназа і АМФ-сигналізація слугують інтегрованою метаболічною моніторинговою системою, яка може регулювати стан клітинної енергетики та передавати сигнали до метаболічних сенсорів, таких як АМФ-активована кіназа, АТФ-залежні калієві канали, АМФ-чутливі метаболічні ферменти й аденозин [Dzeja, Terzic, 2009]. Мережа ізоформ аденілаткінази (АК1-АК7) розташована у внутрішньоклітинних компартментах, міжклітинному середовищі та рідинах тіла. Динамічне перенесення фосфатних груп аденілаткіназою регулює низку внутрішньо- та міжклітинних енергозалежних і нуклеотидсигнальних процесів, включно зі спряженням збудження та скорочення у м'язах, секрецією гормонів, рухом клітин і війок, ядерним транспортом, енергетикою клітинного циклу, синтезом і репарацією ДНК.

Наявність аденілаткіназ у мітохондріальному та міофібрилярному компартментах міоцита забезпечує використання енергії двох високоенергетичних γ - і β -фосфатних груп молекули АТФ (рис. 15.5). Підвищення рівня АМФ у клітині є сигналом для посилення мітохондріального дихання й утворення двох молекул АДФ у міжмембранному мітохондріальному просторі, які далі використовуються для синтезу АТФ за участі мітохондріальної АТФ-синтази. У міоцитах каталізовані аденілаткіназою взаємоперетворення АМФ, АДФ

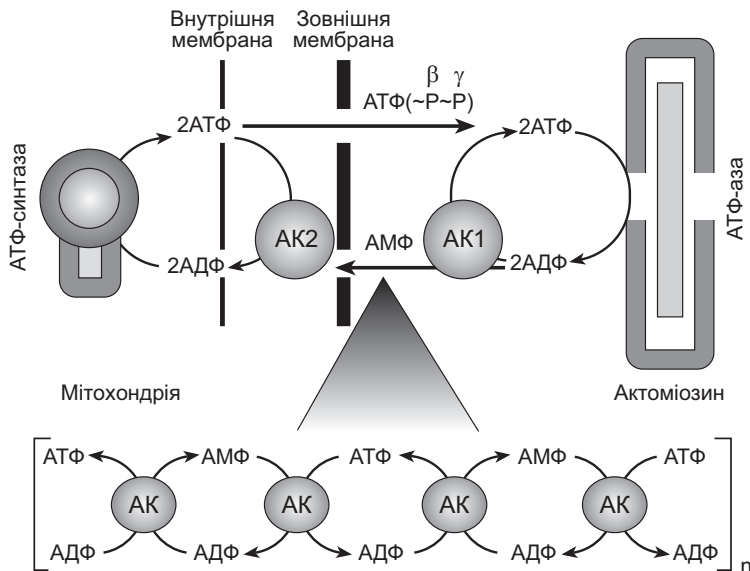


Рис. 15.5. Роль цитозольної (АК1) і мітохондріальної (АК2) аденілаткіназ у використанні високоенергетичних γ - і β -фосфатних груп під час генерування та використання АТФ у м'язах

і АТФ у процесах синтезу та гідролізу АТФ можуть включати багатократну послідовну “естафетну” передачу фосфатних груп, яка формує потік хвиль поширення аденінових нуклеотидів уздовж кластерів молекул аденілаткіназ (рис. 15.5, нижня частина). Це прискорює метаболічний потік АМФ, АДФ і АТФ без зміни їхньої сумарної концентрації.

Рівень АМФ у клітині, міжклітинному просторі чи крові є потенційним метаболічним сигналом, що асоційований із життєво важливими функціями, включно з логістикою енергетичного постачання, засвоюванням їжі, сном чи зимовою сплячкою. Як зниження, так і підвищення рівня АМФ пов’язують із цукровим діабетом, ожирінням та гіпертрофічною кардіоміопатією. Недавні дослідження встановили, що мутації ізоформ аденілаткіназ АК1, АК2 чи АК7 асоційовані з гемолітичною анемією, ретикулярною дисгенезією¹ і війковою дискінезією². Більше того, дія гормональних, харчових і антидіабетичних препаратів часто пов’язана зі змінами клітинного рівня АМФ і асоційованою з цим сигналізацією. Отже, аденілаткіназа, завдяки моніторингу нею енергетичного стану, генеруванню та розповсюдженню метаболічного АМФ-сигналу, займає унікальне місце у системі клітинного гомеостазу.

Аденілаткіназа й АМФ беруть участь у метаболічній сигналізації, регулюванні клітинної енергетики і передаванні сигналу до метаболічних сенсорів. У м’язах аденілаткіназна реакція є додатковим джерелом енергії, а АМФ активує фосфофруктокіназу, що збільшує швидкість гліколізу. Коли потреба в АТФ зменшується, аденілаткіназа каталізує утворення АДФ з АТФ і АМФ.

Теплопродукція м’язів. М’язи – не тільки “механічна машина”, а й корисний “нагрівач” організму. За ізометричного скорочення близько 70 % вивільненої енергії розсіюється у вигляді тепла. Розрізняють теплопродукцію спокою і теплопродукцію збудження. Остання є більшою і поділяється на початкову та відновну фази. Початкове теплоутворення пов’язане зі звільненням Ca^{2+} зі саркоплазматичного ретикулуму, активацією тропоміозинової системи, активацією Ca^{2+} -помпи і $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, роботою поперечних міозинових місточків. Теплопродукція у відновну фазу спричинена переважно процесами ресинтезу АТФ і креатинфосфату.

Коефіцієнт корисної дії (ККД) м’язів розраховують за такою формулою:

$$\text{ККД} = \frac{A}{A + Q}, \quad (15.2)$$

де A – виконана робота; Q – виділене тепло.

ККД м’язів людини становить 15–25 %, жаби 30–45 %, а черепахи – 70–80 %. Для порівняння, ККД бензинового двигуна автомобіля становить лише 25 %.

¹ Брак попередників мієлоїдних клітин, а отже, лімфоцитів і гранулоцитів у периферичній крові та червоному кістковому мозку

² Порушення руху війок епітелію слизової оболонки дихальних шляхів

15.2. ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ РОБОТИ СЕРЦЯ

Серцевий м'яз має постійну ритмічну активність і чергування періодів скорочення та розслаблення. У серцевому м'язі, порівняно зі скелетним, міститься набагато більше мітохондрій – вони займають майже половину об'єму клітини (див. рис. 4.6). Він багатий на міоглобін, ферменти циклу Кребса і дихальні ланцюги мітохондрій. Міокард використовує для синтезу АТФ переважно аеробні реакції. Головними субстратами окиснення є жирні кислоти, а глюкоза і кетонів тіла використовуються в невеликих кількостях. У період фізичного навантаження на організм, коли обмін у серцевому м'язі прискорюється, надходження глюкози з крові та її утилізація в кардіоміоцитах збільшується. У серцевому м'язі немає значних запасів ліпідів чи глікогену. Резервним джерелом енергії для скорочення серця є креатинфосфат, концентрація якого у кілька разів вища за АТФ (див. рис. 4.7). Завдяки аеробному метаболізму серце людини здатне постійно скорочуватися протягом цілого життя, перекачувати кров зі швидкістю приблизно 6 л/хв, тобто близько 350 л за годину, або 200 мільйонів літрів за 70 років. Така робота серця потребує постійного кровопостачання його тканин коронарною системою. Найменша перешкода для такого кровопостачання і, відтак, нестача кисню в певній ділянці серцевого м'яза зумовлює ішемію і може призвести до розвитку інфаркту міокарда.

Міокард для синтезу АТФ використовує переважно окисне фосфорилювання за окиснення жирних кислот. Кардіоміоцити не мають значних депо ліпідів чи глікогену, а як резервне джерело енергії використовують креатинфосфат.

15.3. РУХ ВІЙОК І ДЖГУТИКІВ

Рухомі джгутики у еукаріотів слугують для руху окремих клітин (наприклад, сперматозоїдів) чи транспорту рідин (наприклад, транспорт слизу в трахеях). Клітинні джгутики також є життєво важливими органелами у фоторецепторних паличках ока, нюхових нейронах носа, у равлику вуха тощо.

Особливий варіант енергетичного забезпечення руху спостерігаємо на прикладі рухливості різних клітин, яка пов'язана зі спеціальною структурою – аксонемою (рис. 15.6). Аксонему виявили у джгутиках сперматозоїдів, а також у війках багатьох клітин. Коло з дев'яти пар (дуплетів) мікротрубочок міститься всередині стовбура джгутика або війки. Кожна пара включає одну “круглу” мікротрубочку (1), в поперечному перерізі якої є 13 молекул тубуліну, і одну “напівкруглу” (2) з десятьма молекулами тубуліну. До складу мікротрубочок війок входить два типи тубуліну – α - і β -тубуліни, які чергуються. Мікротрубочки мають зазвичай довжину від 0,5 мкм (звичайні) до кількох міліметрів (сперматозоїди і гребеневики). На кожній “круглій” мікротрубочці є “ручка”, утворена динеїном – АТФ-азою (5×10^5 кДа), яка активується або Ca^{2+} або Mg^{2+} .

Молекула динеїну має розмір 9×30 нм. У розчині динеїн спонтанно рекомбінується з “круглою” мікротрубочкою зовнішніх дуплетів. У структуру аксономи входить також білок нексин (150 кДа), який утворює міждуплетні зв’язки.

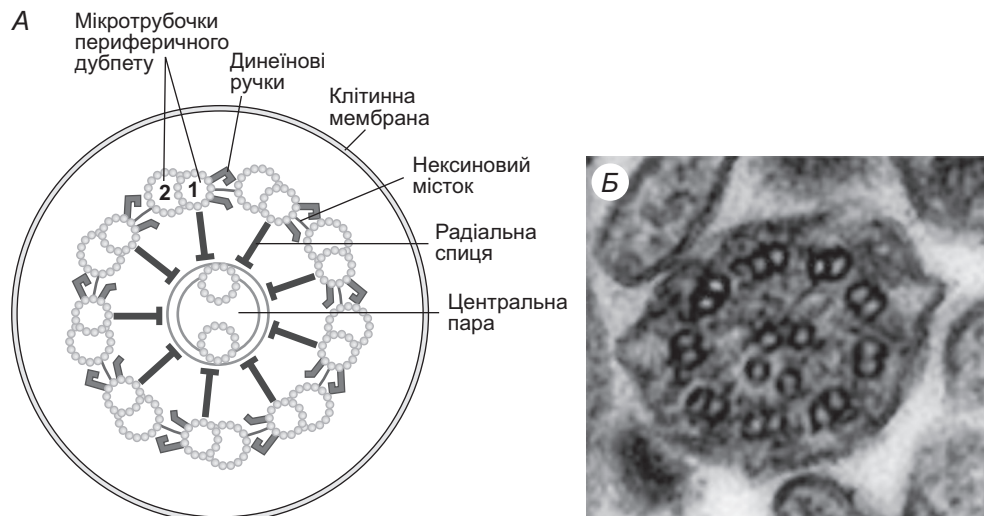


Рис. 15.6. Схема аксономи джгутика еукаріот (А) і поперечний зріз через війки з добре помітною структурою аксономи (Б)

У клітинах еукаріот, які мають джгутики або війки, рух забезпечують мікротрубочки завдяки АТФ-азній активності динеїну.

Війки і джгутики постачаються енергією в достатній кількості, щоб забезпечити їхній рух. У війок між зовнішніми дуплетами відбувається активне ковзання. Пояснюючи синусоїдальний характер биття джгутиків, припускають, що динеїнові “ручки” можуть переміщатися до сусіднього дуплету і функціонувати подібно до міозинового “веслувального човника”. Цікаво, що динеїн виявлено у клітинах, які діляться і в яких мікротрубочки входять у структуру мітотичного веретена.

Джгутики бактерій – абсолютно інша структура, ніж джгутики еукаріотів, які мають інше еволюційне походження. Об’єднує бактеріальні та еукаріотичні джгутики тільки те, що всі вони – позаклітинні структури, причетні до руху. Для бактерій описано цікавий приклад енергетичного забезпечення. Обертальний рух бактеріального джгутика підтримується не завдяки енергії АТФ, а завдяки роботі “протонних турбін” – молекулярних обертальних моторів, джерелом енергії для яких є безпосередньо електрохімічний потенціал протонів (рис. 15.7). Протони повертаються назад у клітину крізь “турбіну”, викликаючи повертання держака війки. Деякі бактеріальні джгутики працюють завдяки транспортуванню до цитоплазми іонів Na^+ . Така рухова активність принципово відрізняється від руху м’язів і еукаріотичних війок та джгутиків, котрі використовують як джерело енергії АТФ.



Рис. 15.7. Обертання бактеріального джгутика завдяки протонрушійній силі

Підсумок 15. ЕНЕРГЕТИКА РУХУ

- Специфіка метаболізму м'язів зумовлена необхідністю використання АТФ для виконання механічної роботи. Приєднання міозинових поперечних місточків до тонких протофібрил підвищує АТФ-азну активність міозину, що приводить до гідролізу АТФ, енергія якого використовується на відхилення поперечних місточків. На одне відхилення поперечного місточка витрачається одна молекула АТФ.
- АТФ також необхідна для роботи Na^+/K^+ - та двох Ca^{2+} -помп. Перша з них підтримує електрохімічний градієнт Na^+ і K^+ крізь плазматичну мембрану, а дві інші – транспортують Ca^{2+} у саркоплазматичний ретикулум чи позаклітинний простір.
- За максимального навантаження у швидко скорочуваних м'язах потреба в АТФ зростає, і м'язи використовують накопичений у них глікоген, який ферментативно розщеплюється до лактату. За цих умов утворюється три молекули АТФ.
- Скелетні м'язи для ресинтезу АТФ використовують як джерело енергії під час інтенсивного скорочення креатинфосфат, який швидко регенерує АТФ з АДФ у креатинкіназній реакції. У період відновлення той самий фермент забезпечує синтез креатинфосфату з креатину завдяки АТФ.
- У м'язах аденілаткіназна (міокіназна) реакція слугує додатковим джерелом енергії, а АМФ є позитивним ефектором фосфофруктокінази, що збільшує швидкість гліколізу. Коли потреба в АТФ змен-

шується, аденілаткіназа каталізує утворення АДФ з АТФ і АМФ. Окрім цього, аденілаткіназа і АМФ беруть участь у метаболічній сигналізації, яка може регулювати стан клітинної енергетики і передавати сигнали до метаболічних сенсорів.

- Серцевий м'яз, який має відносно велику кількість мітохондрій, використовує для поповнення АТФ в основному аеробні реакції. У цьому разі головними субстратами окиснення є жирні кислоти. У м'язах не відкладається значна кількість ліпідів або глікогену. Резервним джерелом енергії для забезпечення постійного скорочення серця є креатинфосфат.
- Під час роботи м'язів 70 % енергії розсіюється у вигляді тепла і тільки 30 % перетворюється на механічну роботу. Розрізняють теплопродукцію спокою і збудження.
- У джгутиках сперматозоїдів і у війках багатьох клітин енергетичне забезпечення руху здійснюється аксонемою – системою мікротрубочок, яка приводиться в рух енергією АТФ за участі АТФ-ази – динеїну.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- 1. Регулювання активності глікогенфосфорилази у м'язах.** Швидкість перетворення глікогену на глюкозо-6-фосфат залежить від співвідношення активної та менш активної форм фосфорилази. Як вплине на розщеплення глікогену додавання до препарату м'язів: а) кінази фосфорилази й АТФ; б) ФФ_н; в) адреналіну?
- 2. Розщеплення глікогену в перелітних птахів.** Літальні м'язи перелітних птахів мають високу окисну ємність і отримують необхідну кількість АТФ через окиснення ацетил-КоА (жирового походження) у циклі Кребса. Порівняйте регулювання гліколізу в м'язах кролика, який тікає, і у м'язах перелітних птахів під час міграції. Чому регулювання гліколізу в цих випадках відрізняється?
- 3. Яка концентрація креатинфосфату в скелетних м'язах у стані спокою?**
 - 1) 5 мМ;
 - 2) 28–30 мМ;
 - 3) 1 мМ;
 - 4) 100 мкМ.
- 4. Кількість кисню, необхідна для синтезу АТФ в об'ємі, достатньому для регенерації в печінці та м'язах глікогену, "позиченого" для забезпечення посиленої роботи м'язів під час бігу, називають:**
 - 1) киснева заборгованість;
 - 2) киснева ємність;
 - 3) кисневий потенціал м'язів;
 - 4) кисневий потенціал печінки.

5. Що описує формула: $ККД = A / A + Q$ (де A – виконана робота; Q – виділене тепло)?
- 1) ефективність роботи скелетного м'яза;
 - 2) теплопродукцію м'язів;
 - 3) нагрівання двигуна внутрішнього згорання;
 - 4) ефективність дихального ланцюга мітохондрій.
6. Саркоплазматична мембрана міоцитів містить:
- 1) потенціалзалежні Ca^{2+} -канали L-типу (PMCA);
 - 2) Ca^{2+} -АТФ-ази, які викачують Ca^{2+} у міжклітинний простір;
 - 3) Ca^{2+} -АТФ-ази (SERCA);
 - 4) ріанодинчутливі Ca^{2+} -АТФ-ази канали.
7. Скільки молекул АТФ утворюється у процесі глікогенолізу в м'язах, коли глікоген ферментативно розщеплюється до лактату?
- 1) 3;
 - 2) 2;
 - 3) 32;
 - 4) 30.
8. Який білок рухового апарату джгутика сперматозоїда є АТФ-азою?
- 1) динеїн;
 - 2) α -тубулін;
 - 3) β -тубулін;
 - 4) нексин.
9. Яка порогова концентрація Ca^{2+} у саркоплазмі активує скорочення м'яза?
- 1) 10^{-6} М;
 - 2) 10^{-8} М;
 - 3) 10^{-4} М;
 - 4) 10^{-2} М.
10. Виберіть правильні характеристики білих м'язових волокон:
- 1) скорочуються повільно;
 - 2) утворюють АТФ переважно у процесі гліколізу;
 - 3) швидко втомлюються;
 - 4) в активному стані використовують АТФ швидше, ніж можуть її замінити.
11. Серцевий м'яз відрізняється від скелетних м'язів:
- 1) постійною активністю з ритмічним чергуванням періодів скорочення та розслаблення;
 - 2) наявністю тільки аеробного метаболізму;
 - 3) високою активністю аденілаткіназної реакції;
 - 4) тим, що головними субстратами окиснення є жирні кислоти.
12. Виберіть правильні характеристики червоних м'язових волокон:
- 1) стійкі до втоми;
 - 2) утворюють АТФ переважно у процесі окисного фосфорилування;
 - 3) збагачені мітохондріями і гемоглобіном;
 - 4) швидко втомлюються.

13. Коли АТФ зв'язується з головкою міозину, остання:

- 1) відчіпляється від молекули актину;
- 2) приєднується до молекули актину;
- 3) змінює положення, переміщаючи тонку протофібрилу;
- 4) змінює положення, переміщаючи товсту протофібрилу.

**ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

- Скок В.И., Шуба М.Ф.* Нервно-мышечная физиология. – К.: Вища школа, 1986. – 223 с.
- Скулачев В.* Рассказы о биоэнергетике. – Москва: Молодая гвардия, 1985. – 191 с.
- Фізіологія людини і тварин (фізіологія нервової, м'язової і сенсорних систем): підручник [для студ. вищ. навч. закл.] / М.Ю. Клевець, В.В. Манько, М.О. Гальків та ін. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 304 с.
- Doliba N., Babsky A., Doliba N. et al.* AMP promotes oxygen consumption and ATP synthesis in heart mitochondria through the adenylate kinase reaction: a NMR spectroscopy and polarography study // *Cell Biochem. Funct.* – 2014. – Vol. 33, N 2. – P. 67–72.
- Dzeja P., Terzic A.* Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – P. 1729–1772.
- Nelson D.L., Cox M.M.* *Lehninger Principles of Biochemistry.* – 4th ed. – New York: W.H. Freeman and Co., 2012. – 1340 p.
- Opie L.H.* *The Heart. Physiology and Metabolism.* – 2nd ed. – New York: Raven Press, 1991. – 513 p.

БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ОСНОВИ СЕКРЕТОРНИХ І НЕЙРОГУМОРАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

- Енергетичні процеси за секреції інсуліну
- Механізми секреції хлоридної кислоти
- Енергетичне забезпечення передавання нервових імпульсів
- Теорія субстратно-гормональних систем

В основі усіх фізіологічних процесів лежить здатність клітин і їхніх мітохондрій трансформувати хімічну енергію в корисну роботу. Найбільш виражено це спостерігають за використання енергії АТФ у механічній роботі м'язів, що було розглянуто в розділі 15. У цьому розділі будуть проаналізовані приклади трансформації та використання енергії АТФ за функціональних фізіологічних процесів у підшлунковій залозі, шлунку та нервових клітинах.

Часто регулювання енергетичних процесів у тканинах здійснюється через реципрокні та синергійні взаємодії нейрогуморальних систем. У 1982 р. було запропоновано гіпотезу субстратно-гормональних систем регулювання енергетичних процесів, у якій добре відомі реципрокні взаємодії симпатичної та парасимпатичної нервових систем, пов'язані з реципрокними взаємодіями енергетичних субстратів у мітохондріях різних органів.

16.1. ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ ЗА СЕКРЕЦІЇ ІНСУЛІНУ

Підтримання стаціонарного рівня глюкози у крові близько 5 мМ контролюють гормони інсулін, глюкагон, адреналін і кортизол. За споживання їжі, збагаченої вуглеводами, глюкоза надходить у кров із кишечника і сприяє підвищенню секреції інсуліну. Загальний механізм цієї стимуляції представлено на рис. 16.1. У підшлунковій залозі β-клітини транспортують глюкозу в цитозоль за допомогою переносників родини GLUT відповідно до фізіологічних коливань глюкози у крові. У цитозолі β-клітин відбувається фосфорилування глюкози гексокіназою типу 4 (глюкокіназа), і таким чином регулюється гліколітична активність залежно від зовнішньоклітинної концентрації глюкози.

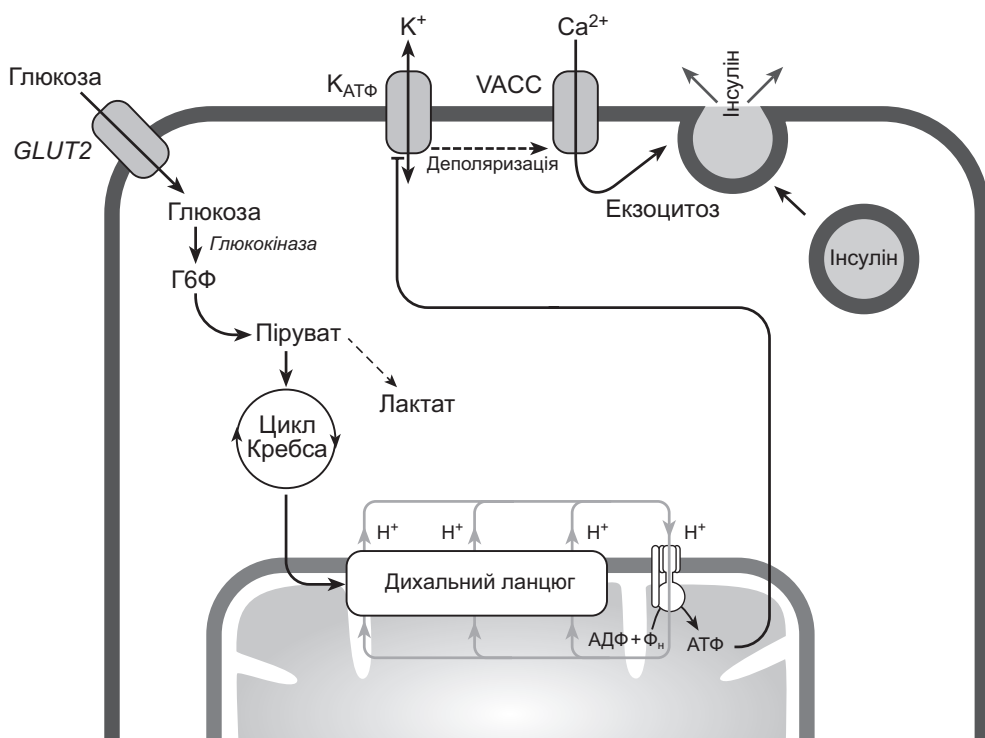


Рис. 16.1. Секреція інсуліну, стимульована глюкозою у β-клітинах підшлункової залози: GLUT2 – переносник глюкози; K_{ATP} – АТФ-чутливий K^+ -канал; VACC – потенціалкерований Ca^{2+} -канал

Кожен тип клітин острівців Лангерганса у підшлунковій залозі продукує окремий гормон: α-клітини – глюкагон, β-клітини – інсулін, δ-клітини – соматостатин, а PP-клітини – панкреатичний поліпептид. У людей у підшлунковій залозі є від 200 тис. до 2 млн острівців. Інсулінсекретуючі β-клітини розташовані у центрі острівця і становлять 60–80 % від загального числа клітин.

Ці клітини з'єднані між собою за допомогою щільних контактів, що дає змогу залозі синхронно реагувати на зміни концентрації глюкози у плазмі крові.

Для β -клітин характерний низький рівень активності лактатдегідрогенази і монокарбоксилатного транспортера у плазматичній мембрані. За таких умов “вимикається” ефект Пастера, і зниження окисного фосфорилування не може бути компенсоване збільшенням інтенсивності гліколізу. Це також зумовлює те, що β -клітини є нечутливими до рівнів пірувату і лактату у крові. Крім того, α -гліцерофосфат- і малат/аспартат-переносники дають змогу цитоплазматичному НАДН, синтезованому в процесі гліколізу, окислятися у мітохондріях. Піруват, що утворюється у процесі гліколізу, може відновитися до лактату за умов недостатності мітохондріальної функції та, як наслідок, надлишку НАДН у цитозолі.

Ще однією особливістю мітохондрій β -клітин є висока базова протонна провідність [Affourtit, Brand, 2005], що визначає рівень мембранного потенціалу мітохондрій. Його обидва компоненти ($\Delta\psi$ і ΔpH) зростають уже за активації гліколізу. Це приводить до раннього підвищення цитоплазматичного співвідношення АТФ/АДФ, хоча β -клітини підшлункової залози мають високу швидкість метаболізму АТФ. K_{ATP} -канали плазматичної мембрани інгібуються АТФ, зменшується надходження в клітину іонів K^+ , плазматична мембрана деполяризується, активуються потенціалкеровані Ca^{2+} -канали (VACC) і запускається Ca^{2+} -залежна секреція інсуліну механізмом екзоцитозу.

Інсулін стимулює надходження до клітин м'язів і жирової тканини глюкози, яка у цитоплазмі перетворюється на глюкозо-6-фосфат. У печінці інсулін активує глікогенсинтазу й інактивує глікогенфосфорилазу, тому більша частина утвореного глюкозо-6-фосфату спрямовується на утворення глікогену. Інсулін у печінці також стимулює гліколіз, а відтак утворення пірувату і далі ацетил-КоА. Якщо утворений ацетил-КоА не окиснюється, то він використовується для синтезу жирних кислот, які запасуються у формі триацилгліцеролів у жировій тканині. Узгоджена дія інсуліну та глюкагону (табл. 16.1) допомагає підтримувати концентрацію глюкози у плазмі здорових осіб у діапазоні від 3,6 до 5,8 мМ.

У β -клітинах підшлункової залози немає реципрокних зв'язків між гліколізом і мітохондріальним окисненням. Оскільки K_{ATP} -канал плазматичної мембрани β -клітин інгібуються АТФ і активується АДФ, то підвищення рівня АТФ зумовлює сповільнення надходження іонів K^+ у клітину, деполяризацію плазматичної мембрани, відкриття потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів і активацію Ca^{2+} -залежної секреції інсуліну.

Секреція інсуліну не є безперервною, а має коливний характер із періодичністю в кілька хвилин, який корелює з коливаннями мембранного потенціалу, рівнем цитозольного Ca^{2+} , інтенсивністю дихання та гліколізу. Дослідженнями цитозольної концентрації іонів Ca^{2+} виявлено також швидкі коливання концентрації катіона з періодом у кілька секунд, що корелюють з повільними коли-

ваннями з періодом 2–4 хв. Ці повільні коливання синхронізовані зі секрецією інсуліну та пов'язані з метаболічними (гліколітичними) чинниками, а швидкі коливання – з роботою іонних каналів.

Секреція інсуліну у відповідь на тривале зростання глюкози має двофазний характер. Перша фаза пов'язана з вивільненням запасів інсуліну з везикул, щільно приєднаних до плазматичної мембрани, а друга – зі синтезом нових “порцій” гормону і його транспортом до мембрани. Тривалість першої фази 1–3 хв, а другої – 25–30 хв.

Таблиця 16.1

Вплив інсуліну та глюкагону на рівень глюкози у крові

Фермент-мішень	Метаболічний ефект/вплив на обмін глюкози
ІНСУЛІН	
↑ Транспорт глюкози через GLUT4-переносники	↑ Поглинання глюкози у м'язах і жировій тканині (зростання вмісту глюкози)
↑ Глюкокіназа	↑ Поглинання глюкози в печінці (підвищення експресії ферменту)
↑ Глікогенсинтаза	↑ Синтез глікогену в печінці та м'язах (запасання глюкози у формі глікогену)
↓ Глікогенфосфорилаза	↓ Розщеплення глікогену в печінці та м'язах
↑ Фосфофруктокіназа ↑ Піруватдегідрогеназний комплекс	↑ Гліколіз, утворення ацетил-КоА в печінці та м'язах (активування аеробного метаболізму)
↑ Ацетил-КоА-карбоксилаза	↑ Синтез жирних кислот у печінці (альтернативне джерело енергії)
↓ Триацилгліцеролліпаза	↓ Розщеплення триацилгліцеролів у жировій тканині (альтернативне джерело енергії)
ГЛЮКАГОН	
↑ Глікогенфосфорилаза	↑ Розщеплення глікогену до глюкози в печінці
↓ Глікогенсинтаза	↓ Синтез глікогену в печінці
↑ Фруктозо-1,6-біфосфатаза ↑ ФЕП-карбоксилаза ↓ Піруваткіназа	↑ Глюконеогенез у печінці (перетворення амінокислот, гліцеролу й оксалоацетату на глюкозу)
↓ Фосфофруктокіназа	↓ Гліколіз у печінці (зменшення окислення глюкози)
↑ Триацилгліцеролліпаза	↑ Мобілізація жирних кислот у жировій тканині
↓ Ацетил-КоА-карбоксилаза	↑ Кетогенез (альтернативне джерело енергії для мозку)

Примітка: ↑ і ↓ – відповідно активація та інгібування процесу або ферменту

Очевидний зв'язок між змінами концентрації цитозольного Ca^{2+} і секрецією інсуліну привів до створення концепції мітохондріальних “зв'язуючих факторів”, які модулюють секрецію гормону. До них належать інтермедіати циклу Кребса та трансаміназних реакцій піруват, малат, цитрат, ізоцитрат і глутамат.

Відомо, що піруват у мітохондріях метаболізується піруватдегідрогеназою і піруваткарбоксилазою, причому останній шлях є анаплеротичним (див. розділ 10). Він активізує синтез інтермедіатів циклу Кребса і їхнє надходження у цитозоль, де вони можуть бути використані для утворення амінокислот, необхідних для синтезу інсуліну й інших білків. Генерування цитозольного НАДФН є спільною рисою багатьох метаболічних циклів, що пов'язують мітохондріальні й цитозольні пули пірувату, малату, цитрату або ізоцитрату, які активізують синтез інсуліну.

Незважаючи на визначальну роль глюкози у стимулюванні синтезу інсуліну, основним джерелом енергії для β -клітин є жирні кислоти, але тільки за базального рівня глюкози. Жирні кислоти не стимулюють секрецію інсуліну, доки рівень глюкози не зростає, наприклад, до 15 мМ. Однак ефекти жирних кислот можуть частково реалізуватися без змін енергетичних процесів, наприклад, через взаємодію із рецепторами плазматичної мембрани GPR-40, які сприяють секреції інсуліну. Хронічний вплив підвищених концентрацій жирних кислот може зумовлювати втрату “чутливості” β -клітин до глюкози.

Рівень глюкози у крові на сталому рівні регулюється інсуліном за принципом зворотного зв'язку, а саме гормон активує споживання глюкози тканинами і таким чином знижує її рівень у крові. β -Клітини у відповідь на це зменшують швидкість перетворення глюкози у глюкокіназній реакції, внаслідок чого гальмується, а навіть і припиняється вивільнення інсуліну.

Зниження рівня глюкози у крові спричиняє секрецію іншого гормону – глюкагону, який підвищує концентрацію глюкози у крові через стимулювання розщеплення глікогену, інгібування гліколізу, посилення глюконеогенезу в печінці та мобілізацію жирних кислот (табл. 16.1).

Голодування призводить до зниження рівня глюкози у крові. Рівень кетонів тіл за цих умов різко підвищується після двох–чотирьох днів голодування, а ацетоацетат, β -оксипутират чи водорозчинні кетони стають додатковим джерелом енергії, в т.ч. і для мозку.

На рівень інсуліну та глюкагону впливає гормон мозкового шару наднирників – **адреналін**. Він пригнічує секрецію інсуліну й активізує секрецію глюкагону. Адреналін вивільняється в кров у відповідь на дію стресорних чинників достатньої сили, запускаючи реакції неспецифічного адаптаційного синдрому, або стресу. Цей гормон підвищує силу та частоту скорочень серця, підвищує кров'яний тиск, забезпечує посилене постачання тканин киснем і макроергами. Зазвичай адреналін впливає на метаболізм печінки, м'язів і жирової тканини. Клітинні механізми ефектів адреналіну реалізуються через зв'язування гормону з адренорецептором плазматичної мембрани та цАМФ-залежне фосфорилювання відповідних ферментів (рис. 16.2). Зокрема, цей гормон стимулює розщеплення глікогену печінки до глюкози через активацію глікогенфосфорилази й інгібування глікогенсинтази. Адреналін також прискорює гліколіз через

підвищення активності ключового ферменту гліколізу – фосфофруктокінази 1 (див. розділ 6). Іншим способом активації енергетичного обміну адреналіном є мобілізація жирів із жирової тканини.

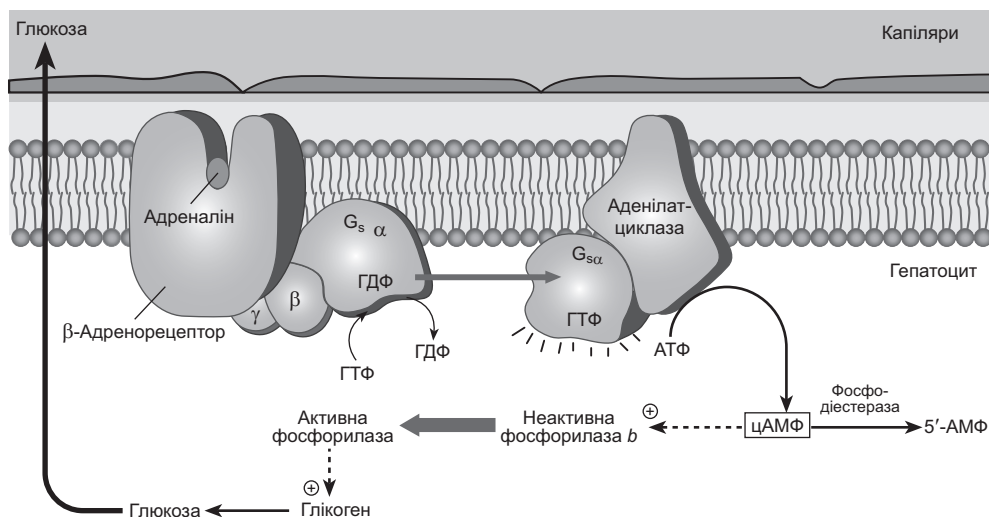


Рис. 16.2. Механізм адреналінстимульованого вивільнення глюкози з клітин печінки

16.2. МЕХАНІЗМИ СЕКРЕЦІЇ ХЛОРИДНОЇ КИСЛОТИ

За добу епітеліальні клітини шлунка виробляють 1,5–2,5 л травного соку. рН шлункового соку людини становить 1,0–1,5, оскільки містить 0,3–0,5 % хлоридної кислоти (HCl). Кількість води у шлунковому соку становить 99–99,5 %.

Хлоридна кислота продукується парієтальними клітинами у перешийку, шийці та верхньому відділі тіла травної залози. Цим клітинам притаманна розгалужена система каналців і мітохондрій уздовж них. У спокої каналці апікальної частини клітин мають вигляд тубовезикул, а за стимуляції вони перетворюються на справжні каналці, мембрана яких зливається з апікальною мембраною, що збільшує її площу. Під час стимуляції збільшується кількість і довжина мікроворсинок апікальної мембрани. Збільшення її площі у парієтальних клітинах сприяє збільшенню кількості іонних транспортерів і контактів мембран із мітохондріями, які постачають енергію та протони для синтезу HCl.

Парієтальні клітини шлунка активно використовують глікоген. Секреція HCl – цАМФ-залежний процес, який активується на тлі підсилення глікогенолітичної та глікогенної активності й утворення пірувату. Піруватдегідрогеназа окиснює піруват, декарбоксилуючи його до ацетил-КоА. При цьому в цитоплазмі нагромаджується відновлена форма НАД, який клітини використовують для генерування H^+ у процесі синтезу HCl. Крім того, розщеплення триацилгліцеролів у слизовій шлунка тригліцеролліпазою та подальша утилізація жирних кислот у 3–4 рази збільшує надходження відновлювальних еквівалентів у дихальний

ланцюг мітохондрій. Обидва катаболічних шляхи – анаеробний гліколіз і окиснення жирних кислот – запускаються через цАМФ-залежне фосфорилування ферментів циклу Кребса.

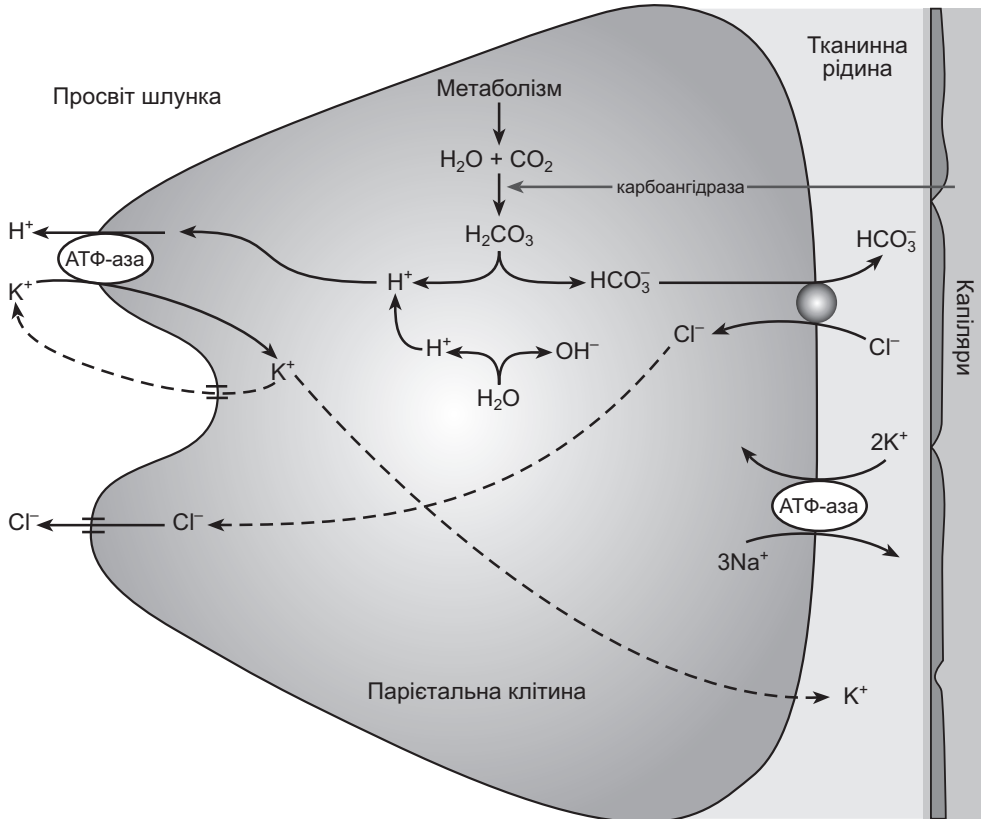


Рис. 16.3. Енергетичне забезпечення синтезу хлоридної кислоти

З-поміж субстратів циклу Кребса сукцинат найбільш інтенсивно, але короткочасно підвищує споживання кисню та продукцію HCl [Покровский и др., 1973]. За умов стимуляції шлункової секреції зростає активність сукцинатдегідрогенази. НАДН-продукуючі субстрати циклу – α -кетоглутарат і малат – мають менш виражений, але триваліший вплив на секрецію HCl. За величиною стимулюючої дії на синтез HCl субстрати окиснення можна розташувати в такому порядку: піруват > сукцинат > α -кетоглутарат > малат [Ивашкин В.Т., 1981]. Вважають, що в період інтенсивної секреції HCl сукцинат може “монополізувати” дихальний ланцюг.

Масивне вивільнення H^+ із парієтальних клітин у порожнину шлунка і нагромадження OH^- у цитозолі може зумовити пошкодження клітин епітелію. За цих умов нейтралізацію гідроксилів здійснює карбоангідраза у реакції:



Гідрокарбонати, що утворилися, виходять із парієтальної клітини у порожнину шлунка в обмін на іони Cl^- , які теж потрібні для синтезу хлоридної кислоти.

До синтезу HCl залучені такі транспортні системи плазматичних мембран: Na^+/K^+ - і H^+/K^+ -помпи, Cl^- -канали і $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -обмінник. Na^+/K^+ -помпа розташована в базолатеральних мембранах клітин і забезпечує надходження у клітини іонів K^+ та виведення іонів Na^+ , друга – в секреторній мембрані і транспортує K^+ з первинного секрету в клітину в обмін на протони (H^+), які виводяться у шлунковий сік (рис. 16.3). За секреції мембрани каналців і мітохондрій зливаються і H^+/K^+ -помпа секреторної мембрани може безпосередньо використовувати H^+ , виводячи їх із клітини. Вода надходить у каналці шляхом осмосу, доводячи концентрацію HCl до 155 мМ, а концентрацію KCl – до 15 мМ.

Парієтальні клітини шлунка використовують глікоген і триацилгліцерол для секреції хлоридної кислоти у цАМФ-залежному процесі, що супроводжується утворенням пірувату, ацетил-КоА та відновленого НАДН, який бере участь у генеруванні H^+ для HCl .

Секреторна поверхня слизової оболонки шлунка заряджена негативно щодо його серозної поверхні, а це створює трансепітеліальний потенціал 20–60 мВ, який сприяє секреції H^+ , але є бар'єром для іонів Cl^- . Різницю концентрацій іонів хлору створює електрогенна хлоридна помпа секреторної мембрани парієтальних клітин, яка є одним із важливих механізмів формування трансепітеліального потенціалу, що лежить в основі секреції HCl . Порушення трансмембранного градієнта і трансепітеліального потенціалу призводить до зворотної дифузії H^+ у клітину з усіма негативними наслідками.

16.3. ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПЕРЕДАВАННЯ НЕРВОВИХ ІМПУЛЬСІВ

Основним джерелом енергії для нейронів мозку дорослих ссавців є глюкоза, яка за аеробних умов окиснюється у процесі гліколізу та в циклі Кребса, а потік електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій забезпечує синтез практично всієї кількості АТФ, необхідної їм за фізіологічних умов (рис. 16.4). У стані спокою мозок споживає майже 20 % загальної кількості O_2 , що надходить в організм. У нейронах АТФ є необхідною, насамперед, для генерації мембранного потенціалу спокою. Електрогенна Na^+/K^+ -помпа, як і в інших клітинах, переносить три іони Na^+ назовні та два іони K^+ – усередину (див. розділ 14). У результаті виникає трансмембранний потенціал спокою, на основі якого генерується потенціал дії. Виникнення і передавання електричного сигналу у формі потенціалу дії є головним механізмом передавання інформації в нервовій системі, а тому вичерпання запасу АТФ у нейронах негативно впливає на всі процеси і в мозку, і в органах та системах, які координуються нейрональними сигналами.

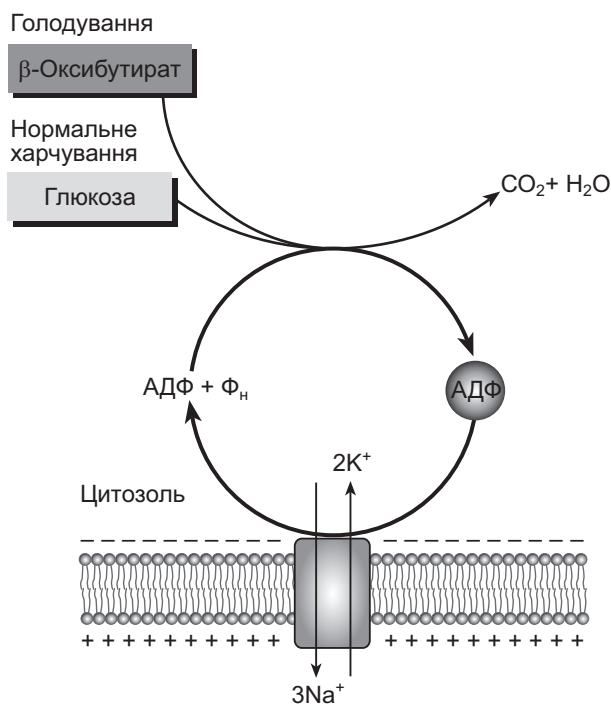


Рис. 16.4. Енергетичні джерела для підтримання електрохімічних градієнтів Na⁺ і K⁺ крізь плазматичну мембрану нейрона мозку

У разі потреби нейрони можуть використовувати як джерело енергії кетонів тіла, що утворюються із жирних кислот у печінці. За тривалого голодування, коли вичерпуються запаси глікогену і коли жири стають постачальниками енергії, нейрони окиснюють β-оксибутират до ацетил-КоА і далі до CO₂. Це дає організмові, який голодує, змогу впродовж певного часу зберігати білки м'язів, аж доки вони не залишаться єдиним джерелом для синтезу глюкози у процесі глюконеогенезу в печінці.

Джерелом енергії для нейронів мозку є глюкоза (за нормального харчування) та кетонів тіла (за тривалого обмеження в їжі). Використання кетонів тіл під час голодування протягом певного часу запобігає розщепленню білків м'язів.

16.4. ТЕОРІЯ СУБСТРАТНО-ГОРМОНАЛЬНИХ СИСТЕМ

Органи, тканини та мітохондрії *in vivo* перебувають під постійним нейрогормональним контролем. У результаті багатолітньої співпраці кафедри фізіології людини і тварин Львівського університету імені Івана Франка та Інституту біологічної фізики АН СРСР (керівники проекту – професори І.В. Шостаковська та М.М. Кондрашова), яка розпочалася на початку 1980-х років, була запропонована теорія субстратно-гормональних систем регулювання енергетичних процесів. Було встановлено, що адреналін у фізіологічних і субстресових концентраціях вибірково стимулює окиснення сукцинату й інгібує окиснення α -кетоглутарату в мітохондріях печінки й тонкої кишки [Шостаковская, Бабский, 1986]. Натомість ацетилхолін вибірково стимулює окиснення α -кетоглутарату й інгібує окиснення сукцинату в мітохондріях печінки, серця та підшлункової залози [Шостаковская и др., 1986; Kondrashova, Doliba, 1986; Долиба та ін., 1993]. Таким чином, була виявлена реципрокність дії адреналіну й ацетилхоліну на енергетичні процеси у мітохондріях, які на клітинному рівні реалізують свої ефекти через систему циклічних нуклеотидів, – відповідно цАМФ (рис. 16.2) і цГМФ.

З іншого боку, пізнішими дослідженнями було встановлено, що аспартат-амінотрансфераза (глутаматоксалоацетаттрансаміназа) активується і адреналіном, і ацетилхоліном [Кондрашова, Григоренко, 1989]. Отже, було виявлено, що адренергічна і холінергічна регуляція циклу Кребса може здійснюватися через три основних ферменти: сукцинатдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу і аспартатамінотрансферазу.

Також встановлено, що субстрати можуть реципрокно впливати на рівень активності симпатичної та парасимпатичної нервових систем. Так, сукцинат і α -кетоглутарат *in vivo* стимулювали утворення адреналіну й ацетилхоліну відповідно. Ключове питання про механізми таких впливів було практично розв'язане публікацією даних експериментів про наявність у плазматичній мембрані специфічних рецепторів для сукцинату й α -кетоглутарату [He et al., 2004]. Автори встановили можливість сигнальної дії цих субстратів *in vivo* в мікромолярних концентраціях, яка може реалізуватися через виявлені ними рецептори. Також було встановлено, що рецептор, задіяний у регулюванні артеріального тиску в нирках і утворенні реніну й ангіотензину, тоді як сам ангіотензин активує синтез адреналіну [Dogan et al., 2004]. Ці дані пояснюють виявлену раніше стимуляцію діурезу на тлі посиленого виведення катехоламінів після введення щурам сукцинату *in vivo* [Maevsky et al., 1982]. Також було встановлено, що сукцинат стимулює діяльність гіпоталамуса, наднирників [Дильман и др., 1976] і мозку (рис. 16.5).

Забезпечення мітохондрій субстратами окиснення є критично важливим процесом для підтримання необхідного рівня синтезу АТФ. З іншого боку, транспортування дво- і трикарбонових субстратів циклу Кребса крізь плазматичну мембрану, поряд із транспортом глюкози й амінокислот, є важливим

механізмом посилення катаболічних процесів у мітохондріях. Дослідження останніх років прояснили механізми транспортування субстратів, зокрема, α -кетоглутарату і сукцинату, крізь плазматичну мембрану клітин. Було встановлено, що перенесення дикарбоксилатних субстратів циклу Кребса, зокрема, для сукцинату й α -кетоглутарату, здійснюється переважно натрійдикарбоксилатними котранспортерами (NaDC) низької та високої спорідненості до субстрату [Pajor, 1999]. Встановлено, що сукцинат крізь плазматичну мембрану переносить транспортер NaDC-1 з K_m 0,9 мМ у щітковій облямівці кишечника кролів, проксимальних трубочках нирок і тонкому кишечнику людини [Fogg et al., 2012; Modica-Napolitano, Singh, 2004]. Котранспортер NaDC-3 виявлено в нирках, печінці, тонкій кишці та серці. Зокрема, встановлено високу спорідненість NaDC-3 (K_m 4 мкМ) до сукцинату і блокування цього транспорту 2,3-диметилсукцинатом [Oshiro, Pajor, 2005]. У печінці є також натрійнезалежні транспортні системи для α -кетоглутарату і малату [Chen et al., 1998; Srisawang et al., 2007].

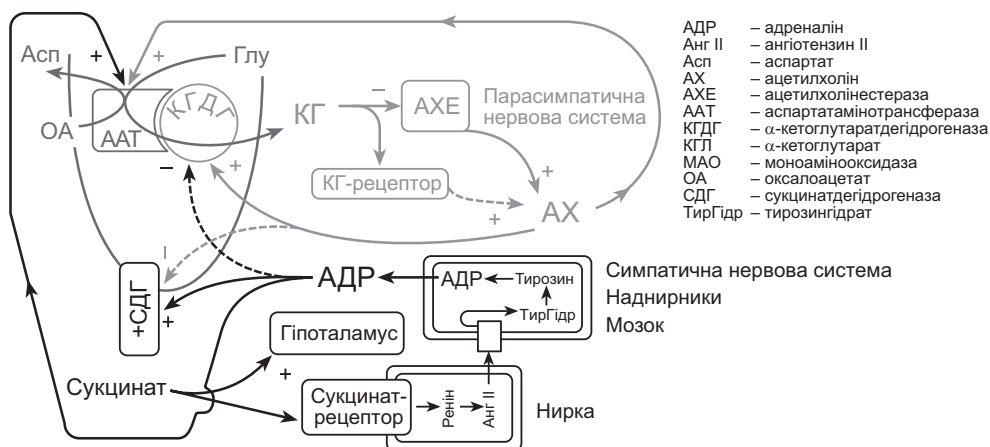


Рис. 16.5. Субстратно-гормональні системи взаєморегуляції симпатичної та парасимпатичної нервових систем [Кондрашова и др., 2003; Kondrashova et al., 2005]

Реципрокні субстратно-гормональні системи сукцинат–адреналін і α -кетоглутарат–ацетилхолін взаємодоповнюють одна одну в регулюванні фізіологічних процесів, пов'язаних відповідно з катаболічними чи анаболічними реакціями.

Проф. М. М. Кондрашова вважає, що реципрокні сигнали від симпатичного та парасимпатичного відділу вегетативної нервової системи змінюються у часових мікроінтервалах. Відповідно окислення сукцинату й α -кетоглутарату, активоване адреналіном і ацетилхоліном, також може змінюватись у часі. Взаємодія цих субстратів і гормонів утворює два цикли, кожен із яких складається як мінімум з чотирьох інтервалів: 1–4 для адреналіну, I–IV для ацетилхоліну (рис. 16.6). **Адреналіновий цикл** починається зі зростання рівня гормону адреналіну (АДР), активації сукцинатдегідрогенази (СДГ) і аспаратамінотрансферази (ААТ), що

супроводжується реципрокним інгібуванням α -кетоглутаратдегідрогенази (КГДГ), активацією моноамінооксидази (МАО) та зниженням рівня адреналіну. Відповідно рівень сукцинату (СКЦ) знижується, а α -кетоглутарату (КГЛ) зростає, що зумовлює зростання рівня ацетилхоліну (АЦХ) і започатковує **ацетилхоліновий цикл**, для початкових етапів якого характерна активація α -кетоглутаратдегідрогенази, аспартатамінотрансферази й інгібування сукцинатдегідрогенази. Після цього спостерігають активацію ацетилхолінестерази (АСХЕ) і зменшення рівня ацетилхоліну, що призводить до зменшення окиснення α -кетоглутарату, зростання окислення сукцинату, зростання рівня адреналіну та запуску адреналінового циклу. Почергова активація окислення сукцинату й α -кетоглутарату може викликати коливання циклу Кребса *in vivo*, яке нагадує скорочення серця, регульоване адреналіном і ацетилхоліном (“heart – beating” of mitochondria). У 2003 р. Мак-Дональд та ін. опублікували перше експериментальне підтвердження коливання рівня субстратів циклу [MacDonald et al., 2003].

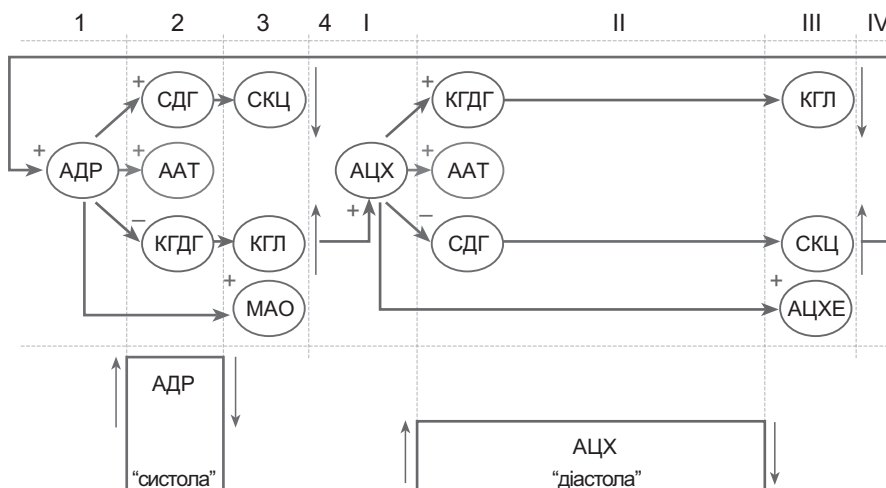


Рис. 16.6. Субстратно-гормональні системи регуляції у відносних часових інтервалах [Кондрашова и др., 2003; Kondrashova et al., 2005]

Підсумки 16. БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ОСНОВИ СЕКРЕТОРНИХ І НЕЙРОГУМОРАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

- У β -клітинах підшлункової залози у відповідь на підвищення рівня глюкози інтенсифікується гліколіз, що спричиняє посилення мітохондріального окиснення. Причому підвищення рівня окисного фосфорилювання у мітохондріях не пригнічує, а інтенсифікує гліколіз.

- K_{ATP} -канал плазматичної мембрани β -клітин інгібується АТФ і активується АДФ, тому підвищення рівня АТФ зумовлює сповільнення надходження іонів K^+ у клітину, деполяризацію мембрани, активацію потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів, і таким чином запускається екзоцитоз інсуліну.
- Парієтальні клітини шлунка використовують глікоген на потреби секреції хлоридної кислоти у цАМФ-залежному процесі, який супроводжується утворенням пірувату, ацетил-КоА та відновленого НАДН, останній із яких клітини використовують у генеруванні протона для синтезу HCl.
- Нейрони мозку як джерело енергії за нормального харчування використовують глюкозу, а за тривалого голодування – кетонів тіла.
- Реципрокні субстратно-гормональні системи сукцинат–катехоламіни й α -кетоглутарат–ацетилхолін взаємодоповнюють одна одну у регулюванні фізіологічних процесів, для яких характерним є активування симпатичної та парасимпатичної нервових систем.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- Різниця між метаболічними процесами у м'язах і печінці у стресовій ситуації.**
Коли треба прийняти рішення “боротися чи втікати”, у кров вивільняється адреналін, який прискорює розщеплення глікогену в печінці, серці та скелетних м'язах. Кінцевим продуктом глікогенолізу в печінці є глюкоза, а у м'язах – піруват.
А) Чому продукти розщеплення глікогену в цих тканинах різні?
Б) Які переваги у стресових ситуаціях дає наявність різних шляхів розщеплення глікогену?
- Згідно з теорією субстратно-гормональних систем, адреналін вибірково активізує окиснення цього субстрату:**
 - 1) сукцинату;
 - 2) α -кетоглутарату;
 - 3) пірувату;
 - 4) глюкози.
- Згідно з теорією субстратно-гормональних систем, ацетилхолін вибірково активізує окиснення цього субстрату:**
 - 1) сукцинату;
 - 2) α -кетоглутарату;
 - 3) оксалоацетату;
 - 4) глюкози.
- Зазначте основні положення теорії субстратно-гормональних систем:**
 - 1) адреналін вибірково стимулює окиснення сукцинату й інгібує окиснення α -кетоглутарату;

- 2) ацетилхолін вибірково стимулює окиснення α -кетоглутарату й інгібує окиснення сукцинату;
 - 3) сукцинат і α -кетоглутарат *in vivo* стимулюють утворення адреналіну й ацетилхоліну відповідно;
 - 4) сигнальна дія мікромольних доз сукцинату й α -кетоглутарату *in vivo* реалізується через специфічні рецептори цих субстратів.
- 5. Виберіть ефекти α -кетоглутарату *in vivo*, які підтверджують реципрокні взаємозв'язки метаболітів субстратно-гормональних систем.**
- 1) збільшує рівень ацетилхоліну в тканинах;
 - 2) знижує активність ацетилхолінестерази;
 - 3) зменшує рівень адреналоподібних речовин;
 - 4) збільшує рівень адреналіну в тканинах.
- 6. Ефект адреналіну на окиснення сукцинату в мітохондріях опосередкований:**
- 1) цАМФ;
 - 2) аденілатциклазою;
 - 3) цГМФ;
 - 4) гіперполяризацією мембрани.
- 7. Виберіть ефекти сукцинату *in vivo*, які підтверджують ідеї теорії субстратно-гормональних систем:**
- 1) збільшує рівень ацетилхоліну в тканинах;
 - 2) збільшує рівень адреналіну в тканинах;
 - 3) активізує дихання ізольованих мітохондрій за окиснення сукцинату;
 - 4) інгібує дихання ізольованих мітохондрій за окиснення НАД-залежних субстратів.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Бабский А.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий // *Фізіол. журн.* – 1985. – Т. 31. – С. 301–306.
- Дильман В.М., Анисимов В.Н., Кондрашова М.Н. Влияние янтарной, глутаминовой кислот, диметрала и пропранолола на чувствительность гипоталамо-гонадотропной системы старых крыс к тормозящему действию эстрогенов // *Терапевтическое действие янтарной кислоты*. Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1976. – С. 208–214.
- Долиба Н.М., Кургалюк Н.Н., Локаль А. и др. Реципрокное к сукцинату и катехоламинам влияние α -кетоглутарата и ацетилхолина на окисление субстратов и нейрогуморальный статус организма // *Янтарная (сукцинат) кислота в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве*. – Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1997. – С. 21–27.
- Долиба М.М., Кургалюк Н.М., Музика Ф.В. та ін. Синергізм дії α -кетоглутарату і ацетилхоліну на енергетичний обмін в мітохондріях // *Фізіол. журн.* – 1993. – Т. 39, № 5–6. – С. 65–70.
- Ивашкин В.Т. Метаболическая организация функций желудка. – Ленинград: Наука, 1981. – 213 с.
- Кондрашова М.Н., Федотчева Н.И., Саакян И.Р. и др. Субстратно-гормональная система регуляции физиологического состояния. Условия ее выявления. Использование в практике // *Горизонты биофизики*. Пушино: ОНТИ НЦБИ, 2003. – С. 147–154.

- Покровский А.А., Гаппаров М.М., Левин Л.Г. О роли сукцината в энергообеспечении секреции соляной кислоты в слизистой желудка // Физиол. журн. СССР. – 1973. – Т. 59, № 10. – С. 1567–1573.
- Шостаковская И.В., Бабский А.М. Влияние адреналина на транспорт кальция и окислительное фосфорилирование в митохондриях // Укр. биохим. журн. – 1984. – Т. 54, № 1. – С. 57–62.
- Шостаковская И.В., Долиба Н.М., Бабский А.М., Кондрашова М.Н. Активация ацетилхолином окисления α -кетоглутарата в митохондриях печени // Укр. біохім. журн. – 1986. – Т. 58, № 6. – С. 54–61.
- Шостаковська І.В., Кургалюк Н.М., Бергтраум Д.І., Долиба М.М. Ефект парантерального введення α -кетоглутарату на резистентність до іонізуючої радіації та холінергічну систему шурів // Фізіол. журн. – 1999. – Т. 45. – С. 119–126.
- Affourtit Ch., Brand M.D. On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. – 2008. – Vol. 1777, Is. 7–8. – P. 973–979.
- Doliba N.M., Liu Q., Li C. et al. Accumulation of 3-hydroxytetradecenoic acid: Cause or corollary of glucolipotoxic impairment of pancreatic β -cell bioenergetics? // Mol. Metab. – 2015. – Vol. 4, N12. – P. 926–939.
- Chen X.Z., Shayakul C., Berger U.V. et al. Characterization of a rat Na^+ -dicarboxylate cotransporter // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 20972–20981.
- Dogan M.D., Sumners C., Broxsen C.S. et al. Central angiotensin II increases biosynthesis of tyrosine hydroxylase in the rat adrenal medulla // Bioch. Bioph. Res. Comm. – 2004. – Vol. 313. – P. 623–626.
- Fogg V.C., Lanning N.J., Mackeigan J.P. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death // Chin. J. Cancer. – 2012. – Vol. 30, N 8. – P. 526–539.
- He W., Miao F., Lin D. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors // Nature. – 2004. – Vol. 429. – P. 188–193.
- Jezova M., Armando I., Bregonzio C. et al. Angiotensin II AT1 and AT2 receptors contribute to maintain basal adrenomedullary norepinephrine synthesis and tyrosine hydroxylase transcription // Endocrinol. – 2005. – Vol. 144. – P. 2092–2101.
- Jitrapakdee S., Wutthisathapornchai A., Wallace J.C., MacDonald M.J. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling // Diabetol. – 2010. – Vol. 53, N 6. – P. 1019–1132.
- Kondrashova M., Doliba N. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 243, N 2. – P. 153–155.
- Kondrashova M.N., Grigorenko E.V. Transaminase generated succinate and ADP stimulated respiration. In: Molecular Organisation of Biological Structures. – Moscow, 1989. – Vol. 1. – P. 19.
- Kondrashova M.N., Maevsky E.I., Grigorenko E.V. et al. The interaction of Krebs cycle with sympathetic and parasympathetic nervous system. Substrate-hormonal system // Intern. Conf. on Mitoch., from Mol. Insight to Physiol. and Pathol. 40 Years of Bari Meetings. Dedicated to Ernesto Quagliariello. Bari, Italy. – 2005. – P. 74.
- MacDonald M.J., Fahien L.A., Buss J.D. et al. Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 51. – P. 51894–51900.
- Maechler P., Li N., Casimir M. et al. Role of mitochondria in beta-cell function and dysfunction // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – Vol. 654. – P. 193–216.

- Maevsky E.I., Guzar I.B., Rosenfeld A.S., Kondrashova M.N.* Doesn't succinic acid mediate adrenaline stimulation in mitochondria? // 3rd EBEC Reports. – Lyon: LBTM-CNRS. – 1982. – Vol. 2. – P. 537.
- Modica-Napolitano J.S., Singh K.K.* Mitochondrial dysfunction in cancer // *Mitochondrion*. – 2004. – Vol. 4, N 5–6. – P. 755–762.
- Oshiro N., Pajor A.M.* Functional characterization of high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 289, N 5. – P. C1159–1168.
- Pajor A.M.* Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates // *Annu Rev Physiol.* – 1999. – Vol. 61. – P. 663–682.
- Rustin P., Munnich A., Rotig A.* Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme // *Eur. J. Human Genetic.* – 2002. – Vol. 158, N 10. – P. 289–291.
- Srisawang P., Chatsudthipong A., Chatsudthipong V.* Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* – 2007. – Vol. 1768, N 6. – P. 1378–1388.

МІТОХОНДРІАЛЬНІ ХВОРОБИ

- Спадкові мітохондріальні хвороби
- Порушення біоенергетичних процесів і їхня роль у розвитку інших захворювань
 - Рак
 - Пошкодження серця за ішемії/реперфузії
 - Цукровий діабет
 - Інсульт і глутаматна токсичність

Мітохондрії відіграють визначальну роль у постачанні більшості клітин еукаріот енергією, у формуванні трансмембранних іонних градієнтів і регуляції пероксидних процесів, а відтак – і в енергетичному забезпеченні фізіологічних функцій. Тому будь-які порушення в їхньому функціонуванні – як генетично детерміновані, так і набуті – спричинюють розвиток тих чи інших патологічних станів організму, про що свідчать численні клінічні й експериментальні дані. Наприкінці ХХ ст. сформувався новий напрям у біомедицині – мітохондріальні хвороби. У цьому розділі будуть розглянуті приклади і спадкових мітохондріальних захворювань, і хвороб, зумовлених порушенням біоенергетичних процесів, однак генетично не детермінованих.

17.1. СПАДКОВІ МІТОХОНДРІАЛЬНІ ХВОРОБИ

Найчастіше мітохондріальними хворобами називають власне спадкові захворювання, для яких характерні зміни структури та функцій мітохондрій, що призводять до патологій багатьох органів. Кількість таких патологій останнім часом зростає. Найбільш небезпечними є порушення у генах, що кодують білки дихального ланцюга мітохондрій. На 5–10 тисяч новонароджених є принаймні один випадок дисфункції дихального ланцюга.

Ушкодження мтДНК (ДНК мітохондрій) соматичних клітин може відбутися в окремих тканинах чи органах і спричинити патологію цієї структури. Перший випадок мітохондріального захворювання (хвороба Люффа) був описаний у молодій жінки в 1962 р. У 1988 р. було вперше доведено важливу роль мутацій мтДНК у формуванні мітохондріальних хвороб. На сьогодні встановлено, що частота ураження органів спадковими мітохондріальними захворюваннями зменшується в ряду: органи центральної нервової системи → міокард → скелетні м'язи → нирки → ендокринні органи → печінка.

Одночасно в клітині можуть співіснувати нормальний (дикий) і мутантний типи мтДНК. Обидва типи у процесі поділу клітини розподіляються випадково між дочірніми клітинами. Тому в наступних поколіннях частина клітин може мати тільки нормальні мтДНК, частина – тільки мутантні, а частина – обидва типи мтДНК.

У клітині можуть співіснувати нормальний (дикий) і мутантний типи мтДНК. Для мітохондріальних хвороб характерне тільки материнське успадкування: хворобу передають тільки жінки, але хворіють особи обох статей.

Для спадкових мітохондріальних хвороб характерне тільки материнське успадкування (рис. 17.1). Це пояснюється тим, що під час запліднення сперматозоїд втрачає хвіст із мітохондріями, і в яйцеклітину потрапляє тільки ядерна ДНК. Тобто хворобу передають тільки жінки, але хворіють особи обох статей. Отже, мутації мтДНК і стимульовані ними фенотипічні зміни передаються дітям тільки від матері. Мутації генів ядерних хромосом також можуть бути причиною мітохондріальних хвороб. Типи успадкування мітохондріальних захворювань можуть бути рецесивними, домінантними, Х-зчепленими (коли патологічний ген розташований на Х-хромосомі) та материнськими з варіабельною експресією або пенетрантністю¹.

За мітохондріальних хвороб трапляються такі зміни у нуклеїнових кислотах: місенс-мутації², мутації у генах тРНК, делеції³, дуплікації мтДНК, мутації, що знижують число копій мтДНК, і мутації в ядерній ДНК. Дефекти ядерної ДНК зумовлюють переважно порушення транспорту й утилізації субстратів, ферментів циклу Кребса, процесів окисного фосфорилування та дихального ланцюга. Дефекти мтДНК є причиною спорадичних масштабних перебудов, точкових мутацій структурних генів і точкових мутацій генів, що взаємодіють зі структурними генами. Дефекти міжгеномних сигналів зумовлюють аутосомно-домінантні множинні делеції мтДНК і аутосомно-рецесивне пригнічення функції

¹ Кількісний показник фенотипічної мінливості прояву гена. Відображає відношення числа особин, у яких певний ген виявився у фенотипі, до загального числа особин, у генотипі яких цей ген наявний у необхідному для його прояву стані

² Точкова мутація, за якої змінений кодон починає кодувати іншу амінокислоту

³ Структурна мутація, коли вилучається частина хромосоми або послідовність ДНК

мтДНК. Набуті пошкодження мтДНК можуть виникати за дії токсинів (наприклад, 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин), деяких ліків (наприклад, зидовудин) або у процесі старіння.

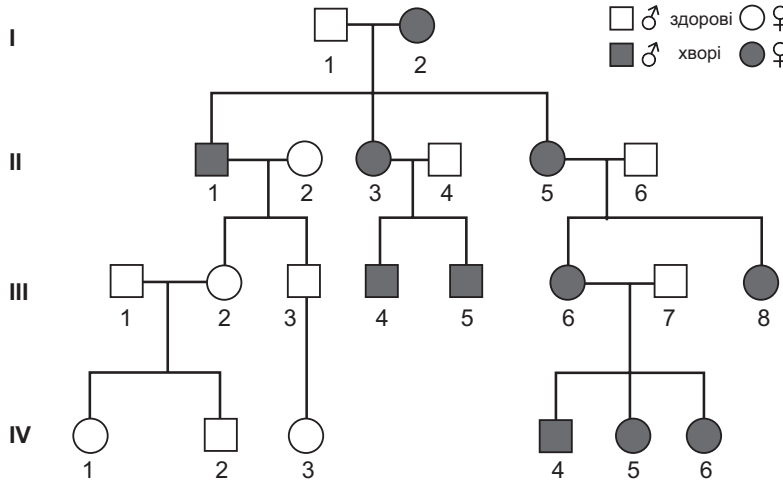


Рис. 17.1. Успадкування мітохондріальних захворювань на прикладі синдрому Лебера (атрофія зорового нерва). Оскільки мітохондрії успадковуються дитиною від матері з цитоплазмною овоцитів, усі діти хворої жінки успадкують захворювання, незалежно від статі дитини. Уражені дівчата, виходячи заміж, будуть народжувати тільки хворих дітей, а у хворих чоловічої статі всі діти будуть здоровими. I–IV – генерація; 1–8 – особи в генераціях

Головними клінічними ознаками мітохондріальних хвороб є міопатії (у т.ч. кардіоміопатії), енцефаломіопатії, втрата зору, пов'язана з пігментним ретинітом чи атрофією зорового нерва, порушення метаболізму пірувату і лактату, ферментів комплексів дихального ланцюга. Діагностика мітохондріальних хвороб включає аналіз параметрів стану метаболізму (визначення органічних кислот, амінокислот і карнітину в крові, сечі та цереброспінальній рідині), біопсію м'язів, їхнє гістохімічне й електронно-мікроскопічне дослідження, дослідження процесів окисного фосфорилування (у свіжих зразках біопсійного матеріалу) і аналіз мтДНК.

Серед спадкових мітохондріальних хвороб, особливо у новонароджених, найбільшу загрозу становлять порушення в генах білків-переносників електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій.

Синдром Кернса–Сейра (Kearns–Sayre syndrome) – це рідкісний варіант мітохондріальної енцефаломіопатії, який проявляється у дитячому та юнацькому віці (до 20 років) поступово наростаючим двобічним опущенням повік і обмеженням рухливості очних яблук (рис. 17.2, А). Цей синдром обумовлений переважно спорадичними делеціями мітохондріальної ДНК. Клітини за синдрому Кернса–Сейра містять нормальний і мутантний типи мітохондріальних геномів.

У мутантному геномі трапляються поодинокі делеції або дуплікації. Найбільше мітохондрій із мутантною мтДНК міститься у тканинах, клітини яких практично не діляться, особливо у скелетних м'язах і мозку. Більшість хворих помирають до 40 років. Виникає атаксія, порушується провідність серця, вражається пігментний епітелій сітківки, розвиваються ретинопатія та приглухуватість. У спинномозковій рідині хворих концентрація білка більша за 1 г/л, а також підвищена концентрація лактату і пірувату. За біопсії м'язів виявляють пошкоджені (рвані) м'язові волокна, позначені стрілками на рис. 17.2, Б. Інколи характерною ознакою є низькорослість, деменція, цукровий діабет і гіпотиреоз.

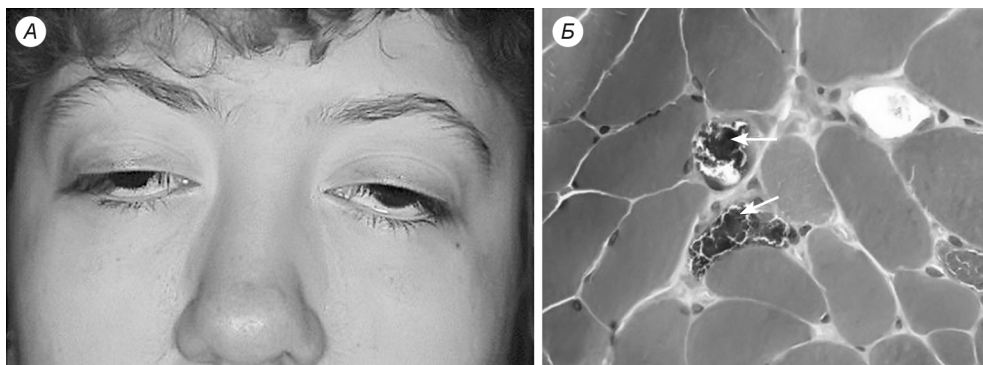


Рис. 17.2. Характерні ознаки для синдрому Кернса–Сейра: А – опущення повік; Б – пошкодження м'язових волокон за фарбування методом Гоморі [Abu-Amero et al., 2009]

Синдром Пірсона – це захворювання, обумовлене делеціями й одиничними розривами мтДНК. Для цього синдрому, що проявляється вже у грудному віці, характерні ураження кісткового мозку з вираженою сидеробластною анемією та вакуолізацією еритроїдних і мієлоїдних попередників, а також ураження екзокринної частини підшлункової залози з подальшим розвитком діареї, затримкою фізичного розвитку, інколи – у поєднанні з інсуліннезалежним цукровим діабетом. Більшість дітей не доживає до 4-річного віку. Характерними ознаками є також портална дилатація, фіброз, холестаз і гепатоцелюлярний гемосидероз¹. У хворих на синдром Пірсона виявлено лактатацидоз, підвищене співвідношення лактат/піруват, комплексна органічна ацидурия, підвищення вмісту фетального гемоглобіну (HbF), збільшення активності аденозиндезамінази, аномалії окисного фосфорилювання та розриви червоних м'язових волокон.

Синдром MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres) – це міоклонічна епілепсія, яка успадковується по материнській лінії. Найчастіше реєструють точкові мутації гена, що кодує лізину тРНК мітохондрій, зокрема, в нуклеотидах 8344 і 8356. Це призводить до зміни конформації тРНК і порушення процесів трансляції. Виявлення цих мутацій у мтДНК лейкоцитів або м'язів використовують у діагностиці та медико-генетичному консультуванні.

¹ Надмірне відкладання гемосидерину – темно-жовтого пігменту, який утворюється внаслідок розпаду гемоглобіну

Хвороба частіше починається в дитинстві чи молодості, а більшість хворих помирають у 30–40 років у стані важкої деменції. Для синдрому характерна підвищена концентрація лактату і пірувату в крові та спинномозковій рідині. У м'язах виявляють розриви волокон. Виявлено недостатність першого, третього та четвертого комплексів дихального ланцюга мітохондрій. До ранніх ознак MERRF належать швидка втомлюваність, біль у гомілкових м'язах, зниження пам'яті й уваги. Пізніші етапи синдрому супроводжуються мітохондріальною міопатією, міоклонією, епілептичними нападами, деменцією, атаксією, приглухуватістю, розладами вібраційної та м'язово-суглобової чутливості. У хворих на MERRF на енцефалограмах спостерігаються генералізовані комплекси “спайк-хвиль”. За допомогою комп'ютерної томографії виявляють атрофію мозку та кальцифікацію базальних гангліїв.

Синдром MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) – це мітохондріальна енцефаломіопатія. Захворювання починається у дитинстві після нормального періоду раннього розвитку та зумовлене точковими мутаціями мтДНК, які у деяких випадках можуть призводити до дефекту першого комплексу дихального ланцюга мітохондрій. У 80–90 % випадків наявна мутація в 3243-му нуклеотиді гена лейцинової тРНК мітохондрій. Мутація найчастіше трапляється у скелетних м'язах, міокарді, нирках, печінці, підшлунковій залозі, мозочку і корі великих півкуль. Хворі зазвичай низькорослі, страждають на повторні інсультподібні ефекти у вигляді геміпарезу¹, геміанопсії² або гемералопії (куряча сліпота). Характерні часте блювання, приглухуватість, лактоацидоз. У частини хворих виникають фокальні або генералізовані напади та міоклонічна епілепсія. В окремих випадках розвиваються деменція і глибока інвалідизація, а хворі нерідко помирають, не досягнувши 20 років. За допомогою комп'ютерної томографії виявляють інфарктні ділянки, переважно у великих півкулях головного мозку, що спричиняє неврологічні симптоми.

Синдром Лебера – це захворювання очей, яке поєднане з неврологічною симптоматикою: периферична полінейропатія, тремор, атаксія, спастичні парези, розумова відсталість, мігреноподібні головні болі. Можна спостерігати кістково-суглобові зміни: кіфоз, кіфосколиоз, арахнодактилія³, спондилоепіфізарна дисплазія⁴. Перебіг хвороби зазвичай прогресуючий, із можливою ремісією через 1–2 роки після початку хвороби. Диференційний діагноз включає ретробульбарний неврит (ураження зорового нерва), лейкоцистозії, оптикохіазмальний арахноенцефаліт⁵ та інші.

На сьогодні відома велика кількість перебудов мітохондріального геному внаслідок більш ніж 100 точкових мутацій мтДНК. До хвороб, які розвиваються

¹ М'язова слабкість половини тіла

² Двобічна сліпота у половині поля зору

³ Патологічне видовження пальців

⁴ Порушення розвитку епіфізарних хрящів

⁵ Запалення павутинної оболонки в ділянці перехресту зорових шляхів з ураженням нервової тканини

через порушення функції окисного фосфорилування, також належать такі поширені захворювання як хвороби Альцгеймера і Паркінсона, гастроінтестинальний рефлюкс, цукровий діабет 2 типу, мітохондріальна міопатія, синдром деменції та хореї, синдром раптової дитячої смерті й інші. Особливістю спадкових мітохондріальних захворювань є те, що вони можуть не проявлятися повністю, оскільки зміни функцій мітохондріального дихання, спричинені мутаціями деяких мтДНК, компенсуються іншими мітохондріями, яких у клітині налічують 100–1000 і кожна з яких містить по 2–19 копій мтДНК. Дефекти дихального ланцюга мітохондрій можуть проявитись у будь-якому віці.

Унаслідок спадкових мітохондріальних хвороб найчастіше вражаються органи центральної нервової системи, міокард і скелетні м'язи. Головними клінічними проявами мітохондріальних хвороб є енцефаломіопатії, кардіоміопатії, атрофія зорового нерва, порушення метаболізму пірувату і лактату, ферментів дихального ланцюга та ін.

Для лікування мітохондріальних захворювань пропонують кетогенну дієту в поєднанні зі сукцинатом. Рекомендують уникати довготривалого голодування та багатої на вуглеводи їжі, тривалих важких фізичних навантажень, підтримувати водно-сольовий баланс, а також виключити препарати, які гальмують енергетичні процеси (барбітурати, препарати вальпроєвої кислоти, хлорамфенікол). Бажано запобігати пероксидному ушкодженню мітохондріальних мембран за допомогою вітамінів С і Е як антиоксидантів. Для підвищення дихальної активності мітохондрій рекомендують споживати кофермент Q_{10} , сукцинат натрію, вітаміни С, K_1 (філоквінон), K_3 (менадіон), ідебенон і L-карнітин.

17.2. ПОРУШЕННЯ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ І ЇХНЯ РОЛЬ У РОЗВИТКУ ІНШИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

17.2.1. Рак

Для ракових клітин характерний неконтрольований ріст, заблокований апоптоз і потужний анаболічний метаболізм. Трансформація клітин у злоякісні запускається активацією онкогенів і пригніченням генів-супресорів, що супроводжується перепрограмуванням метаболізму. У ракових клітинах відбувається ненормальний перерозподіл енергетичного метаболізму між гліколізом і окисним фосфорилуванням (ефект Варбурга) внаслідок порушення взаємодії між раковими супресорами, зокрема, p53, і компонентами, які визначають мітохондріальний шлях розвитку апоптозу.

Розуміння ролі мітохондрій у розвитку новоутворень може сприяти розробці нових підходів до лікування онкологічних хворих і створенню нових терапевтичних протиракових препаратів.

Ефект Варбурґа – це інтенсифікація гліколізу у ракових клітинах навіть за аеробних умов унаслідок надмірної експресії транспортерів глюкози, високої активності ферментів гліколізу, а також лактатдегідрогенази.

Типовими для ракових клітин є активація гліколізу і пригнічення окисного фосфорилування, у результаті чого синтез АТФ розділений приблизно порівну між цими двома способами постачання енергії. Зазвичай у більшості клітин понад 90 % енергії постачається внаслідок окисного фосфорилування. За окислення однієї молекули глюкози у гліколізі утворюється дві молекули АТФ, тоді як у процесі окисного фосфорилування – понад 30 молекул (див. розділи 7 і 12). Отже, раковим клітинам необхідно утилізувати глюкози набагато більше і в десять разів швидше, ніж нормальним тканинам. Це було встановлено методом позитронно-емісійної томографії (ПЕТ) за використання маркера ^{18}F -деоксиглюкози, який акумулюється у пухлинах (див. розділ 18, рис.18.7).

Пухлини зазвичай перебувають в умовах гіпоксії, тому що на початковій стадії розвитку вони не мають розгалуженої мережі капілярів. У подальшому злаякісна трансформація пухлини обов'язково передбачає формування власної капілярної мережі, яка, однак, має невнормовану хаотичну структуру, що знижує швидкість кровообігу, а відтак – постачання ракових клітин киснем і поживними речовинами. Ракові клітини, які перебувають від найближчих капілярів на відстані, більшій ніж 100 чи 200 мкм, отримують АТФ, головню, завдяки гліколізу. Порівняно з нормальними клітинами, вони споживають більшу кількість глюкози, перетворюючи її спочатку на піруват, а потім, використовуючи утворений НАДН, на лактат. Частково підвищення швидкості гліколізу може бути пов'язане також із меншою кількістю мітохондрій у пухлинних клітинах. Чим менше АТФ утворюється у процесі окисного фосфорилування в мітохондріях, тим більша потреба клітини в АТФ, що синтезується у процесі гліколізу.

Ще одним поясненням ефекту Варбурґа може бути надмірна експресія транспортерів глюкози та висока активність ферментів гліколізу, зокрема, гексокінази, фосфофруктокінази, піруваткінази, а також лактатдегідрогенази. Гексокіназа II, яка зв'язана з цитозольним боком внутрішньої мітохондріальної мембрани, є нечутливою до оборотного пригнічення глюкозо-6-фосфатом. Цей фермент може монополізувати синтезований у мітохондріях АТФ, використовуючи його для перетворення глюкози на глюкозо-6-фосфат і змушуючи клітину безперервно здійснювати його гліколітичне перетворення. З іншого боку, обмеження мітохондріального метаболізму в ракових клітинах може бути спричинене інгібуванням піруватдегідрогенази через надмірну експресію кінази піруватдегідрогенази фактором HIF-1 α , прямим впливом на активність транспорту електронів та інгібуванням потенціалзалежних аніонних каналів (VDAC), що обмежує транспорт між матриксом мітохондрій і цитоплазмою.

Багато ракових клітин можуть рости за наявності “негліколітичних” субстратів (зокрема, галактози з глутаміном) чи за низьких концентрацій глюкози, завдяки окисному фосфорилуванню. Однак якщо концентрація глюкози зростає,

клітини знову “перемикаються” на гліколітичний шлях. Таке оборотне перемикавання катаболізму на гліколіз за збільшення концентрації глюкози в середовищі спочатку було описано у дріжджів і названо ефектом Кребтрі. Його спостерігають уже за концентрації глюкози 5 мМ.

Синтез гліколітичних ферментів у пухлинних клітинах контролюють білки – продукти онкогенів і генів-супресорів, наприклад, *RAS* і *TP53*. Разом із відповідними транскрипційними факторами *TP53* першочергово контролює експресію численних генів, які регулюють клітинний цикл. У нормальних клітинах короткотермінове виснаження рівня глюкози слугує сигналом до інгібування клітинного поділу. Цей сигнал опосередкований через АМФ-залежну кіназу, яка фосфорилує і активує p53. Крім того, p53 запобігає ефекту Варбурга, стимулюючи *TP52*-активований регулятор гліколізу й апоптозу (TIGAR), що призводить до часткового інгібування фосфофруктокінази, а відтак і гліколізу, з подальшою активацією пентозофосфатного шляху, в результаті якого зростає відновлення цитоплазматичного НАДФН⁺ і опірність до оксидативного стресу. Ген-супресор *TP53* сприяє експресії білків дихального комплексу IV через фактор “синтезу цитохром c оксидази 2” (SCO2). У ракових клітинах із пошкодженням p53 обмеження гліколізу немає і експресія білків комплексу IV зменшена.

Мітохондрії залучені у процес неоплазії клітини, коли на тлі ефекту Варбурга ракові супресори (зокрема, *TP53*) втрачають контроль над мітохондріальним шляхом апоптозу.

Білок p53 має здатність індукувати апоптоз, переміщуючись до мітохондрій у відповідь на пошкодження ядерної ДНК, онкогенну дерегуляцію чи загальне оксидативне пошкодження. За асоціації із зовнішньою мембраною мітохондрій p53 може взаємодіяти з про- і антиапоптичними білками родини Bcl-2, зумовлюючи пермеабілізацію мембрани і вивільнення цитохрому c. Він також активує низку ферментів-каспаз (наприклад, прокаспаз 3 і 9), формування апоптосом і проапоптичні білки (Бах, Bid та інші) (рис. 17.3). Крім того, білок p53 інгібує антиапоптичні білки Bcl-2, Bcl-X та інші. У ракових клітинах з дефективним *TP53* проапоптичних запобіжних механізмів часто немає.

Ще одним функціональним механізмом, який пов’язаний з енергетичними процесами у клітинах і змінюється за неоплазії, є метаболічний шлях PI_3K – AKT_1 –mTOR (рис. 17.4). Протеїнкіназа B (AKT_1) активує гліколіз різноманітними способами і також опосередковано активує серин/треонінову протеїнкіназу (mTOR), яка натомість стимулює ліпідний і білковий біосинтез для росту клітин разом із підвищенням стабільності транскрипційного фактора HIF-1 α . HIF-1 α відіграє важливу роль в адаптації до гіпоксії, посилюючи гліколіз (див. розділ 16). Постійна деградація цього фактора у результаті послідовної дії пролілігдроксилази й убіквітинлігази може бути порушена у ракових клітинах через мутації білків VHL і також через мутації ферментів циклу Кребса, зокрема, сукцинатдегідрогенази і фумаратгідратази. Це спричиняє акумулювання сукцинату, який, у свою чергу, може інгібувати α -кетоглутаратзалежну пролілігдроксилазу (див. розділ 15).

Також HIF-1 α активує кіназу піруватдегідрогенази і таким чином інгібує піруватдегідрогеназу. Отже, ефекти HIF-1 α у пухлинах спряжені з активацією гліколізу й інгібуванням дихального ланцюга мітохондрій.

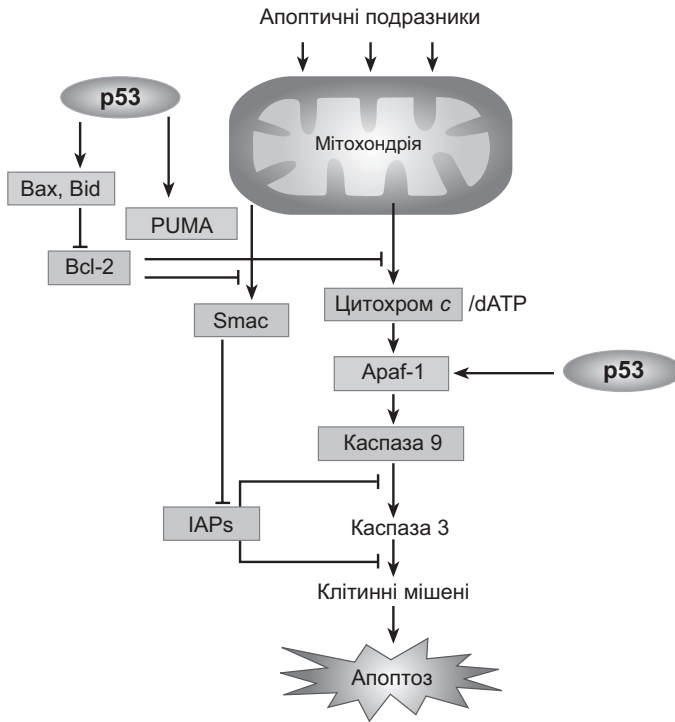


Рис. 17.3. Залежні від p53 апоптичні механізми: Араф-1 – основний компонент апоптосом; IAPs – інгібітори каспаз; Smac – інгібітор IAPs. Інші пояснення див. у тексті

Фактор транскрипції с-Мус, який кодується онкогеном MYC, взаємодіє із HIF-1 α , зумовлюючи зростання експресії гліколітичних ферментів. Це також стимулює метаболізм мітохондріального глутаміну, який може бути важливим анаплеротичним фактором для постачання як субстратів у цикл Кребса, так і амінокислот для синтезу білків у пухлинах. Цікаво, що в деяких пухлинах зареєстрована експресія мutowаних форм мітохондріальної чи цитоплазматичної НАДФ-специфічної ізоцитратдегідрогенази, що каталізує реакцію відновлення α -кетоглутарату до 2-гідроксиглутарату, акумуляція якого стимулює ріст пухлини.

Багато протипухлинних препаратів активують мітохондріальний шлях клітинного апоптозу – або через активацію пори транзйентної проникності зовнішньої мембрани мітохондрій, або через інгібування антиапоптичних білків, зокрема, родини Bcl-2. Висока залежність ракових клітин від гліколізу зумовлює те, що препарати, які діятимуть на гліколітичний процес, матимуть селективну токсичність для ракових клітин. Таким перспективним препаратом, зокрема, є алкілюючий агент 3-бромопіруват, який інгібує у тваринних моделях швидкоростучих пухлин активність ферментів гліколізу – гексокінази II і гліцеральдегідфосфатдегідрогенази.

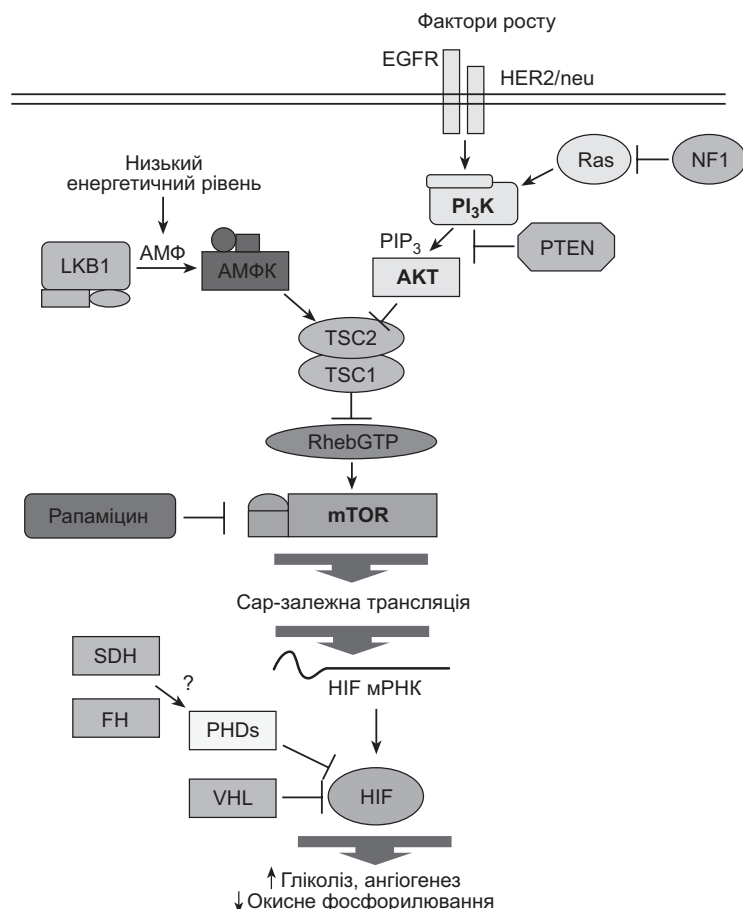


Рис. 17.4. Сигнальні механізми, що активуються факторами росту в пухлинах: EGFR – рецептор епідермального фактора росту; HER2/neu – рецептор людського епідермального фактора росту; Ras – малі ГТФ-ази, overекспресія яких зумовлює рак; PI₃K – фосфатидилінозитол-3-кіназа; NF-1 – нейрофібрин; PTEN – ген гомолога фосфатази і тензину (блокує клітинний цикл на стадії G1); TSC2(1) – туберин (гамартин); RhebGTP – ГТФ-зв'язуючий білок, гомолог Ras; Rapamycin – імунодепресант, який запобігає активації Т і В клітин; SDH – сукцинатдегідрогеназа; FH – фумаратгідратаза; PHDs – метаболічні сенсори пролілгідроксилаз; VHL – білок фон Гіппеля–Ліндау (von Hippel–Lindau). Інші пояснення в тексті та у статті [Shaw, 2006]

17.2.2. Мітохондрії та пошкодження серця за ішемії та реперфузії

За зростання навантаження об'єм крові, що перекачується серцем, може зрости з 5 до 30 л за хв. Тому робота серця повсякчас залежить від здатності мітохондрій кардіоміоцитів відповідати на його енергетичні потреби. Ca²⁺-залежна сигналізація мітохондрій опосередковує цей процес без суттєвого зменшення мембранного потенціалу ($\Delta\psi$) до тих пір, доки наявний нормальний

коронарний кровоплин. Однак якщо він сповільнюється, наприклад, за розвитку інфаркту міокарда, то розвивається низка патологічних процесів, у яких мітохондрії відіграють визначальну роль. Методи ^{31}P -ЯМР-спектроскопії та НАД(Ф)Н-флюороскопії дали змогу встановити, що в ізольованому перфузованому серці розвиваються компенсаторні механізми, що мінімізують зміни $\Delta\psi$ чи $\Delta\mu\text{H}^+$ за інтенсивної роботи серця. Одним із таких механізмів може бути зростання активності креатинкінази, яка здатна стабілізувати мембранний потенціал мітохондрій за різкого підвищення активності серця, але впродовж короткого періоду.

Інфаркт міокарда найчастіше виникає через блокування коронарних артерій, які постачають лівий шлуночок кров'ю, унаслідок чого виникає ішемічна зона. Гліколіз не може повноцінно компенсувати порушення окисного фосфорилування, оскільки закислення (ацидифікація) цитозолу, що виникає через продукцію лактату, інгібує фосфофруктокіназу. Зменшення продукції АТФ пригнічує активність Na^+/K^+ - і Ca^{2+} -помп, плазматична мембрана деполаризується, а цитозольна концентрація Ca^{2+} зростає. Виснаження внутрішньоклітинного пулу аденінових нуклеотидів призводить до окислення ксантиноксидазою ксантину, який може бути джерелом утворення супероксиду навіть за дуже низького рівня кисню. За високої цитозольної концентрації Ca^{2+} , низького рівня АТФ і за окислативного стресу мітохондріальна пора транзійентної проникності не активується протягом ішемічного періоду внаслідок, можливо, закислення цитозолу.

Щоб запобігти некрозові, важливо якнайшвидше відновити кровообіг. Однак сама реперфузія зумовлює пошкодження ("травми реперфузії"), пов'язані з мітохондріальною порою транзійентної проникності (рис. 17.5). Парадоксально, але відновлення постачання кисню до кардіоміоцитів збігається з поверненням до нейтрального рН, поглинанням Ca^{2+} мітохондріями з цитозолу, подальшою активацією утворення активних форм кисню. Саме радикали кисню найбільш ушкоджують кардіоміоцити. Усе це разом сприяє відкриванню пори транзійентної проникності мітохондрій. Докази того, що вона активується протягом реперфузії, отримано на моделі перфузованого серця за використання $[^3\text{H}]$ -деоксиглюкози, яка фосфорилується у цитоплазмі до деоксиглюкозо-6-фосфату.

За інфаркту міокарда гліколіз не може адекватно компенсувати порушення окисного фосфорилування, оскільки внаслідок утворення лактату внутрішньоклітинний вміст закислюється. Відновлення нормального кровопостачання (реперфузія) часто призводить до пошкоджень міокарда, що пов'язано з неконтрольованим відкриванням пори транзійентної проникності крізь мітохондріальну мембрану та з генерацією активних форм кисню.

Два можливих механізми пошкодження клітин серця (апоптоз і некроз) за розвитку інфаркту міокарда наведено на рис. 17.5. Встановлено, що на периферії інфарктної ділянки переважно розміщені апоптичні кардіоміоцити, а в її середині – некротичні кардіоміоцити.

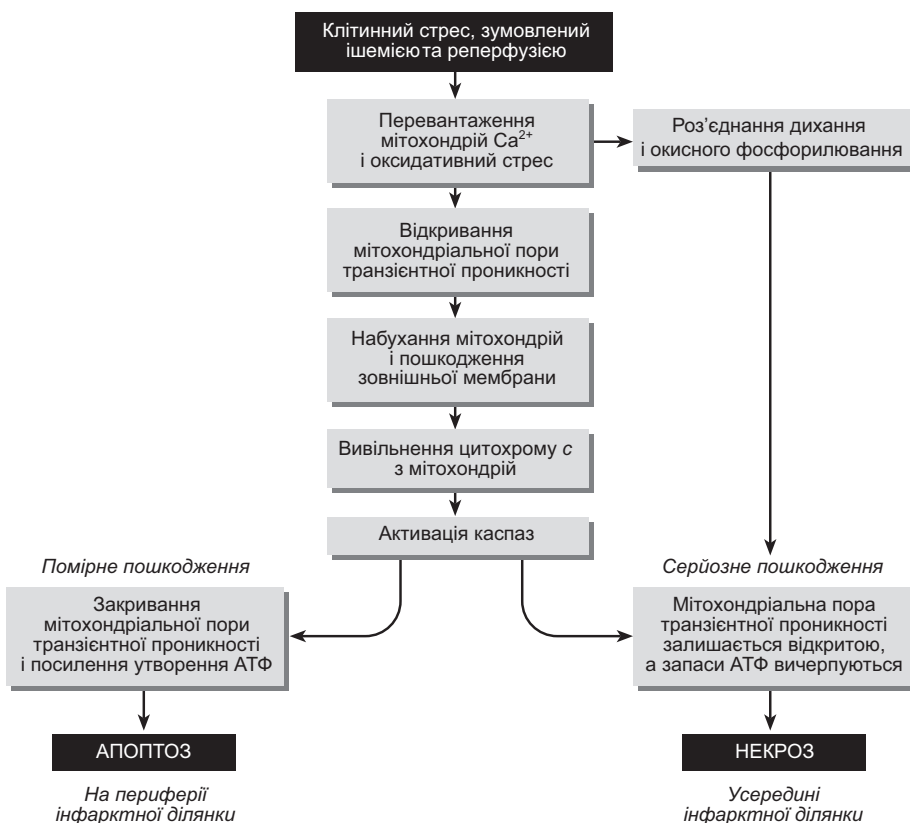


Рис. 17.5. Послідовні функціональні зміни у мітохондріях серцевого м'яза впродовж ішемії та реперфузії [Halestrap, 2006]

Короткі гіпоксійні сеанси (приблизно 5-хвилинні зупинки перфузії ізольованого серця за О. Лангендорфом) можуть запобігти післяішемійному пошкодженню. Принаймні механічні показники роботи серця (частота скорочення, внутрішньосерцевий тиск або швидкість “кровоплину”) достовірно відновлюються швидше і повніше (рис.17.6). Механізм так званого “ischemic preconditioning”

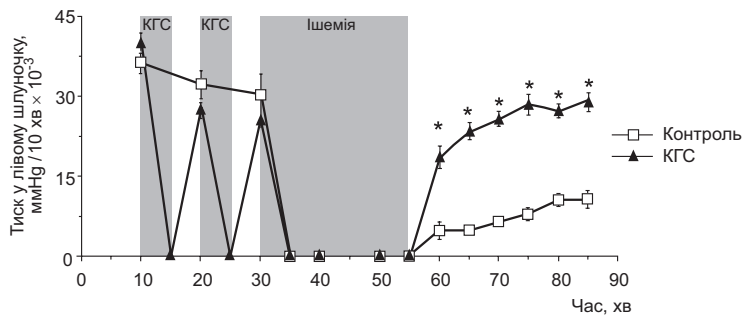


Рис. 17.6. Зміни тиску в лівому шлуночку серця щура, перфузованого за О. Лангендорфом, за впливу ішемії (25 хв) і двох коротких (по 5 хв) гіпоксійних сеансів (КГС). * – $P < 0,05$ vs. Контроль [Crestanello et al., 2002]

усе ще дискутується, але він може включати інтенсифікацію захисту проти оксидативного стресу, активацію АМФ-залежної кіннази, протекторний ефект HIF-1 α (див. розділ 16), зменшення закислення цитозолу, запобігання надмірному нагромадженню іонів Na⁺ клітинами [Babsky et al., 2011] чи іонів Ca²⁺ мітохондріями [Crestanello et al., 2002]. Припускають, що у ролі кардіопротекторів можуть бути активатори АТФ-залежних K⁺-каналів, які відкриваються у відповідь на зниження цитозольного рівня АТФ, зумовленого короткими гіпоксійними сеансами [Crestanello et al., 2000]. Варто зазначити, що це може призводити до набухання мітохондріального матриксу. До відкривання цих каналів можуть мати стосунок і активні форми кисню, що встановлено, однак, тільки за умов *in vitro*. Яким чином набухання мітохондрій може бути причетне до кардіопротекторних ефектів, ще досі не з'ясовано.

17.2.3. Мітохондрії, β -клітини і діабет

Цукровий діабет 1-го типу зазвичай пов'язаний із аутоімунним пошкодженням у цьому разі β -клітин підшлункової залози і становить від 5 до 10 % усіх випадків діабету. Хворі зазвичай потребують регулярних ін'єкцій інсуліну.

Для цукрового діабету 2-го типу характерним є високий рівень глюкози у крові в комбінації з інсуліновою резистентністю, зокрема, м'язів і жирової тканини та вторинним зниженням секреції інсуліну β -клітинами. На сьогодні орієнтовно у 3 % населення України діагностовано цукровий діабет. Більшість випадків цукрового діабету 2-го типу раніше вважали спорадичними і зумовленими в першу чергу ожирінням. Фізичні вправи та дієтичне харчування є методом лікування на початкових стадіях захворювання. Але доведено, що генетичні мутації відіграють визначальну роль серед чинників ризику разом зі способом життя людини. Цукровий діабет 2-го типу значно підвищує ризик виникнення серцево-судинних захворювань, інсульту, сліпоти, ниркової недостатності й розвитку трофічних виразок нижніх кінцівок.

Для діабету 2-го типу характерною, особливо на початкових етапах, є **інсуліно-резистентність** – недостатня біологічна відповідь клітин на дію інсуліну за його достатньої концентрації у крові. Доки β -клітини підшлункової залози здатні виробляти необхідну кількість інсуліну для компенсації наслідків інсулінорезистентності й підтримувати стан гіперінсулінемії, доти у крові не буде гіперглікемії. Однак услід за виснаженням резервів β -клітин виникає стан відносної недостатності інсуліну, що проявляється підвищенням рівня глюкози та ліпідів у крові, або **глюколіпотоксичністю**. Натомість міоцити й адипоцити не отримують достатньої кількості глюкози, а в гепатоцитах суттєвих змін зазнають вуглеводневий, ліпідний і білковий обміни. Хронічно підвищений рівень циркулюючих глюкози та жирних кислот сприяє дисфункції і β -клітин. АТФ-залежна секреція інсуліну знижується за тривалої дії на β -клітини підвищених концентрацій жирних кислот навіть без їхньої “роз’єднуючої” дії на мітохондрії [Ravnskaer et al., 2005].

Усі ознаки діабету 2-го типу проявляються тільки тоді, коли β -клітини більше не в змозі підтримувати гіперсекрецію інсуліну, незважаючи на початкове збільшення кількості β -клітин і підвищення експресії гена синтезу інсуліну.

Відомо, що саме мітохондрії відіграють провідну роль у фізіологічному механізмі секреції інсуліну β -клітинами (див. розділ 17) [Szendroedi et al., 2012; Supale et al., 2012]. З іншого боку, зміни рівня інсуліну призводять до порушення процесів дихання й окисного фосфорилування в мітохондріях інших тканин. Зокрема, в печінці за дефіциту інсуліну та високого рівня глюкози у крові спостерігають нагромадження ліпідів. Жирні кислоти можуть зумовлювати дефекти інсулінстимульованого транспорту глюкози у скелетних м'язах, оскільки знижують фосфорилування рецептора інсуліну безпосередньо через первинну мішень – субстрат інсулінового рецептора (IRS-1; рис. 17.7). Ці зміни корелюють із внутрішньом'язовим вмістом триацилгліцеролів і вільних жирних кислот у плазмі крові. Сильна кореляція була виявлена також між резистентністю до інсуліну та кількістю вісцерального жиру. Жирові депо не тільки зберігають і вивільняють жирні кислоти, але також є джерелом таких гормонів як лептин, резистин і адипонектин, що впливають на енергетичний обмін.

Детальніше про роль ліпідів і жирних кислот за розвитку діабету див. огляд Миколи Доліби у монографії Metabolic Sundrome [Doliba, 2016].

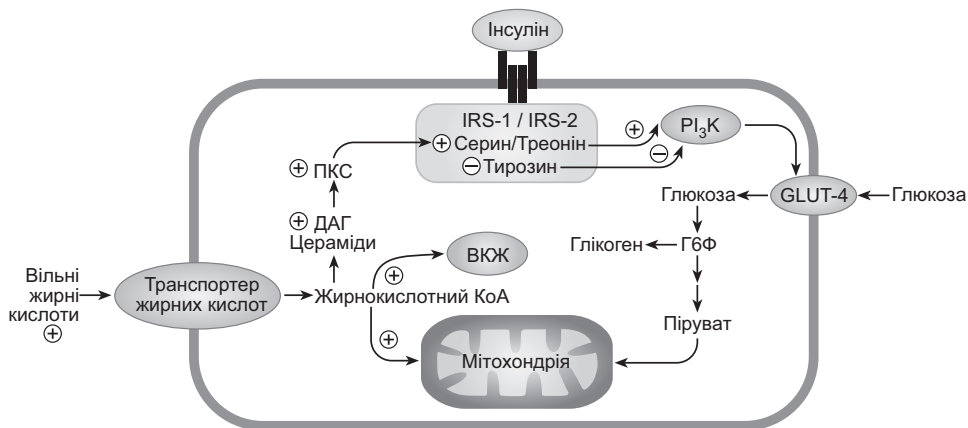


Рис. 17.7. Вплив жирних кислот на інсулінстимульований транспорт глюкози у м'язах [Shulman, 2000]: ВКЖ – внутрішньоклітинні жири; ДАГ – діацилгліцерол; PKC – протеїнкіназа c

У скелетних м'язах хворих на цукровий діабет 2-го типу виявлено пошкодження мітохондріального біогенезу, що призводить до зниження інтенсивності мітохондріального синтезу АТФ разом зі суттєвим зростанням вмісту триацилгліцеролів. На думку М. Івабу та співавт. [Iwabu et al., 2010], інсулін у скелетних м'язах контролює утворення мітохондрій через зростання концентрації цитозольного Ca^{2+} , активацію АМФК і подальше фосфорилування й активацію рецептора PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α). Активована АМФК може також підвищувати активність карнітин-ацилтрансферази I, що сприяє активації окислення жирних кислот [McCarty, 2005].

Цукровий діабет 2-го типу – ендокринне захворювання, що супроводжується високим рівнем глюкози у крові внаслідок розвитку інсулінової резистентності. У скелетних м'язах хворих на цукровий діабет 2-го типу порушений мітохондріальний біогенез, що призводить до зниження інтенсивності синтезу АТФ у мітохондріях і суттєвого зростання вмісту триацилгліцеролів. Спостерігається також посилений вихід глюкози із печінки та зниження секреції інсуліну β -клітинами.

Генетичним аналізом експресії 22 000 генів у тварин із нормальною чутливістю до глюкози і з цукровим діабетом 2-го типу встановлено [Mootha et al., 2003], що найбільш вираженою зміною було зниження на 20 % експресії набору генів, відповідальних за окисне фосфорилування. Подібні результати було виявлено і у “предіабетичних” мишей із порушеною чутливістю до глюкози. Такі генетичні порушення особливо характерні для скелетних м'язів, серця та бурої жирової тканини – основних місць, де засвоєння глюкози контролюється інсуліном. Так, у м'язах хворих на діабет тварин активність транскрипційного фактора та регулятора мітохондріального біогенезу PGC-1 α була знижена на 20 %. Різке збільшення кількості циркулюючих у крові жирних кислот спричиняє зростання резистентності до інсуліну без достовірного впливу на функцію мітохондрій. Тим не менш, поєднання зменшеного окисного потенціалу та збільшеного циркулювання жирних кислот може призводити до внутрішньом'язового накопичення триацилгліцеролів і проміжних продуктів ліпідного обміну.

17.2.4. Мітохондрії, інсульт і глутаматна токсичність

На людський мозок припадає тільки 2 % маси тіла, але він використовує майже 20 % загальної кількості спожитого організмом кисню, в основному для підтримання іонних градієнтів крізь плазматичну мембрану нейронів та глії.

Приблизно 80 % нервових закінчень у головному мозку ссавців використовують амінокислоту глутамат як нейротрансмітер. Концентрація глутамату в цитоплазмі нейронів є у діапазоні 1–10 мМ, а в позаклітинному середовищі – тільки 1 мкМ. Цей великий градієнт концентрацій підтримується транспортерами амінокислот (EAATs) у плазматичній мембрані нейронів і глії. Ці транспортери переносять глутамат завдяки енергії електрохімічного градієнта іонів Na^+ ($\Delta\mu\text{Na}^+$), а отже, залежать від енергетичного забезпечення Na^+/K^+ -помпи. АТФ також необхідний для роботи везикулярної протонної помпи V-типу і, відтак, для обміну протонів на глутамат везикулярними транспортерами VGLUTs, унаслідок чого він і накопичується у секреторних везикулах.

Під час інсульту порушується постачання певних ділянок мозку киснем, тому транспорт електронів у мітохондріях нейронів і глії є заінгібованим, а рівень цитозольного АТФ швидко падає. Гліколіз не може повністю компенсувати це зниження рівня АТФ. За цих умов здатність Na^+/K^+ -помпи підтримувати $\Delta\mu\text{Na}^+$ є обмеженою, а глутамат катастрофічно вивільняється з клітин ішемізованої ділянки мозку.

Глутамат є агоністом різноманітних іонних каналів і G-протеїнзв'язаних рецепторів, які реалізують короткотривалі (мілісекунди) впливи нейротрансмітера. Одним із таких рецепторів є рецептор до N-метил-D-аспартату (NMDA), який відіграє центральну роль у процесах навчання і пам'яті. Глутамат активує вхід іонів Na^+ і Ca^{2+} у клітину через канал цього рецептора і таким чином підтримує активний стан клітини. Однак за умов гіпоксії це є небезпечним для клітин ішемізованих ділянок. Біоенергетичні наслідки хронічної активації NMDA-рецептора представлені на рис. 17.8.

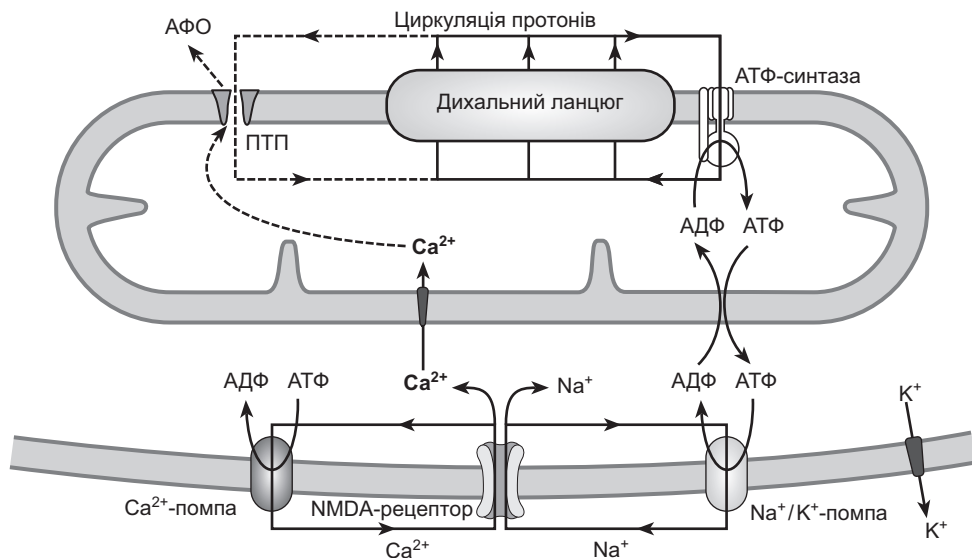


Рис. 17.8. Біоенергетичні наслідки хронічної активації NMDA-рецептора. ПТП – пора транзійтної проникності, АФО – активні форми оксигену

Хоча NMDA-рецептори зазвичай мають вищу селективність до іонів Ca^{2+} , ніж до іонів Na^+ (10:1), концентрація Na^+ в позаклітинному середовищі є у 100 разів вищою, ніж Ca^{2+} . Тому вхід Na^+ крізь NMDA-рецептори у цитоплазму перевищує вхід Ca^{2+} .

Шкідливі наслідки входу Na^+ є подвійними. По-перше, це спричиняє велике навантаження на мітохондрії, які постачають АТФ для виведення Na^+ з цитоплазми Na^+/K^+ -помпою. По-друге, активація Na^+/K^+ -помпи спричиняє інтенсифікацію введення K^+ з клітин, що може призвести до поглиблення порушень в ішемізованих ділянках мозку. Водночас вхід Ca^{2+} крізь NMDA-рецептор швидко збільшує концентрацію Ca^{2+} в цитозолі приблизно до 0,5 мкМ, після чого мітохондрії починають акумулювати ці катіони. Поглинання Ca^{2+} мітохондріями зумовлює додаткове навантаження на дихальний ланцюг. Врешті, якщо накопичення катіона в матриксі перевищує Ca^{2+} -ємність мітохондрії, то активується пора транзійтної проникності, різко знижується $\Delta\psi$, і нейрон гине внаслідок некрозу.

Глутамат у нейрони та клітини глії транспортують Na^+ -залежні переносники з використанням енергії електрохімічного градієнта Na^+ , який підтримується Na^+/K^+ -помпою. За інсульту певні ділянки мозку перебувають в умовах гіпоксії, тому синтез АТФ у мітохондріях пригнічений. У клітинах ішемізованої ділянки мозку гліколіз не може компенсувати дефіцит окисного фосфорилування, внаслідок чого рівень цитозольного АТФ швидко падає, концентрація глутамату в міжклітинному просторі катастрофічно зростає і неконтрольовано активуються NMDA-рецептори сусідніх клітин, що призводить до їхньої загибелі.

Раніше вважалося, що оксидативний стрес виникає на початку процесу глутамат-ініційованої загибелі нейронів. Тим не менш, концентрація супероксидного радикала зростає тільки після колапсу $\Delta\psi$ унаслідок перевантаження мітохондрій іонами Ca^{2+} та ініціювання некротичної смерті клітин. Очевидно, що вирішальним фактором у цій боротьбі нейрона за життя є “запас дихальної ємності” для підтримання роботи дихального ланцюга. У дослідях на клітинних культурах будь-який чинник, що зменшує максимальну здатність мітохондрій генерувати АТФ (часткове інгібування переносу електронів, окисне пошкодження через аденіннуклеотидтранслоказу або навіть м’яке роз’єднання, що призводить до збільшення проникності протонів крізь мітохондріальну мембрану) посилює смертельність паралельного патологічного впливу глутамату. На противагу цьому, коли глутамату немає, м’яке роз’єднання може ініціювати з певною затримкою захисний механізм (protective preconditioning) через активацію АМФК [Weisova et al., 2012]. У процесі дослідження нейронів така активація АМФК приводила до збільшення активності переносника глюкози GLUT3, до підвищення значення $\Delta\psi$ і рівня клітинного АТФ з подальшим вимиванням протонів.

Підсумки 17. МІТОХОНДРІАЛЬНІ ПАТОЛОГІЇ

- Частота ураження органів спадковими мітохондріальними хворобами розташована в ряду: органи центральної нервової системи → міокард → скелетні м’язи → нирки → ендокринні органи → печінка. Головними біохімічними ознаками мітохондріальних хвороб є порушення метаболізму пірувату/лактату, а також активності ферментів дихального ланцюга мітохондрій.
- Для спадкових мітохондріальних хвороб характерне материнське успадкування – хворобу передають лише жінки, але хворіють особи обох статей.
- Мітохондрії залучені у процес неоплазматичної трансформації клітини, коли відбувається ненормальний перерозподіл енергетичного

метаболізму на користь гліколізу, а не окисного фосфорилування (ефект Варбурга), а також активуються ключові ферменти гліколізу і лактатдегідрогеназа.

- Під час інфаркту міокарда гліколіз не може адекватно компенсувати порушення окисного фосфорилування, оскільки внаслідок утворення лактату внутрішньоклітинний вміст закислюється, що інгібує фосфофруктокіназу. Але це закислення, ймовірно, не дає можливості активувати пору транзійтної проникності навіть за високої цитозольної концентрації Ca^{2+} , низького АТФ і оксидативного стресу.
- Для запобігання некрозові серцевої тканини важливо якнайшвидше відновити нормальний кровообіг. Проте реперфузія часто зумовлює пошкодження (“травми реперфузії”) внаслідок активації пори транзійтної проникності й утворення активних форм кисню.
- Для цукрового діабету 2-го типу характерним є високий рівень глюкози у крові внаслідок розвитку інсулінової резистентності. У скелетних м’язах хворих на цукровий діабет 2-го типу порушується мітохондріальний біогенез, що призводить до зниження інтенсивності синтезу АТФ у мітохондріях і суттєвого зростання вмісту триацилгліцеролів. Спостерігають також посилений вихід глюкози з печінки та зниження секреції інсуліну β -клітинами.
- Під час інсульту у певних ділянках мозку, які перебувають в умовах гіпоксії, синтез мітохондріального АТФ сповільнений. У клітинах ішемізованої ділянки мозку гліколітичне розщеплення глюкози не може компенсувати дефіцит окисного фосфорилування, внаслідок чого рівень цитозольного АТФ швидко знижується, концентрація глутамату в міжклітинному просторі катастрофічно збільшується, а NMDA-рецептори сусідніх клітин неконтрольовано активуються, що призводить до їхньої загибелі.



ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Поясніть, чому мітохондріальні хвороби успадковуються лише по материнській лінії.
2. Чому реперфузія після ішемії міокарда викликає суттєві порушення функцій мітохондрій кардіоміоцитів?
3. Чому порушення мітохондріального біогенезу призводить до розвитку цукрового діабету 2-го типу?
4. За якої генетичної хвороби порушується перетворення пропіоніл-КоА на сукциніл-КоА, що зумовлює блювоту, судоми, розумову відсталість і смерть у ранньому віці?

- 1) метилмалонова ацидемія;
 - 2) фенілкетонурія;
 - 3) альбінізм;
 - 4) хвороба кленового сиропу.
- 5. За якої генетичної хвороби порушується перетворення фенілаланіну на тирозин, що зумовлює блювоту в новонароджених і розумову відсталість?**
- 1) альбінізм;
 - 2) метилмалонова ацидемія;
 - 3) хвороба кленового сиропу;
 - 4) фенілкетонурія.
- 6. Виберіть назву першої мітохондріальної хвороби, що була описана у 1962 році:**
- 1) синдром Кейса;
 - 2) хвороба Люфта;
 - 3) синдром Пірсона;
 - 4) синдром MERRF.
- 7. Виберіть правильні характеристики синдрому Кірнса–Сейра:**
- 1) це варіант мітохондріальної енцефаломіопатії, що проявляється в дитячому та юнацькому віці;
 - 2) вражається пігментний епітелій сітківки і розвиваються порушення провідності серця, атаксія, приглухуватість, ретинопатія;
 - 3) у м'язах виявляють пошкоджені (рвані) м'язові волокна;
 - 4) усі відповіді правильні.
- 8. Мітохондріальний шлях розвитку апоптозу реалізується через вивільнення із мітохондрій:**
- 1) каспази 3;
 - 2) цитохромоксидази;
 - 3) супероксиду;
 - 4) цитохрому c.
- 9. Нейрони і клітини глії за інсульту гинуть унаслідок:**
- 1) апоптозу;
 - 2) некрозу;
 - 3) ацидозу;
 - 4) алкалозу.
- 10. Ефект Варбурга – це:**
- 1) інтенсифікація гліколізу в ракових клітинах навіть за аеробних умов;
 - 2) інтенсифікація гліколізу в ракових клітинах за анаеробних умов;
 - 3) інгібування транспортерів глюкози;
 - 4) зниження активності гексокінази.
- 11. За інфаркту міокарда внутрішньоклітинне рН:**
- 1) не змінюється;
 - 2) зростає;
 - 3) зменшується;
 - 4) стає рівновеликим до зовнішньоклітинного рН.



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Abu-Amero K.K., Al-Dhalaan H., Bohlega S.* et al. A patient with typical clinical features of mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) but without an obvious genetic cause: a case report // *J. Med. Case Rep.* – 2009. – Vol. 3. – P. 77–82.
- Babsky A., Doliba Nic., Doliba Nat.* et al. Na⁺ effects on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation in diabetic hearts // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2001. – Vol. 226, N 6. – P. 543–551.
- Doliba N.M.* Pancreatic islet adaptation and failure in obesity and diabetes // *Metabolic Syndrome* (Ed. Rexford S. Ahima). – Philadelphia: Springer, 2016. – P. 461–479.
- Halestrap A.P.* Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34. – P. 232–237.
- Crestanello J.A., Doliba N.M., Babsky A.M.* et al. Opening of potassium channels protects mitochondrial function from calcium overload // *J. Surg. Res.* – 2000. – Vol. 94, N 2. – P. 116–123.
- Crestanello J.A., Doliba N.M., Babsky A.M.* et al. Ischemic preconditioning improves mitochondrial tolerance to experimental calcium overload // *J. Surg. Res.* – 2002. – Vol. 103, N 2. – P. 243–251.
- Iwabu M., Yamauchi T., Okada-Iwabu M.* et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1 // *Nature.* – 2010. – Vol. 464, N 7293. – P. 1313–1319.
- McCarty M.F.* AMPK activation as a strategy for reversing the endothelial lipotoxicity underlying the increased vascular risk associated with insulin resistance syndrome // *Med. Hypotheses.* – 2005. – Vol. 64, N 6. – P. 1211–1215.
- Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F.* et al. PGC-1 α responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes // *Nat. Genet.* – 2003. – Vol. 34, N 3. – P. 267–273.
- Shaw R.J.* Glucose metabolism and cancer // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 18. – P. 598–608.
- Supale S., Li N., Brun T., Maechler P.* Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells // *Trends. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 23, N 9. – P. 477–487.
- Szendroedi J., Frossard M., Klein N.* Lipid-induced insulin resistance is not mediated by impaired transcapillary transport of insulin and glucose in humans // *Diabetes.* – 2012. – Vol. 61, N 12. – P. 3176–3180.
- Weisová P., Anilkumar U., Ryan C.* et al. ‘Mild mitochondrial uncoupling’ induced protection against neuronal excitotoxicity requires AMPK activity // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1817, N 5. – P. 744–753.
- Vendelbo M.H., Nair K.S.* Mitochondrial longevity pathways // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, N 4. – P. 634–644.

МЕТОДИ КЛІТИННОЇ БІОЕНЕРГЕТИКИ

- Виділення мітохондрій і клітин
- Визначення активності ферментів
- Полярографічний метод
- рН-Метричний метод
- Метод ядерно-магнітного резонансу
- Метод позитронно-емісійної томографії

Видатний фізіолог, лауреат Нобелівської премії у галузі фізіології та медицини Іван Павлов стверджував: *“Метод – найперша, основна річ... Від методу, від способу дії залежить уся серйозність дослідження. Метод тримає у руках долю дослідження”*. Енергетичні функції клітин досліджують за допомогою різноманітних біофізичних, біохімічних, цитологічних та інших методів. У розділі буде розглянуто методи, які найчастіше використовували автори цього підручника для досліджень функціональних процесів, насамперед у мітохондріях.

18.1. ВИДІЛЕННЯ МІТОХОНДРІЙ МЕТОДОМ ДИФЕРЕНЦІЮВАЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГУВАННЯ

Мітохондрії виділяють методом диференціювального центрифугування [Babsky et al., 2001]. Тканину (наприклад, печінку чи серце) охолоджують протягом 10 хв у середовищі гомогенізації (0...+4 °C). Охолоджену тканину подрібнюють і гомогенізують за допомогою тefлонового товчачика у скляному гомогенізаторі Поттера–Ельвегейма (Potter–Elvehøj) у співвідношенні 1 г тканини на 8 мл середовища виділення. Середовище гомогенізації зазвичай має такий склад (у мМ): сахароза – 300, HEPES – 10, EGTA – 1, рН 7,4. Ці інгредієнти забезпечують тонічність розчину (сахароза), рН середовища (HEPES чи трис-буфер) і підтримують низьку концентрацію двовалентних катіонів (EGTA). Для

тканин, які потребують більш “жорсткої” гомогенізації у гомогенізаторі типу скло–скло (серце, скелетні м’язи та ін.), для стабілізації мітохондріальної мембрани у середовище виділення обов’язково додають бичачий сироватковий альбумін (БСА) у концентрації 0,2 %. Із гомогенату тканини центрифугуванням поетапно осаджують фракцію ядер (3 хв за прискорення 150 g і без зупинки центрифуги 4 хв за 300 g). Мітохондріальну фракцію отримують центрифугуванням надосадової рідини протягом 10 хв за 4500 g. Отриманий осад ресуспензують вручну в середовищі гомогенізації, яке додають у розрахунку 0,1 мл середовища на 1 г тканини (кінцева концентрація білка є приблизно 40–50 мг/мл). Отриману суспензію мітохондрій використовують, наприклад, для полярографічних або ЯМР-досліджень. Усі операції отримання мітохондрій треба проводити за температури 0...+4 °C. Протягом полярографічних експериментів пробірку з органелами зберігають у нещільно закритій скляній пробірці (10–15 мл) на льоді. За умов порівняльного експерименту мітохондрії треба виділяти одночасно з тканин дослідної та контрольної тварини.

Різна маса субклітинних фракцій (ядер, мітохондрій, мікросом та ін.) дає змогу виділяти їх із гомогенатів тканин методом диференціувального центрифугування, зберігаючи за температури 0...+4 °C їхні основні функціональні властивості.

18.2. ІЗОЛЮВАННЯ ГЕПАТОЦИТІВ

Для ізолювання гепатоцитів використовують двостадійний метод Сеглена [Seglen, 1976]. Швидко вирізану печінку рециркуляторно перфузують через ворітну вену розчином для відмивання від крові, після цього перев’язують нижню порожнисту вену і вводять розчин колагенази, який рециркулюють протягом 20–25 хв.

Після завершення руйнування колагенового матриксу печінку переносять у базове позаклітинне середовище, що містить (у мМ): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0, pH 7,4. Вивільнені з тканини гепатоцити диспергують легким піпетуванням і фільтрують крізь нейлон. Для очищення суспензії гепатоцитів від залишків позаклітинного матриксу та пошкоджених клітин її тричі промивають середовищем, центрифугуючи кожного разу з прискоренням 50 g. Для перевірки цілісності плазматичних мембран клітини фарбують 0,1%-ним розчином трипанового синього. Для полярографічних досліджень кількість інтактних клітин має становити понад 80 % загальної кількості клітин. Кількість гепатоцитів підраховують у камері Горяєва.

Оскільки плазматична мембрана гепатоцитів непроникна для екзогенних субстратів, часто її пермеабілізують із використанням дигітоніну або сапоніну, які утворюють комплекси з холестерином плазматичної мембрани. Унаслідок цього в мембрані виникають своєрідні пори, крізь які в клітину проникають субстрати окиснення та фосфорилювання.

18.3. ІЗОЛЮВАННЯ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримують з використанням колагенази (тип 4, 220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і спів-авт. [Williams et al., 1978]. Після декапітації у спільну жовчну протоку повільно вводять 5 мл базового позаклітинного середовища, що містить (у мМ): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глюкозу – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл, соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл та колагеназу; pH 7,4.

Відпрепаровану залозу інкубують у позаклітинному середовищі за температури 37 °C у термостатованій водяній бані, струшуючи із частотою 120 циклів на хвилину. Після інкубації тканину підшлункової залози відмивають базовим позаклітинним середовищем, відділяють тканину залози від проток і судин та механічно диспергують. Отриману суспензію фільтрують для вилучення більших за ацинуси часток. Відфільтрований препарат нашаровують над 5 мл базового розчину з підвищеною до 4 % концентрацією БСА і два рази центрифугують упродовж 5 хв з прискоренням 50 g. Потім ацинуси додатково осаджують у 5 мл базового позаклітинного середовища. Клітини підраховують у камері Горяєва. Для оцінювання цілісності плазматичної мембрани клітини фарбують 0,1%-ним розчином трипанового синього.

18.4. ІЗОЛЮВАННЯ КАРДІОМІОЦИТІВ

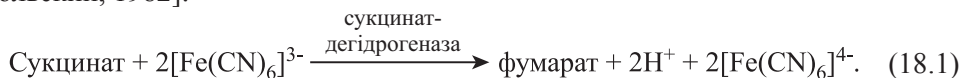
Клітини серця можна виділяти асептичним методом [Osbakken et al., 1992]. Ізольоване серце лабораторного щура суперфузують крізь аорту для вимивання крові протягом 5 хв модифікованим розчином Кребса–Генселейта, що має такий склад (у мМ): NaCl – 118, MgSO₄ – 1,2, KCl – 4,7, глюкоза – 15, таурин – 5, карнітин – 5, HEPES – 25, pH 7,4, 37 °C. Цей розчин протягом усього часу суперфузії продувають 100 % O₂. Після цього серце перфузують ще упродовж 30 хв, додавши до перфузійного розчину 30 мг колагенази для порушення міжклітинних контактів. Після перфузії серце подрібнюють та інкубують 45 хв у середовищі, що містить БСА. Суспензію клітин центрифугують 1,5 хв за 70 g і осад клітин суспендують у 1–1,5 мл середовища із розрахунку ~4–5 × 10⁶ клітин/мл.

Ізолювання клітин печінки, підшлункової залози і серця здійснюють переважно, використовуючи помірні концентрації колагенази, які руйнують міжклітинні зв'язки, проте не впливають на структуру і функції плазматичної мембрани.

18.5. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Активність **сукцинатдегідрогенази** (фермент комплексу II дихального ланцюга мітохондрій) у тканинах можна визначати двома методами. Перший метод ґрунтується на здатності розчину фериціаніду калію (K₂[Fe(CN)₆]), який

має жовтий колір, знебарвлюватися за дії сукцинатдегідрогенази [Ещенко, Вольський, 1982]:



У цьому разі активність сукцинатдегідрогенази представляють у нмолях дегідрогенованого сукцинату за одну хв на мг білка.

Інший метод ґрунтується на зміні забарвлення індикатора під впливом приєднання протонів за окислення субстратів циклу Кребса [Грин, 1990]. Як індикатор використовують розчин дихлорфеноліндофенол, який має жовте забарвлення. Надосадову рідину для досліджень активності сукцинатдегідрогенази цим методом отримують диференціальним центрифугуванням гомогенату (1700 g, 10 хв). До неї вносять субстрат (сукцинат у концентрації 0,35 мМ) та дихлорфеноліндофенол (0,1 %). Інтенсивність забарвлення реєструють на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі поглинання 750 нм через 0,5; 1; 2; 5 і 10 хв. Після третьої хвилини зазвичай спостерігають зниження швидкості зміни забарвлення розчину дихлорфеноліндофенолу внаслідок насичення його протонами. Максимальна швидкість знебарвлення розчину є пропорційною активності сукцинатдегідрогенази, яку перераховують на одиницю білка.

Активність **цитохромоксидази** (фермент комплексу IV дихального ланцюга) визначають за інкубування суспензії мітохондрій із цитохромом *c* та диметил-*n*-фенілендіаміном. За окиснення диметил-*n*-фенілендіаміну утворюється червоний пігмент із максимумом поглинання за 510 нм у кількості, пропорційній цитохромоксидазній активності мітохондрій [Straus, 1956]. Утворений пігмент екстрагують сумішшю абсолютного спирту з тетрахлоретиленом у співвідношенні 3:1, після чого спектрофотометрують. Під час ферментативної реакції відновлений стан цитохрому *c* підтримується надлишком диметил-*n*-фенілендіаміну [Кривченкова, 1977].

Для виявлення цитохромоксидази також використовують реактив “НАДІ” – суміш спиртових розчинів α -нафтолу та *n*-фенілендіаміну і розчину натрій карбонату. Внаслідок окиснення *n*-фенілендіаміну й α -нафтолу за участю цитохромоксидази утворюється індофеноловий синій, який екстрагують абсолютним етиловим спиртом. Спектрофотометрують за довжини хвилі 550 нм. Активність ферменту обчислюють, виходячи з того, що зниження оптичної густини на одиницю еквівалентне відновленню 0,44 одиниці кисню. Результати виражають в умовних одиницях цитохромоксидазної активності.

Є також полярографічний метод визначення активності цитохромоксидази за швидкістю окиснення аскорбату за наявності роз’єднувача 3-фторметоксикарбонілціанідфенілгідразону (FCCP) і тетраетил-*n*-фенілендіаміну, який переносить електрон з аскорбату на цитохром *c*.

На сьогодні розроблено стандартні набори, які дають змогу визначити активність цитохромоксидази колориметрично за зменшенням поглинання світла фероцитохромом *c* за довжини хвилі 550 нм унаслідок його окиснення до фероцитохрому *c* цитохромоксидазою.

Активність **моноамінооксидази** (маркерний фермент зовнішньої мембрани мітохондрій) визначають за кількістю аміаку, що відщеплюється від тих чи інших субстратів-моноамінів за інкубації зі суспензією мітохондрій. Для визначення вмісту аміаку в пробах використовують високочутливу специфічну реакцію, у якій аміак утворює в лужному середовищі за наявності солей дихлорізоціанурової кислоти, саліцилату й нітропрусиду сполуку зеленого кольору з максимумом поглинання за 660 нм [Reardon, 1966].

За окислювального дезамінування *n*-нітрофенілетиламіну, яке каталізує моноамінооксидаза, утворюється забарвлений продукт взаємодії *n*-нітрофенілацетатного альдегіду з надлишком субстрату, який у сильнолужному середовищі екстрагують бутанолом і колориметрують за довжини хвилі 440 нм [Орехович, 1977].

Активність **глутаматдегідрогенази** (каталізує перетворення глутамату на α -кетоглутарат і є маркером порушення функціонування печінки) визначають спектрофотометричним методом за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН у реакційній суміші, що містить суспензію мітохондрій, *трис*-HCl буфер, α -кетоглутарат, НАДН (НАДФН) і $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Активність виражають у мкмоль НАДН (або НАДФН) / (мг білка \times хв) [Захарова, 1982].

Визначення активності **супероксиддисмутази** (каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикала до кисню та гідроген пероксиду) ґрунтується на окисненні кверцетину (вітаміну Р), який знебарвлюється внаслідок взаємодії зі супероксидним радикалом у середовищі з ЕДТА, N,N,N,N-тетраметилетилендіамідом (ТЕМЕД) і фосфатним буфером. Реакцію окислення кверцетину реєструють спектрофотометрично за довжини хвилі 406 нм. Активність виражають в од. акт. / (мг білка \times хв) [Костюк, 1990].

Метод визначення активності **каталази** ґрунтується на здатності H_2O_2 (гідроген пероксиду) утворювати зі солями молібдену сполуки жовтого кольору, інтенсивність яких залежить від кількості гідроген пероксиду в розчині, що не був перетворений каталазою, тобто від активності каталази у пробі. Кількість утвореного забарвленого комплексу визначають фотометрично за довжини хвилі 410 нм. Активність каталази виражають у мкмоль H_2O_2 / (мг білка \times хв) [Королюк, 1988].

Активність **глутатіонпероксидази** визначають за швидкістю окиснення відновленого глутатіону за наявності гідропероксиду третинного бутилу. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп із реактивом Елмана (10 мМ 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти у метанолі) з утворенням кольорового тіонітрофенільного аніона. Кількість останнього прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з реактивом Елмана, і її визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 412 нм [Моин, 1986]. Активність глутатіонпероксидази виражають у мкмоль глутатіону-SH (мг білка \times хв).

Ензиматичні методи, які дають можливість спектрофотометрично оцінити інтенсивність окисно-відновних і пероксидних процесів, ґрунтуються, в основному, на зміні інтенсивності забарвлення кольорових індикаторів за певних довжин хвиль.

18.6. ПОЛЯРОГРАФІЧНИЙ МЕТОД

Зважаючи на те, що кисень є кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, аналіз його споживання залишається високоінформативним способом оцінки функціонального стану мітохондрій. Одним із найбільш поширених і традиційних методів дослідження мітохондрій є полярографічний метод вимірювання споживання кисню за допомогою електрода Кларка у різних метаболічних станах за Бріттоном Чансом [Chance, Williams, 1955].

Полярографічний (точніше, хроноамперометричний) метод вивчення параметрів дихання й окисного фосфорилування біологічних суспензій ґрунтується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на катоді під час накладання сталого потенціалу $\sim 0,7$ В:



Амплітуда струму, що виникає, є прямо пропорційною кількості молекул кисню, які дифундують до вимірювального електрода (катода). Якщо в замкненому об'ємі є споживач кисню (наприклад, мітохондрії), то за зниженням його концентрації можна розрахувати швидкість дихання. Як вимірювальний електрод зазвичай використовують платину. На сьогодні найчастіше використовують електрод, сконструйований Леландом Кларком. Схема полярографічної установки представлена на рис. 18.1.

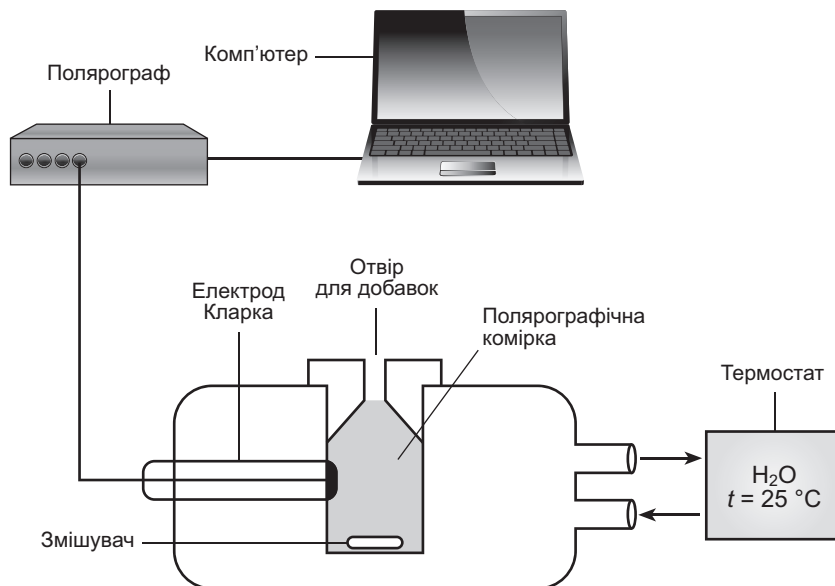
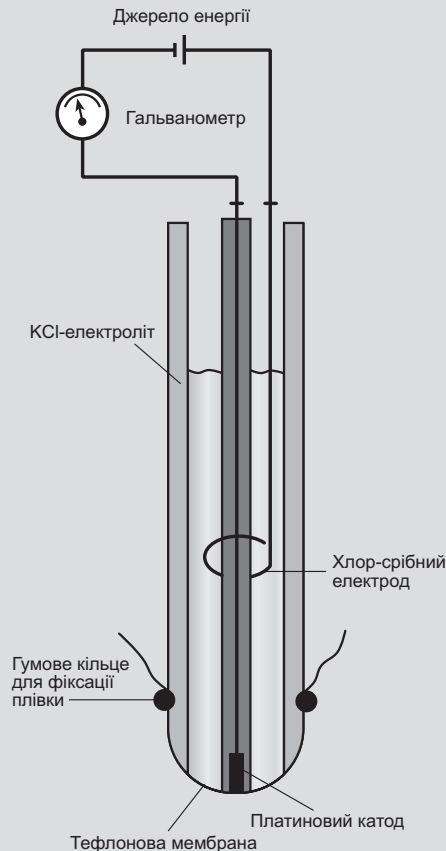


Рис. 18.1. Схема полярографічної установки

Величину дифузного струму реєструють за температури $+25...26\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для мітохондрій) чи $+36\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для клітин ссавців). Мітохондрії або клітини після центрифугування вносять у полярографічну комірку, де є середовище дихання. Суспензію перемішують за допомогою магнітного чи пропелерного змішувача.

Електрод Кларка. Леланд Кларк (1918–2005), професор хімії в Антіохському коледжі (Слов Спрінгс, Огайо, США), працював над конструкцією першого бульбашкового оксигенатора для проведення операцій на серці. Однак редактор журналу, де він спробував опублікувати свої результати, не прийняв статтю до друку, бо апарат не передбачав вимірювання напруження кисню pO_2 у крові, яка виходила з апарата. Д-ру Кларку не залишалося нічого іншого, як сконструювати кисневий електрод. Він відрізнявся від відомого на той час зразка тим, що вимірювальний платиновий катод був прикритий спеціальною тефлоновою мембраною, проникною для кисню, який, отже, міг без обмежень електролітично відновлюватися на платиновій поверхні. Електричний струм, що виникав між вимірювальним платиновим і порівняльним хлор-срібним електродом, був пропорційний концентрації кисню в середовищі. Згодом таку конструкцію кисневого електрода почали широко застосовувати для вимірювання дихання клітин, гомогенатів тканин і мітохондрій [Clark et al., 1953].



Середовище дихання для мітохондрій (чи пермеабілізованих клітин) зазвичай має такий склад (у мМ): сахароза – 150, KCl – 50, HEPES – 10, KH_2PO_4 – 1, pH 7,2. Ці інгредієнти забезпечують ізотонічність розчину (сахароза і KCl), фізіологічну концентрацію K^+ (KCl), pH середовища (HEPES) і неорганічний фосфат (KH_2PO_4) для синтезу АТФ. Як субстрати окислення використовують інтермедіати циклу Кребса (сукцинат, α -кетоглутарат, малат, ізоцитрат) чи трансаміназних реакцій (глутамат, глутамін) у концентраціях або близьких до K_m (наприклад, для сукцинату 0,35 мМ чи для α -кетоглутарату – 1 мМ) або у насичуючих концентраціях субстратів (~ 5 мМ). Дихання стимулюють

додаванням у комірку АДФ (остаточна концентрація 200 мкМ для мітохондрій або 750 мкМ – для клітин) чи роз'єднувачів дихання й окисного фосфорилування – динітрофенолу, СССР (3-хлорметоксикарбонілціанідфенілгідрозону) або FCCP. Метод дає змогу ідентифікувати метаболічні стани мітохондрій.

У роботах 1950-х років Б. Чанс виокремив п'ять метаболічних станів, які можна моделювати у полярографічній комірці (S_1 – S_5) [Chance, Williams, 1955].

S_1 . Мітохондрії додають до ізоосмотичного середовища, що містить ~1–5 мМ фосфату, дихання відбувається повільно. У цьому стані недостатньо субстратів окиснення і фосфорилування (субстратне “голодування”).

S_2 . До мітохондрій додають АДФ (акцептор фосфату), дихання незначно зростає.

S_3 . У комірку додають субстрат окиснення (наприклад, сукцинат, піруват тощо), і дихання різко зростає.

S_4 . У комірці весь доданий АДФ перетворюється на АТФ, швидкість дихання знижується.

S_5 . Це безкисневий стан, коли весь кисень у комірці використано.

Поняття метаболічних станів для ізольованих мітохондрій запропонував видатний американський вчений Бріттон Чанс (1913–2010). Чанс отримав два наукових ступені доктора філософії – в галузях фізичної хімії (Пенсильванський університет) і фізіології (Кембриджський університет).

Його наукові інтереси були надзвичайно широкі. Упродовж Другої світової війни Б. Чанс працював у радіаційній лабораторії Массачусетського



Проф. Б. Чанс (ліворуч) із проф. М. Долібою

технологічного інституту над розробкою радарів. На початку своєї кар'єри Чанс досліджував переважно структуру та функції ферментів, зокрема, роль фермент-субстратного комплексу у ферментативних реакціях. Він був зачинателем багатьох нових напрямів досліджень біохімічних реакцій і метаболічних шляхів.

Б. Чанс, зокрема, цікавився проблемами спряження процесів дихання й окисного фосфорилування. Пізніше він також почав вивчати проблеми контролю процесів у живих тканинах, неінвазивні методи досліджень енергетичних процесів (зокрема, ^{31}P -ЯМР), можливості використання оптичної спектроскопії та флуориметрії у дослідженнях різних тканин, у т.ч. і ракових. Наприкінці своєї тривалої та блискучої наукової кар'єри, яка почалася з дослідження ізольованих ферментів, д-р Чанс приділяв найбільшу увагу медичним проблемам людей. Символічно, що його остання стаття, реферована на сайті Pubmed, присвячена виявленню раку молочної залози у пацієнток за допомогою ближньої інфрачервоної спектроскопії [Nioka et al., 2013].

У 1952 р. Бріттон Чанс став олімпійським чемпіоном із вітрильного спорту у класі яхт 5,5 м.

Отже, у кожному з п'яти метаболічних станів мітохондрій за Чансом потік електронів дихальним ланцюгом обмежується різними чинниками: доступністю ендогенних чи екзогенних субстратів окислення, концентрацією кисню, неорганічного фосфату, доданого АДФ чи утвореного АТФ.

Метаболічні стани мітохондрій моделюють послідовним додаванням у полярографічну комірку власне мітохондрій, АДФ і субстратів окислення. Після класичних робіт Чанса виникла велика кількість модифікацій цього методу, пов'язаних саме з послідовністю додавання перелічених речовин та інтерпретації станів.

Ми у своїх дослідженнях найчастіше використовуємо експериментальний протокол, наведений на рис. 18.2, і характеризуємо різні метаболічні стани мітохондрій швидкостями дихання V_1 – V_4 і V_p .

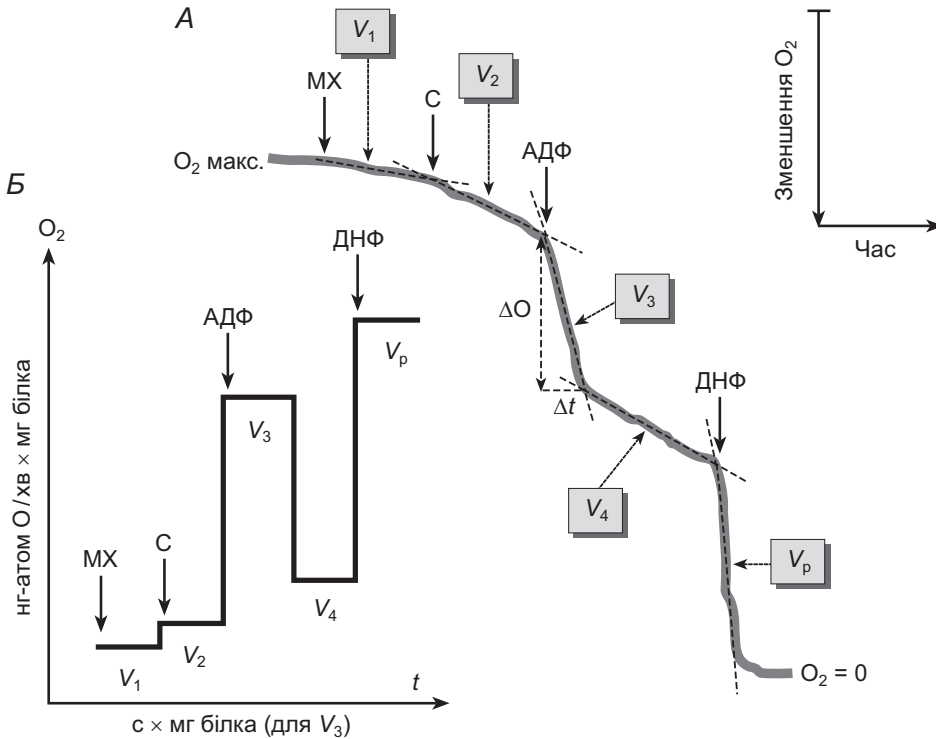


Рис. 18.2. Типова полярограма дихання мітохондрій (А) та її діаграмне зображення (Б), що дає змогу ідентифікувати метаболічні стани мітохондрій: суцільними вертикальними стрілками (↓) показано додавання у полярографічну комірку; С – субстрат; МХ – мітохондрії

Стан 1 (“ендогенний спокій”, швидкість V_1). Виникає після додавання у полярографічну комірку мітохондрій або клітин, коли енергетичними субстратами є тільки ендогенні субстрати. Попередньо комірку заповнюють середовищем інкубації. Швидкість дихання V_1 є мінімальною.

Стан 2 (“спокій”, швидкість V_2). Виникає після додавання у полярографічну комірку екзогенного субстрату. За умов нормального значення pO_2 та браку екзогенного АДФ (акцептора фосфату) зберігається рівновага між синтезом і гідролізом ендогенного АТФ. За цих умов дихальні переносники переважно відновлені, а швидкість дихання мітохондрій, яку позначають як V_2 , є низькою.

Стан 3 (“активний”, швидкість V_3). За додавання АДФ дихання мітохондрій зростає і супроводжується фосфорилуванням АДФ. За синтезу АТФ концентрація окислених форм дихальних переносників збільшується.

Стан 4 (“контрольований”, або “відпочинок”, швидкість V_4). Стан настає після фосфорилування доданого АДФ до АТФ. Концентрація субстратів окиснення все ще залишається достатньо високою, відновленість дихальних переносників знову зростає, а дихання, порівняно зі станом 3, падає.

Стан V_p (“роз’єднаний”). Цей стан виникає за додавання роз’єднувача дихання й окисного фосфорилування (наприклад, FCCP чи 2,4-ДНФ), що супроводжується зростанням швидкості поглинання кисню, яке відображає максимальну окисну здатність мітохондрій.

Діаграмне зображення полярограми дає змогу графічно порівнювати швидкості дихання мітохондрій у нормованому вигляді (рис. 18.2, Б). Швидкості дихання перераховують на 1 мг мітохондріального білка, який зазвичай вимірюють класичним методом О. Лоури [Lowry et al., 1951]. Беручи до уваги розчинність кисню у воді, вважають, що в 1 мл середовища за температури 26 °C міститься 480 нг-атомів (або 960 нмоль) кисню.

Відношення швидкості поглинання кисню V_3 до швидкості поглинання кисню V_2 називають дихальним контролем за Г. Ларді (V_3/V_2), а відношення V_3/V_4 – дихальним контролем за Б. Чансом. Ці показники характеризують спряженість процесів дихання й окисного фосфорилування, а також опосередковано – інтактність мітохондріальних мембран. Зниження дихальних контролів свідчить про роз’єднання процесів дихання й окисного фосфорилування.

Активація дихання за додавання АДФ і наявності неорганічного фосфату обумовлена тим, що синтез АТФ (окисне фосфорилування АДФ) забезпечується використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій. Для підтримання цього потенціалу необхідно активізувати транспорт електронів дихальним ланцюгом, що супроводжується зростанням швидкості поглинання кисню. Ця швидкість (V_3) фактично дає змогу оцінити здатність мітохондрій синтезувати АТФ.

Важливим показником функціонального стану мітохондрій є швидкість V_4 , збільшення якої стосовно V_2 свідчить про порушення спряженості процесів дихання й окисного фосфорилування, стабільності внутрішньої мембрани мітохондрій чи про те, що переносники є недостатньо відновленими. Зокрема, ця швидкість зростає внаслідок пошкодження мітохондрій унаслідок гіпоксії або за посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів. В інтактних (неушкоджених) мітохондріях швидкості V_2 та V_4 , а також дихальні контролі за Ларді та за Чансом суттєво не відрізняються між собою.

На основі полярограм також розраховують ефективність, швидкість і час окисного фосфорилування. Ефективність окисного фосфорилування (Р/О, або АДФ/О) характеризує кількість молекул АДФ, які фосфорилуються на одиницю поглинутого кисню. Коефіцієнт АДФ/О розраховують як відношення кількості доданого в комірку до мітохондрій АДФ (наприклад, 200 нмоль) до кількості поглинутого у стані 3 кисню (ΔO на рис. 18.2). Вищі показники ефективності фосфорилування свідчать про більш ефективне використання кисню за синтезу АТФ. Цей показник залежить від кількості залучених у процес окисного фосфорилування пунктів спряження і кількості енергії, яка витрачається на транспорт АДФ і Φ_H крізь мембрану. Зокрема, за окиснення НАД-залежних субстратів АДФ/О дорівнює $\sim 2,5$, а сукцинату – $\sim 1,5$ (див. розділи 7, 9 чи 11).

Швидкість і час окисного фосфорилування характеризують відповідно інтенсивність і час утворення АТФ. Швидкість фосфорилування розраховують як добуток АДФ/О та V_3 . Час фосфорилування – це добуток Δt у секундах на кількість білка в мг. Ці показники є обернено залежними, тобто збільшення швидкості фосфорилування супроводжується зниженням часу фосфорилування і навпаки. Зміна цих параметрів свідчить про пристосування синтезу АТФ до потреб клітини. Наприклад, введення фізіологічних доз адреналіну зумовлює зростання швидкості фосфорилування і зниження часу фосфорилування, що сприяє покращенню енергетичного забезпечення організму [Бабский и др., 1986].

Полярографічний метод реєстрації дихання мітохондрій, що ґрунтується на моніторингу електрохімічного відновлення кисню на платиновому катоді за сталого потенціалу, дає змогу оцінити не тільки швидкості дихання за різних функціональних станів за Чансом, але й швидкість, ефективність і час окисного фосфорилування АДФ.

18.7. рН-МЕТРИЧНИЙ МЕТОД

Усі окисно-відновні реакції, а також багато транспортних процесів у мітохондріях (фосфорилування АДФ, гідроліз багатих на енергію сполук, активний транспорт катіонів, транспорт фосфату тощо) супроводжує виділення або поглинання іонів H^+ . Метод рН-метрії за безперервного вимірювання концентрації H^+ у суспензії мітохондрій дає корисну інформацію про важливі аспекти цих процесів. З часу першого застосування рН-метричного методу [Nishimura et al., 1962] для дослідження синтезу АТФ цей відносно простий спосіб отримав широке розповсюдження. Зокрема, його використовують для дослідження параметрів окисного фосфорилування АДФ, кальцієвої ємності й Ca^{2+}/H^+ -обміну в мітохондріях [Kondrashova et al., 1982; Шостаковская, Бабский, 1984; Swietach et al., 2013].

Установка для дослідження має протонселективний електрод і електрод порівняння, рН-метр, пристрій для реєстрування сигналу, магнітний змішувач для суспензії та скляну термостатовану відкриту комірку об'ємом $\sim 1,5$ мл. Середовище інкубації мітохондрій для рН-метричного методу відрізняється від

середовища для полярографічного методу тільки трохи нижчою концентрацією буферної речовини для рН (наприклад, *трис*-HCl 3 мМ, рН 7,4). До середовища у комірці додають суспензію мітохондрій у розрахунку 6–7 (для печінки) чи 3–4 мг (для серця) мітохондріального білка на 1 мл. Відповідно до умов інкубації додатково вносять субстрати окиснення (α -кетоглутарат, 1 мМ, сукцинат, 0,35 мМ чи ін.). Окисне фосфорилування стимулюють додаванням АДФ (до концентрації 200 мкМ), а поглинання Ca^{2+} – кількома додаваннями CaCl_2 (50–100 мкМ). Розчини всіх речовин (у т.ч. і АДФ), що додають у комірку, доводять до рН середовища інкубації. Температура інкубації мітохондрій, як і за полярографічних досліджень, +25...26 °С.

За додавання до суспензії мітохондрій відповідних кількостей АДФ відбувається поглинання іонів гідрогену і залужнення середовища (рис. 18.3, I, A). Після фосфорилування доданої АДФ встановлюється постійний рівень рН. Зв'язування іонів H^+ відбувається в реакції утворення АТФ:



де величина n дорівнює $\text{H}^+/\Delta\Phi_n$ і залежить від рН середовища інкубації. Згідно з розрахунками М. Нішімури [Nishimura et al., 1962], $n = 0,9$ за рН 7,4. Тоді кількість утвореного АТФ дорівнює:

$$[\text{АТФ}] = \frac{[\text{H}^+]_{(\text{зв'язаний})}}{n} = 1,1 \times [\text{H}^+]_{(\text{зв'язаний})}. \quad (18.5)$$

Величину зміни концентрації іонів гідрогену визначають за калібруванням відомими кількостями HCl (рис. 18.3, I, B). Із урахуванням часу обчислюють швидкість фосфорилування.

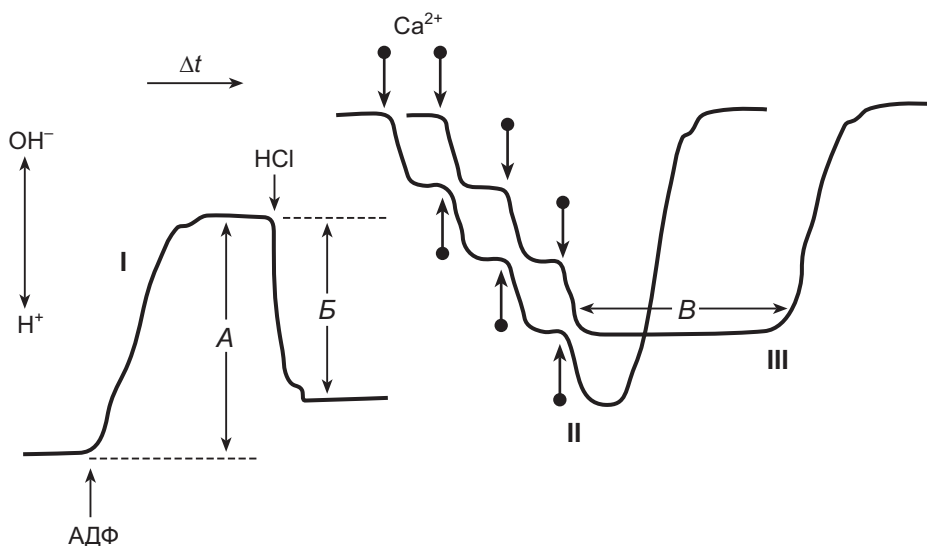


Рис. 18.3. рН-Метричний запис окисного фосфорилування (I), кальцієвої ємності (II) та часу утримання Ca^{2+} (III) в мітохондріях

За додавання до суспензії мітохондрій Ca^{2+} відбувається їхній активний транспорт крізь внутрішню мембрану мітохондрій, який супроводжується виходом протонів із матриксу (рис. 18.3, II) у співвідношенні 1:1 для мітохондрій печінки за наявності фосфату [Fiscum, Lehninger, 1980]. Послідовні додавання невеликих кількостей CaCl_2 (до остаточної концентрації 100 нМ за кожного додавання) дають змогу виявити фізіологічні особливості транспортування Ca^{2+} у мітохондрії. За визначення кальцієвої ємності мітохондрій (максимальної кількості поглинутого Ca^{2+}) їх титрують невеликими кількостями CaCl_2 аж до необоротних змін (рис. 18.3, II), коли настає масований і швидкий викид Ca^{2+} з матриксу, який супроводжується зміщенням рН середовища інкубації в лужний бік. Якщо навантаження мітохондрій катіонами Ca^{2+} субмаксимальне, то можна спостерігати певний час утримування нагромадженого у них Ca^{2+} (В), яке врешті також закінчується їхнім викидом із мітохондрій (рис. 18.3, III). Можна визначити також швидкість транспорту Ca^{2+} за виходом H^+ за кожного додавання CaCl_2 .

За допомогою відносно простого рН-метричного методу можна реєструвати швидкість окисного фосфорилування, швидкість поглинання іонів Ca^{2+} мітохондріями та кальцієву ємність мітохондрій, яка опосередковано свідчить про стабільність внутрішньої мембрани мітохондрій.

18.8. МЕТОД ЯДЕРНО-МАГНІТНОГО РЕЗОНАНСУ

Метод ЯМР базується на взаємодії зовнішнього магнітного поля з ядрами атомів, що мають магнітний момент або, іншими словами, ненульовий спін і непарне число протонів. До таких ядер належать ^1H , ^{23}Na , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P та інші. Протони атомних ядер постійно обертаються навколо своєї осі у спосіб, який описує рівняння Дж. Лармора:

$$\omega_0 = \gamma B_0, \quad (18.6)$$

де ω_0 – частота обертання протонів ядер (в Гц або МГц); γ – гіромагнітне відношення (42,5 МГц/Т для протонів ^1H); B_0 – сила магнітного поля (в Т) [Shild, 1990; McRobbie et al., 2007].

Ядра атомів з ненульовим спіном можуть вступати у взаємодію із зовнішнім магнітним полем і, як наслідок, переходити на інші енергетичні рівні (у стан збудження). Енергія цих рівнів строго квантована і залежить від природи ядра, електронів, які його оточують, різних внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій. У сучасних ЯМР-приладах збудження ядер викликають за допомогою “жорсткого” короткого радіочастотного імпульсу (radio frequency, RF) тривалістю кілька мікросекунд і потужністю кілька Вт. Тривалість імпульсу підбирають так, щоб ширина частотної смуги була більшою за ширину ЯМР-спектра на один–два порядки. За імпульсної спектроскопії отримують не звичайний спектр із видимими піками резонансу, а послідовність затухаючих резонансних коливань усіх резонуючих ядер, яку називають спадом вільної індукції (free induction decay, FID). FID, який виникає після зупинки радіочастотного імпульсу, супроводжується

зменшенням поздовжньої магнетизації (паралельної до зовнішнього сталого магнітного поля B_0) і виникненням перпендикулярної магнетизації (рис. 18.4).

Зазвичай у спін-ехо-ЯМР використовують кілька послідовних радіочастотних імпульсів (90° і/чи 180°), відстань між якими називають інтервалом до повтору (time-to-repeat, TR). У послідовності спін-ехо-ЯМР 90° -радіочастотні імпульси порушують фазність обертання протонів ядра відповідно до зовнішнього сталого магнітного поля та неомогенності внутрішнього магнітного поля. Після цього 180° -радіочастотні імпульси повертають фазність протонів ядра, посилюючи інтенсивність сигналу спаду вільної індукції. Часовий інтервал між радіочастотним імпульсом і спадом вільної індукції називають часом відлуння (echo-time, TE).

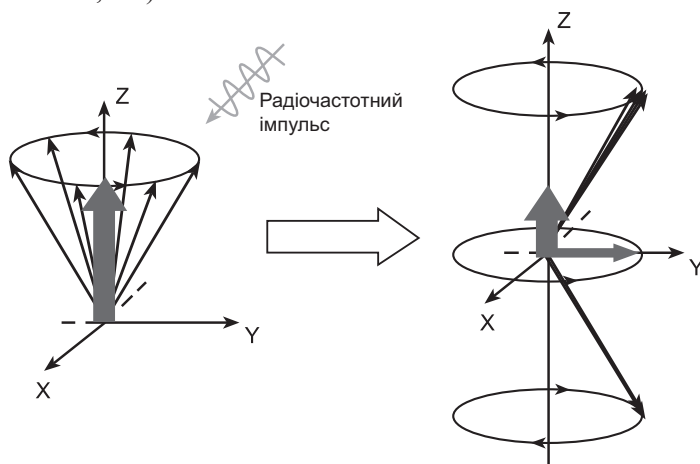


Рис. 18.4. Радіочастотні імпульси зумовлюють синхронізацію (резонанс) протонних спінів (чорні стрілки), внаслідок чого виникає поперечна магнетизація уздовж осі Y, а поздовжня (уздовж осі Z) – зменшується (широкі сірі стрілки) [Schild, 1990]

У медико-біологічних ЯМР-експериментах об'єкт, що перебуває у постійному магнітному полі ЯМР-машини, піддають дії радіочастотних і градієнтних магнітних полів. У котушці індуктивності, яка оточує досліджуваний об'єкт, виникає змінна електрорушійна сила. Її амплітудно-частотний спектр і перехідні у часі характеристики несуть інформацію про просторову густину резонуючих атомних ядер, а також про інші параметри ЯМР. Спектрометричний аналіз передбачає максимально можливе розділення спектральних ліній. Для цього магнітні системи регулюють таким чином, щоб створити максимальну однорідність поля.

Клінічні системи для ЯМР оснащені основним магнітом зі значенням зовнішнього магнітного поля від 0,3 до 1,5 Т. Експериментальні системи для дослідів на тваринах мають магнітне поле переважно від 4,7 до 9,4 Т. Недавно було сконструйовано ЯМР-систему з магнітним полем 21,1 Т [Schepkin et al., 2008]. Магнітне поле зовнішнього магніта має бути гомогенним, оскільки воно безпосередньо впливає на частоту обертання протонів. Гомогенність магнітного поля виражають в одиницях ppm (part per million) у визначеному об'ємі. Для

розрахунку цього показника різницю між максимальною та мінімальною силою поля ділять на усереднене його значення і множать на мільйон. Для покращення гомогенності магнітного поля використовують електричні або механічні прийоми, які називають шимінгом (shimming).

³¹P-ЯМР-метод дає змогу досліджувати фосфорвмісні макроерги та інші енергетичні показники в організмі *in vivo*, ізольованих перфузованих органах чи суперфузованих клітинах і мітохондріях.

Для запобігання пошкодженню впродовж тривалого ЯМР-експерименту ізольовані клітини (наприклад, кардіоміоцити) поміщають в агарозні кульки [Doliba Nic. et al., 1998; Doliba Nat. et al., 2000]. Суспензію клітин (1–1,5 мл) змішують із 6%-ною агарозою, розчиненою для клітин у середовищі MEM (Minimum Essential Medium). Суспензію клітин у рідкій агарозі (37 °C) швидко додають до 50 мл мінеральної олії та перемішують на магнітному змішувачі для утворення агарозних кульок розміром ~800–1000 мкм, що містять клітини. Кульки переносять у скляну ЯМР-пробірку (Ø10 мм; 2000–2500 кульок/см³) і прикривають зверху фільтром (розмір пор 10 мкм; рис. 18.4). Клітини суперфузують розчином MEM, насиченим сумішшю 95 % O₂ і 5 % CO₂, зі швидкістю 2–2,7 мл/хв, яку задають за допомогою перистальтичної помпи. Енергетичним субстратом для клітин є зазвичай глюкоза (5 мМ). Стандартом для ³¹P-спектрів слугує скляний капіляр, розташований під фільтром і заповнений фосфорвмісними сполуками (рис. 18.5). Умови суперфузії ізольованих мітохондрій детально описані у роботі Миколи Доліби та ін. [Doliba Nic. et al., 1998].

Спектроскопія ³¹P-ЯМР дає змогу оцінити інтенсивність сигналу фосфатовмісних макроергів, у т.ч. АТФ, АДФ, АМФ і креатинфосфату, а також розрахувати рівень внутрішньо- та зовнішньоклітинного pH.

Спектри ³¹P-ЯМР від кардіоміоцитів зручно реєструвати на вертикальних ЯМР-установках з 9,4 Т. Площу ³¹P-ЯМР-пиків розраховують переважно методом інтегрування за допомогою комп'ютерної програми, розробленої до відповідної ЯМР-установки або програми NUTS (Acorn NMR).

Спектри ³¹P-ЯМР від суперфузованих клітин в агарозних кульках можна реєструвати за резонансної частоти 162 мГц, радіочастотних імпульсів 36, 45 чи 60°, за інтервалу до повтору 620 мс та за акумулювання ~1000 сигналів протягом 10 хв [Osbacken et al., 1992]. Метод дає змогу, зокрема, реєструвати і вимірювати інтенсивність сигналу таких метаболічних показників як Φ_{H} , креатинфосфат (тільки у клітинах м'язів), β -АДФ і три піки АТФ (α , β і γ) (рис. 18.6). З усіх ³¹P-ЯМР-сигналів від молекул АТФ тільки β -АТФ пік не містить домішок сигналу від АДФ і тому його використовують як стандартний показник біоенергетичного статусу клітин у співвідношенні до рівня Φ_{H} . Кількість фосфорвмісних метаболітів визначають, порівнюючи їх зі сигналом від розчину певної фосфатної сполуки.

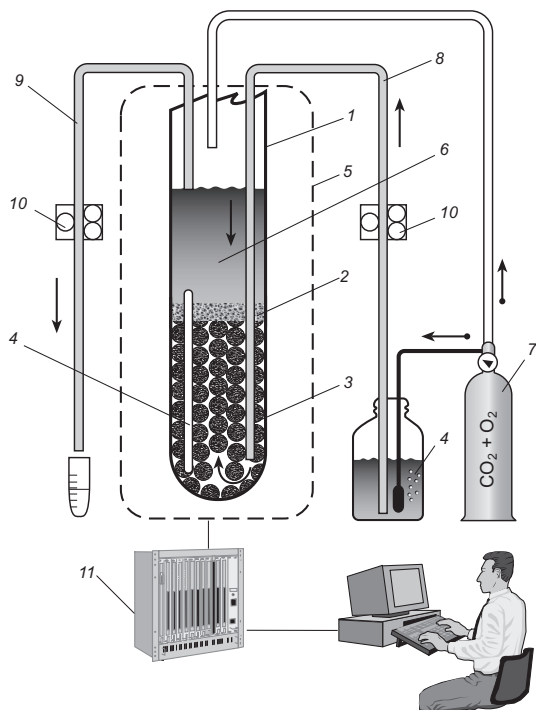


Рис. 18.5. Схема суперфузії клітин чи мітохондрій за умов експерименту ЯМР: 1 – скляна ЯМР-пробірка (10 мм); 2 – фільтр із порами; 3 – клітини чи мітохондрії в агарозних кульках; 4 – порівняльний стандарт із розчином фосфатної сполуки; 5 – ЯМР-система (9,4 Т); 6 – суперфузійний розчин (37 °С, рН 7,4); 7 – балон із газовою сумішшю (95% O₂ + 5% CO₂); 8 – лінія постачання MEM; 9 – лінія для відсмоктування надлишку розчину у пробірці; 10 – перистальтичні помпи; 11 – спектрометр і комп'ютер. Стрілками показано рух суперфузійного розчину та газової суміші

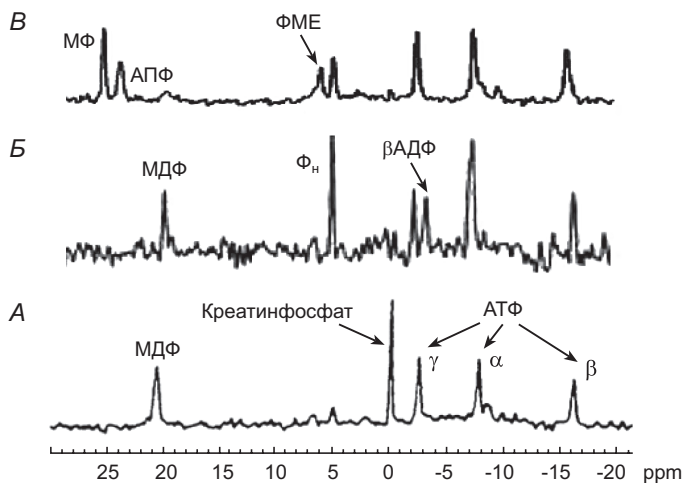


Рис. 18.6. Типові спектри ³¹P-ЯМР ізолюваних кардіоміоцитів (А), мітохондрій серця (Б) та клітин фібросаркоми RIF-1 (В): видно піки АТФ (β, α і γ), креатинфосфату, Ф_н та порівняльних стандартів фосфомоноєфіру (ФМЕ), метилендифосфонату (МДФ), метиленфосфату (МФ) і 3-амінопропілфосфонату (АПФ)

За ^{31}P -спектрами можна також визначити внутрішньо- та зовнішньоклітинне рН. Наприклад, у перфузованому серці рН у клітинах ($\text{pH}_\text{в}$) розраховують за зсувом піка $\Phi_\text{н}$ щодо піка $\alpha\text{ATФ}$ у рівнянні:

$$\text{pH}_\text{в} = 6,75 + \log [(\Phi_\text{н} - \alpha\text{ATФ}) - 10,85 / 13,25 - (\Phi_\text{н} - \alpha\text{ATФ})]. \quad (18.7)$$

^{13}C -ЯМР. Ненульовий спін ядра карбону дає змогу реєструвати метаболічні перетворення енергетичних субстратів вуглеводного походження методом ЯМР. Так, зокрема, було встановлено накопичення деяких субстратів циклу Кребса протягом ішемії за реєстрації ^{13}C -ЯМР-спектрів від суперфузованих мітохондрій серця щура (рис. 18.7). Як видно, за умов контрольної суперфузії мітохондрій (нижній спектр) за окиснення 5 мМ $[3-^{13}\text{C}]$ -пірувату і 5 мМ малату реєстрували невеликі піки α -кетоглутарату (C4, 30,5 ppm), малату (C3, 42,7 ppm), а піка сукцинату не було взагалі. Ішемія протягом 30 хв (верхній спектр) спричиняла очевидне зростання концентрації цих субстратів циклу Кребса: піки α -кетоглутарату і малату зростали в 1,9–2,5 разу, проте найвираженішим було нагромадження сукцинату (C2, 34,5 ppm). Натомість, відновлення суперфузії мітохондрій призводило до зникнення піка сукцинату і зменшення до контрольного рівня піка α -кетоглутарату (дані не наведено). Інші субстрати циклу Кребса (ізоцитрат, фумарат та ін.) або не були ідентифіковані, або вони не змінювалися внаслідок ішемії [Doliba et al., 2000; Бабський та ін., 2003].

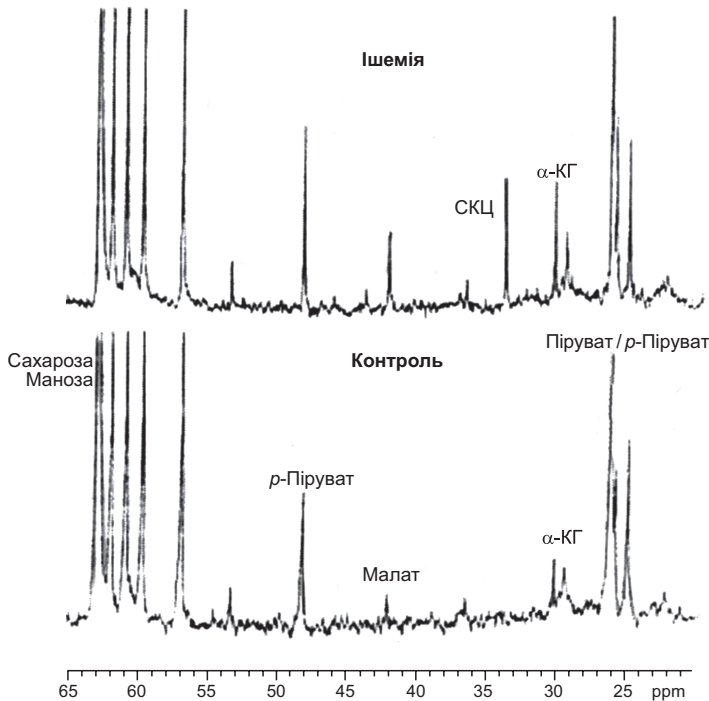


Рис. 18.7. ^{13}C -ЯМР-спектри суперфузованих мітохондрій серця щура за контрольних умов та за ішемії (30-хвилинна зупинка суперфузії): 3- ^{13}C -піруват (5 мМ) + малат (5 мМ); p-піруват – оксиформа пірувату [Бабський та ін., 2003]

18.9. ПОЗИТРОННО-ЕМІСІЙНА ТОМОГРАФІЯ

Для вивчення швидкості поглинання глюкози, а відтак змін гліколітичної активності часто використовують метод позитронно-емісійної томографії (ПЕТ). Для цього тваринам (наприклад, мишам) через хвостову вену вводять 2-флюор-2-деокси-D-глюкозу, мічену ^{18}F (^{18}F -ДГ), яка проникає у клітини подібно до звичайної глюкози, але далі не розщеплюється до пірувату чи лактату [Moran et al., 1999]. Обробку ПЕТ-зображень здійснюють за допомогою фільтра Ганнінга з лімітуючою частотою $4,2\text{ см}^{-1}$.

На рис. 18.8 наведено розповсюдження ^{18}F -ДГ у контрольних і лікованих протипухлинним препаратом 5-фторурацилом мишей перед ін'єкцією препарату і на третій день після неї. Розташування підшкірної фібросаркоми RIF-1 легко виявити на сагітальному й аксіальному зображеннях, оскільки прищеплена на задній лапці пухлина розташована близько до інтенсивного сигналу ^{18}F -ДГ, що надходить зі сечового міхура. Через три дні після введення препарату інтенсивність сигналу ^{18}F -ДГ достовірно зменшувалася порівняно з вихідним рівнем. Можна припустити, що зниження гліколітичних процесів у пухлині виникло внаслідок зсуву енергетичного обміну від гліколізу до окисного фосфорилування в результаті підвищення постачання кисню й ефективнішого використання глюкози клітинами, що не відмерли після хіміотерапії [Babsky et al., 2007].

Мічену 2-флюор-2-деокси-D-глюкозу найчастіше використовують як маркер для оцінки транспорту глюкози у клітину й активності гліколізу методом позитронно-емісійної томографії.

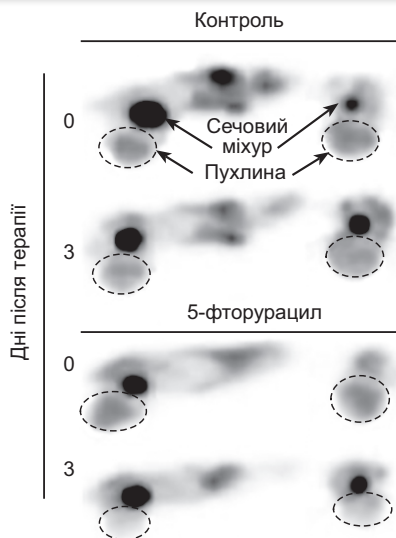


Рис. 18.8. Розповсюдження ^{18}F -ДГ у пухлині RIF-1 до (0-й день) і на 3-й день після ін'єкції 5-фторурацилу (150 мг/кг): наведено типовий приклад аксонального і сагітального зображення позитронно-емісійної томографії мишей С3Н контрольної та дослідної групи [Babsky et al., 2007]

Інші методи, які використовують у дослідженні біоенергетичних процесів, описано також в літературних джерелах [Saks et al., 1998; Остапченко, Михайлик, 2006; Влізло та ін., 2012; Skulachev et al., 2013; Личковський та ін., 2014].

Підсумок 18. МЕТОДИ КЛІТИННОЇ БІОЕНЕРГЕТИКИ

- Метод диференціувального центрифугування дає можливість ізолювати субклітинні фракції, в т.ч. і мітохондрії, зберігаючи за умов *in vitro* основні функціональні властивості мітохондрій *in vivo*.
- Дослідження енергетичних процесів в ізольованих клітинах дає змогу безпосередньо вивчати рецепторні та сигнальні механізми деяких фізіологічних функцій клітин.
- Пов'язані з енергетичними процесами ферменти, активність яких визначають класичними ензиматичними методами, не тільки є маркерами субклітинних фракцій і комплексів дихального ланцюга мітохондрій, але й дають можливість оцінити інтенсивність окисно-відновних і пероксидних процесів.
- Полярографічний метод, що ґрунтується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на платиновому катоді під час накладання сталого потенціалу, дає змогу моделювати в полярографічній комірці функціональні стани спокою, активності й відпочинку на мітохондріальному рівні.
- Ядерно-магнітний резонанс – явище резонансного поглинання радіочастотних хвиль ядрами атомів, які мають ненульовий спин і магнітний момент (^1H , ^{23}Na , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P та ін.) та розміщені у сильному зовнішньому магнітному полі. Спектри ^{31}P -ЯМР дають змогу оцінити енергетичний стан клітин і мітохондрій в організмі, ізольованому перфузованому органі та суперфузованій суспензії клітин чи мітохондрій.
- Методом позитронно-емісійної томографії реєструють появу γ -квантів, які виникають унаслідок анігіляції електронів з позитронами, що утворюються за β -розпаду радіонукліду. Цей метод часто використовують для оцінки транспорту глюкози у клітину й активності гліколізу.

**ЗАВДАННЯ І КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

1. Яким є принцип методу диференціального центрифугування для розділення субклітинних фракцій?
2. Що таке полярографія? Чому полярографічний метод вимірювання споживання кисню ізольованими клітинами чи мітохондріями з фізичної точки зору правильніше називати хроноамперометричним?
3. Як пояснити тимчасове прискорення дихання мітохондрій після додавання у полярографічну комірку АДФ?
4. На яких фізичних властивостях ядер атомів базується метод ЯМР?
5. Чому на спектрах ^{31}P -ЯМР спостерігають три резонансних піки молекул АТФ?
6. Чому мічену 2-флюор-2-деокси-D-глюкозу найчастіше використовують для оцінки транспорту глюкози у клітину й активності гліколізу методом ПЕТ?
8. Центрифугування клітинного гомогенату зі швидкістю 300–400 g використовують для осадження:
 - 1) ядер;
 - 2) незруйнованих клітин;
 - 3) мітохондрій;
 - 4) мікосом.
9. Індикатори фериціанід калію та дихлорфеноіндофенол використовують для визначення активності:
 - 1) цитохромоксидази;
 - 2) сукцинатдегідрогенази;
 - 3) піруватдегідрогенази;
 - 4) гексокінази.
10. Який метал найчастіше використовують для вимірювального електрода за полярографічної реєстрації поглинання кисню мітохондріями?
 - 1) срібло;
 - 2) залізо;
 - 3) золото;
 - 4) платину.
11. Добуток АДФ/О на швидкість дихання мітохондрій у стані 3 – це:
 - 1) швидкість гідролізу АТФ;
 - 2) швидкість окисного фосфорилування АДФ;
 - 3) дихальний контроль за Чансом;
 - 4) час окисного фосфорилування.
12. Співвідношення швидкостей дихання мітохондрій у стані 3 і 4 – це:
 - 1) дихальний контроль за Ларді;
 - 2) ефективність окисного фосфорилування (АДФ/О);
 - 3) дихальний контроль за Чансом;
 - 4) дихальний коефіцієнт (CO_2/O_2).



ВИКОРИСТАНА І РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Бабський А.М., Верлі С.Л., Доліба М.М.* та ін. Активация синтеза та окислення сукцината у мітохондріях впродовж і після ішемії серця: полярографічні та ЯМР дані // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2003. – № 4. – С. 26–41.
- Бабський А.М., Стефанків Ю.С., Коробов В.М.* Вплив сублетальних доз нітриту натрію на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях печінки щура // Укр. біохім. журн. – 1993. – Т. 65, № 6. – С. 106–108.
- Бабський А.М.* Функціональний стан клітин і вміст Na^+ за гіпоксії та канцерогенезу. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. (серія “Біологічні студії”). – 180 с.
- Влізло В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б.* та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – Львів: Сполом, 2012. – 764 с.
- Грин Н., Стаут У., Тейлор Д.* Биология. – Москва: Мир, 1990. – Т. 1–3.
- Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г.* Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохим. исслед. – Ленинград: ЛГУ, 1982. – С. 207–210.
- Захарова Л.И.* Определение активности глутаматдегидрогеназы в митохондриях тканей животных // Методы биохим. исслед. – Ленинград: ЛГУ, 1982. – С. 250–252.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
- Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.М.* Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцитина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
- Кривченко Р.С.* Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – Москва: Медицина, 1977. – С. 47–49.
- Личковський Е.І., Тіманюк В.О., Чалий О.В.* та ін. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. – Вінниця: Нова книга, 2014. – 464 с.
- Моин В.М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 2. – С. 724–727.
- Орехович В.Н.* Современные методы в биохимии. – Москва: Медицина, 1977. – 392 с.
- Остапенко Л.І., Михайлик І.В.* Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій: навч. посіб. – Київ: ВПЦ “Київський університет”, 2006. – 215 с.
- Шостаковская И.В., Бабский А.М.* Влияние адреналина на транспорт кальция и окислительное фосфорилирование в митохондриях // Укр. биохим. журн. – 1984. – Т. 54, № 1. – С. 57–62.
- Babsky A., Doliba Nic., Doliba Nat.* et al. Na^+ effects on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation in diabetic hearts // Exp. Biol. Med. – 2001. – Vol. 226, N 6. – P. 543–551.
- Babsky A.M., Zhang H., Hekmatyar S.K.* et al. Monitoring chemotherapeutic response in RIF-1 tumors by single-quantum and triple-quantum-filtered ^{23}Na MRI, ^1H diffusion-weighted MRI and PET imaging // Magn. Reson. Imaging. – 2007. – Vol. 25, N 7. – P. 1015–1023.
- Carpenter J.H.* New measurement of oxygen solubility in pure and natural water // Limnology Oceanography. – 1966. – Vol. 11, N 2. – P. 264–277.
- Chance B., Williams G.R.* Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state // J. Biol. Chem. 1955. – Vol. 217, N 1. – P. 409–427.
- Clark Jr L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z.* Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography // J. Appl. Physiol. – 1953. – Vol. 6, N 3. – P. 189–193.

- Dervartanian D.V., Veegeer C.* Studies on succinate dehydrogenase I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1964. – Vol. 92. – P. 233–247
- Doliba Nic., Wehrli S.L., Babsky A.M.* et al. Encapsulation and perfusion of mitochondria in agarose beads for functional studies with ^{31}P -NMR spectroscopy // *Magn. Reson. Med.* – 1998. – Vol. 39, N 5. – P. 679–684.
- Doliba Nat., Babsky A.M., Wehrli S.L.* et al. Metabolic control of sodium transport in streptozotocin-induced diabetic rat hearts // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2000. – Vol. 65, N 4. – P. 502–508.
- Fiskum G., Lehninger A.L.* The mechanisms and regulation of mitochondrial Ca^{2+} transport // *Fed. Proc.* – 1980. – Vol. 39, N 7. – P. 2432–2436.
- Kondrashova M.N., Goradze V.G., Medvedev B.I., Babsky A.M.* Succinic acid oxidation as the only energy support of intensive Ca^{2+} uptake by mitochondria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1982. – Vol. 109, N 2. – P. 376–381.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
- McRobbie D.W., Moore E.A., Graves M.J., Prince M.R.* MRI from picture to proton. – 2nd ed. – Cambridge: University Press, 2007. – 393 p.
- Moran J.K., Lee H.B., Blaufox M.D.* Optimization of urinary FDG excretion during PET imaging // *J. Nucl. Med.* – 1999. – Vol. 40, N 8. – P. 1352–1357.
- Nioka S., Shnall M., Conant E.* et al. Breast cancer detection of large size to DCIS by hypoxia and angiogenesis using NIRS // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 789. – P. 211–219.
- Nishimura M., Ito T., Chance B.* Studies on bacterial photophosphorylation. III. A sensitive and rapid method of determination of photophosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1962. – Vol. 59. – P. 177–182.
- Osbakken M., Ivanics T., Zhang D.* et al. Isolated cardiomyocytes in conjunction with NMR spectroscopy techniques to study metabolism and ion flux // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, N 22. – P. 15340–15347.
- Reardon J., Foreman J.A., Searcy R.L.* New reactants for the colorimetric determination of ammonia // *Clin. Chim. Acta.* – 1966. – Vol. 14, N 3. – P. 403–405.
- Saks V.A., Ventura-Clapier R., Leverve X.* et al. Bioenergetics of the Cell: Quantitative Aspects. – Dordrecht/Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. – 460 p.
- Saks V., Dzeja P., Schlattner U.* et al. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 571, N 2. – P. 253–273.
- Schepkin V.D., Elumalai M., Kitchen J.A.* et al. *In vivo* chlorine and sodium MRI of rat brain at 21.1 T // *MAGMA.* – 2014. – Vol. 27, N 1. – P. 63–70.
- Seglen P. O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Method. Cell Biol.* – 1976. – Vol. 13. – P. 29–83.
- Schild H.H.* MRI Made Easy (...well almost) – Berlin/Bergkamen: Schering, 1990. – 105 p.
- Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O.* Principles of Bioenergetics. – Berlin/Heidelberg: Springer-Science, 2013. – 304 p.
- Straus W.* Colorimetric determination of cytochrome c oxidase by formation of a quinonediimonium pigment from dimethyl-*p*-phenylenediamine // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1956. – Vol. 19. – P. 58–65.
- Swietach P., Youma J.-B., Saegusa N.* et al. Coupled $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca^{2+} and H^{+} ion signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, N 22. – P. E2064–E20673.
- Williams J.A., Korc M., Dormer R.L.* Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini // *Amer. J. Physiol.* – 1978. – 235, N 5. – P. 517–524.

ІМЕННИЙ ПОКАЖЧИК

- Бабський А. 9
 Беліцер В. 51, 159
 Бенда К. [Benda C.] 37
 Бенедикт Ф. [Benedict F.] 14
 Боєр П. [Boyer P.] 160
 Бухнер Е. [Buchner E.] 83
 Ванс Дж. [Vance J. E.] 43, 44
 Варбург О. [Warburg O.] 138
 Ватаманюк М. 9
 Вейс Дж. [Weiss J.] 181
 Височина І. [Высочина И.] 202
 Вільямс Г. [Williams G.] 279, 282, 284
 Вокер Дж. [Walker J.] 165
 Габер Ф. [Haber F.] 181
 Гакслі Х. [Huxley H. E.] 225
 Гансон Е. Дж. [Hanson J.] 225
 Гарден А. [Harden A.] 83
 Гаркаві Л. [Гаркави Л.] 202
 Гарман Д. [Harman D.] 187, 188
 Голдейн Дж. [Haldane J.S.] 15
 Гордій С. 9
 Горинь О. 9
 Гіббс Дж. [Gibbs J.] 27
 Грін Д. [Green D.] 160
 Дауранов І. 202
 Доліба М. М. 9
 Дуглас К. [Douglas C. G.] 15
 Ейлер-Хельпін Г. [Euler-Chelpin H.] 83
 Ембден Г. [Embden G.] 83
 Енгельгардт В. О. 51, 52
 Етуотер У. [Atwater W. O.] 14
 Заржецький Ю. 203
 Івабу М. [Iwabu M.] 270
 Іванова В. 203
 Йошида М. [Yoshida M.] 167
 Калі Т. [Cali T.] 220
 Камінський Ю. 204
 Канн Р. [Cann R.] 47
 Квакіна О. [Квакина О.] 202
 Кінгсбурі Б. Ф. [Kingsbury B. F.] 37
 Кларк Л. [Clark L.] 282
 Клевець М. 9
 Клігуненко О. [Клигуненко Е.] 203
 Козирева Є. [Козырева Е.] 204
 Колеснікова Н. 203
 Кондрашова М. М. [Кондрашова М. Н.] 9, 161, 194, 195, 196, 201, 202, 250, 251
 Корі Г. [Cori G.] 229
 Корі К. [Cori K.] 229
 Косенко О. 204
 Крайняя Ж. 203
 Кребс Г. А. [Krebs H. A.] 138
 Курганов Б. 197
 Лангендорф О. [Langendorf O.] 268
 Ларді Г. [Lardy G.] 286
 Лармора Дж. [Larmora J.] 289
 Ліпман Ф. [Lipmann F. A.] 51
 Лоурі О. [Lowry O.] 286
 Любарев А. 197
 Любімова М. [Любимова М.] 52
 Малюк В. 202
 Мак-Кормак Дж. [McCormack G.] 137
 Мак-Елрой В. [McElroy W.] 60
 Мейергоф О. [Meyerhof O. F.] 83
 Мітчел П. [Mitchell P.] 161, 162
 Мутускін А. 203
 Парнас Я. 83, 84
 Пастер Л. [Pasteur L.] 92
 Рачков О. 203
 Рачкова М. 203
 Резнік Б. 203
 Рекер Е. [Reker E.] 164
 Саакян Г. 204
 Саакян І. 204
 Сеглен П. [Seglen P.] 278
 Сент-Дьйорді А. [Szent-Gyorgyi A.] 52
 Сікевич Ф. [Siekevitz P.] 37
 Слейтер Е. [Slater E.] 159
 Скулачов В. П. [Скулачев В. П.] 11, 13, 161
 Сокирко Т. 202
 Спірідонов М. 204
 Суббароу Є. [Subbarow Ye.] 52
 Тимочко М. 9
 Усенко Л. 203
 Фентон Г. [Fenton H.G.] 181
 Ферма П. [Fermat P.] 195
 Фіске С. [Fiske C.] 52
 Чанс Б. [Chance B.] 282, 284, 286
 Шатерніков М. М. [Шатерников М. Н.] 14
 Шноль С. 195
 Шостаковська І. В. 9, 250
 Янг В. [Young W.] 83

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

Автотрофи 21

Аденілаткіназа (міокіназа) **60**, 61, 232–234, 237

Адреналін 40, 93, 96, 199, 204, 229, 242, **245**,
250–252, 287

АДФ 31, 32, **51–53**, 54–57, 61, 63, 64, 86, 89,
90, 92, 94, 123, 131, 138, 140, 154, 160, 162,
164–168, 169, 171, 192, 211, 212, 213, 220,
221, 227, 231–234, 237, 243, 284–288, 291
- транспортування **213**

Аквапорини 211

Аконітаза 130, 198

Аксонема 235

Активні форми кисню **175–180**, 182, 183,
188, 189, 193, 221, 267, 269, 274

Аланін 116–118, 120, 121

Аланінамінотрансфераза 118

Алкіл-радикал 180

Альдегід (-и)

- капроновий 182

- малеїновий 191

- малоновий 182

Аміак 118, 121, 209, 222, 281

Аміни

- біогенні 115

Аміногрупи 115–121, 124

Амінокислоти

- ароматичні 122

-- тирозин 122

-- фенілаланін 122

- гідрофільні 116

-- аспарагін 116

-- гліцин 116

-- глутамін 116

-- серин 116

-- тирозин 116

-- треонін 116

-- цистеїн 116

- глюкогенні 117

- “змішаного” типу 117

- катаболізм 115

- кетогенні 117

- неполярні та гідрофобні 116

-- аланін 116

-- валін 116

-- ізолейцин 46, 122

-- лейцин 116

-- метіонін 116

-- пролін 116

-- триптофан 116

-- фенілаланін 116

- окисне розщеплення 115

Амінооксіацетат 124

АМФ 52, 53, 56, 60, 61, 86, 103, 105, 233, 234

АМФ-залежна кіназа 61, 62, 105, 264, 268,
270, 273

Анаболізм 13, **19**, 22, 44, 52, 67, 134

Антиміцин А 148

Антипорт 210

Апоптоз 45, 219, 262, 264, 265, 267

Аргінін 46, 117, 118, 121

Аргіназа 118

Аргініно-сукцинат 118

Аспарагін 198

Аспартат 118

Аспаратамінотрансфераза

(глутамат-оксалоацетат трансаміназа) 122,
195, 197, 198, 250

АТФ 13, 19, 20, 30, 38, 39, 48, **51–60**, 61, 62,
64, 66, 67, 81, 83, 85–92, 98, 103, 108, 118,
123, 124, 127, 132, 136–138, 159, 163, 192,
197, 203, 210, 211, 219, 220, 226, 229, 230,
232–234, 236–238, 243, 248, 263, 267,
271–274, 283, 284, 286–288, 291

- гідроліз 31, 53, 231

-- кількість енергії 30, 53

-- чинники вивільнення енергії 54

- енергія гідролізу 32, 56, 132, 227, 228

- синтез 20, **53**, 101, 105, 131, 159–172, 205,
213, 228, 235, 283

АТФ-аза (-и) 38, 58, 164, 235, 238

Ацетил-КоА 38, **66**, 67, 81, 90, 101, 105, 226

Ацетил-КоА-карбоксилаза 105

Ацетилхолін 225, 226, 250–252

- екзоцитоз 225

- рецептор 226

- синтез 225

Ацетилхолінестераза 226
 Ацетоацетат 109, 110, 117
 Ацетоацетил-КоА 110
 Ацетон 109
 Ацидоз 17, 110
 - метаболічний 202, 203
 Ацил-КоА 102–106, 111, 112, 147, 155, 212
 Ацилкарнітин 104, 111
 Ацил-КоА-ацетилтрансфераза (β-кетотіолаза, β-кетоацил-КоА-тіолаза) 106, 109
 Ацил-КоА-дегідрогеназа 106, 108, 147
 - ізоферменти 106
 - простетична група 106
 Ацил-КоА-синтаза (тіокіназа) 40, 102
 - ізоферменти 102
 Ацинуси панкреатитів 279
 5'-АМФ-залежна протеїнкіназа (АМФК) 61, 62, 105, 264

Барбаміл 145

Барбітурат (-и) 145, 262

Білок (-лки) 115

- антиапоптинні 264
- інтегральні мембранні 147, 150, 153, 169, 211, 222
- ковалентна модифікація 137
- мономери 116
- пороутворюючі 209
- проапоптинні 264
- Ріске 148
- роз'єднувальний 153
- Bcl-2 265
- CD36 102

Біоенергетика 11

- закони 13
- значення 11–12
- наука 11–13
- особливості біологічної енергетики 12

Біоломінесценція 59–60

Біосинтез 19, 43, 97, 104, 107, 115, 121, 186, 264

Бродіння

- глюкози 92
- молочнокисле 90
- спиртове 91

Бурштин 191, 205

Бутирил-КоА 106

Валін 116, 117, 122

Визначення активності ферментів

- глутаматдегідрогенази 281

- глутатіонпероксидази 281
- каталази 281
- моноамінооксидази 281
- сукцинатдегідрогенази 279
- супероксиддисмутази 281
- цитохромоксидази 280

Виснаження

- карбогідратне 109

Відновник (відновний агент, донор) 70

Війки 235–236, 238

Вітамін

- B₁ (тіамін) 128
- B₂ (рибофлавін) 77, 128
- B₃ (ніацин) 76, 77, 128
- E 183, 186
- C 187

Галактоза 94, 263

Галактоземія 94

D-гексози 94

Гексокіназа 86, 242

- ізоформи 86
- 4 типу (глюкокіназа) 242

Гем 149, 184

- α 150, 155
- b 147, 148, 155, 193
- α3 150

Гемоглобін 134, 153

- фетальний 260

Гепатоцити 278

- ізолювання 278

Гетеротрофи 21

Гідрогену пероксид (H₂O₂) 107, 151, 177, 178, 181, 184, 185, 193

Гідрокарбонати 17, 248

β-Гідроксибутиратдегідрогеназа 110

Гідропероксиди 180, 182

- ліпідів 181, 185
- органічні 179

L-Гідроксіацил-КоА 106

Гідроксид-іон (OH⁻) 177

Гідроксил-радикал (OH[•]) 180, 181, 175, 177, 189

Гідроксиметилглутарил-КоА-ліаза 110

Гідроксиметилглутарил-КоА 110

Гідроксиметилглутарил-КоА-синтаза 110

Гіпоглікемія 110

Гіпоксія 90, 105, 182, 219, 263, 264, 272–274, 286

Гіпотеза

- ковзання 225

- Гістидин 117, 131, 167, 192
 Глікоген 93, 229, 231, 245, 246
 Глікогеноліз 232
 - внутрішньоклітинний 93
 Глікогенфосфорилаза 93
 - ізоформи 93
 Гліколіз 61, 81–91, **83**, 231, 232, 246, 263, 265, 267, 274
 - друга стадія 87–90
 - енергетичний баланс 91
 - загальне рівняння 91
 - перша (підготовча) стадія 85–87
 - регулювання 96
 Гліцеральдегід-3-фосфат 86–90, 92, 98
 - альдегідна група 89
 Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа 89
 Гліцерил-3-фосфатдегідрогеназа 147
 Гліцерол 102
 Гліцерол-3-фосфат 147, 155
 Гліцеролкіназа 102
 Гліцеролфосфатдегідрогеназа 102
 Гліцин 116, 187
 Глутаматдегідрогеназа 43, 121, 281
 Глутамат 271, 272, 273
 Глутамін 56, 116–**118**, 122, 195, 198, 263, 265, 281
 - концентрація 118
 - синтез 118
 Глутаміназа 118
 Глутатіон 184, 185, **187**, 189
 - відновлений 184
 - окиснений 184
 Глутатіонпероксидаза 184, 185, 187, 189
 Глутатіонредуктаза 185, 187, 189
 Глутатіонтрансфераза (-и) 185, 187, 189
 Глюкагон 242–244
 - ефекти 244
 Глюкоза 16, 21, 30, 61, 69, 81, **83**, 84, 87, 88, 90–94, 96, 98, 110, 115, 117, 118, 124, 133, 138, 204, 228, 235, 242–245, 253, 263, 264, 269–271, 274, 294, 295
 - дефіцит 105
 - рівень 242, 243, 245, 269
 - розщеплення 84–86
 - синтез 229, 249
 Глюкокіназа 242
 Глюкозо-1-фосфат 29, 30, **93**, 94, 98
 Глюкозо-6-фосфат 29, 30, 58, 86, 93, 94, 97, 98, 229, 243, 263
 Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа 97
 Глюкозо-6-фосфатаза 94
 Глюкокіназа **86**, 242
 Глюконеогенез 62, **94–96**, 229, 245, 249
 - специфічні ферменти 94
 Голодування 109, 245, 249
 Гомогенат 278
 Гомогенізатор Поттера–Ельвегейма 277
 Градієнт
 - електрохімічний (протонний) 123, 148, 152, 153, 161, 162, 164, 165, 169, 170
 -- компоненти 152
 Група
 - аміна 116
 - гемова 134, 149
 - карбоксильна 116
 ГТФ 94, 98, 131, 132, 139, 192, 205
- Д**екарбоксилювання
 - окисне 127
 Дефекти
 - генетичні ферментів 94
 Джгутики 235, 236, 238
 - бактерій 236
 Дигідроксіацетонфосфат 86
 Дигідроліпоїлдегідрогеназа 128, 129
 Дигідроліпоїлтрансацилаза 128
 Динейн 236
 Дифузія 210
 - полегшена 210
 - проста 210
 Дихальний коефіцієнт 15, **16**, 17
 - білків 16
 - вуглеводів 16
 - жирів 16
 - усереднений 16
 Дихальний ланцюг 41, 43, 46, 70, 76, 81, 89, 101, 106, 108, 109, 127, 132, **143**, 152, 154, 155, 159–162, 164, 170, 171, 177, 178, 185, 186, 188, 192, 193, 212, 247, 248, 257, 272, 273
 - комплекс I 144, **144–146**, 178, 261
 - комплекс II 144, **146–147**, 192, 205, 279
 - комплекс III 144, **148–149**, 178
 - комплекс IV 144, **150–151**, 264, 280
 - комплекс V **164–166**
 - порушення 257, 259, 261, 262
 1,3-Дифосфогліцерат 55, 63, **64**, 67, 87, 89
 Діабет цукровий **269**, 270, 274
 Діацилгліцеролі 102
 2,4-Діеноїл-КоА-редуктаза 106
 Діоксіацетонфосфат 102

Еквівалент (-и)

- відновні **71**, 144, 145, 147, 154, 170, 171, 212, 246

-- транспортування 212

- калоричний кисню 16

Електрод Кларка 282, 283

Електрорушійна сила **69**, 71

Енергія

- вільна Гіббса 26

-- адитивність змін 31–33

-- зміна вільної енергії Гіббса 32

-- зміна стандартної вільної
цитратсинтазної реакції 130

-- дійсна зміна вільної енергії 30

- гідролізу АТФ 67

- гідролізу фосфоенолпірувату 90

- гідролізу креатинфосфату 64, 232

- гідролізу фосфорильованих сполук 55

- 1,3-дифосфогліцерату 55, 63, 64

- джерело 248

- електричного потенціалу 12, 152

- електрохімічного градієнта 271

Енергетичний обмін **18**, 19, 52, 61

Еноіл-КоА-гідратаза 106

Ентальпія 25, 26, **27**, 33

Ентропія 25, 26, **27**, 28, 31, 33

Еритроцити 38, 53, 84, 87, 90, 97

- заражені *Plasmodium falciparum* 102

Естерифікація 102

Естрогени 185, **186**

Етан 182

Етанол 91

Ефект

- Варбурга 262, 263, 264, 274

- Кребтрі 264

- Пастера 243

Жир

- бурий 153

Заборгованість

- киснева 230

Заклякання

- трупне 227

Закон (-и)

- біоенергетики 13

- Рубнера 18

- термодинаміки I 25

- термодинаміки II 26

Залоза

- підшлункова 242

Зв'язок

- високоенергетичний тіоефірний 130, 131, 160

- *транс*-типу 110, 131

- фосфоангідридний 54, 58, 74, 31

- *цис*-типу 110

Ізолейцин 46, 122

Ізоцитрат 76, 132, 137, 145, 194, 195, 244, 245, 283

- утворення 130

- “деінгібуючий” вплив 199

- транспортування 212

Ізоцитратдегідрогеназа **130**, 136, 137, 219, 265

Інсулін 242, 243, 244, 270

- ефекти 244

- секреція 243, 244

Інсулінорезистентність 269

Інсульт 269, 271, 273, 274

Інфаркт міокарда 235, 267, 274

Ішемія 235

Йодацетат 89**К**алориметрія

- пряма 13

Калориметр Етуотера–Бенедикта 14

Калоричний еквівалент кисню 16

Канал (-и)

- АТФ-чутливі K^+ -канали 213, 243, 252

- аквапорини 211

- потенціалзалежні аніонні канали (VDAC)
211, 215, 222, 263

- ріанодинчутливі 216, **217**

Карбамоїлфосфат 115, 118

Карбаніон 131

Карбоангідраза 247

Карбоксин 193

α -Карбон 116

Кардіоліпін 209

Кардіоміоцити 266

- апоптичні 267

- ізолювання 279

- мітохондрії 266

- некротичні 267

- ушкодження 267

Карнітин (L) (вітамін B_{11}) **104**, 107, 212, 259, 262

- біосинтез 104

- дія 104

Карнітин-ацилтрансфераза I 270

Каротиноїди 185, **186**

Катаболізм 13, **19**, 22,

- амінокислот 115, 118–122

- глюкози 98

- пірувату 91

Каталаза 107, **184**, 185, 189

- визначення 281

β -Кетоацил-КоА 106

α -Кетоглутарат 76, 118, 120, 121–124, 130, 131, 133, 134, 136, 145, 171, 194–198, 204, 247, 250–253, 264, 265, 283, 288, 293

- транспортування 212

Кетоз 110

Кетонові тіла **109–110**, 124, 204, 228, 235, 249, 253

β -Кетогілаза (β -кетоацил-КоА-тілаза) **109**

Кисень 14, 15, 21, 37, 143, 150–152, 154, 155, 159, 168, 175, **176**, 212, 230, 231, 282, 284

Кисневий борг 17

Кислота (-и)

- аскорбінова 183, **187**, 189

- бурштинова (янтарна, бутандіонова

кислота, етан-1,2-дикарбонова, *див.* сукцинат) 191–192, 250

- глутамінова 187

- жирні 39, 40, 42, **101–109**, 245, 269–271

-- активція 102–105

-- арахідонова 101, 107

-- вільні 102, 182

-- естерифікація 102

-- лінолева 101, 107

-- ліноленова 101, 107

-- міристинова 101

-- насичені 101

-- ненасичені 101

-- олеїнова 101

-- окиснення 43, 61, 76, **101**, 102, 270

--- у пероксисомах 107

--- енергетична цінність 109

-- пальмітинова 101

-- пальмітолеїнова 101

-- поліненасичені 101

--- арахідонова 101, 107

--- лінолева 101, 107

--- ліноленова 101, 107

-- стеаринова 101

-- синтез 76, 97

-- транспорт 105

-- карнітин-опосередковане перенесення 104

-- β -окиснення 105–108

- нуклеїнові 19, 52, 97, 98, 178–180, 189, 258

- пантотенова 128

- сечова 121

- хлоридна 246

-- секреція 246–248

Клітини

- β -клітини 242, **243**, 252, 269, 270

- парієтальні шлунка **247**, 253

- ракові 262, 263

-- особливості 262, 263

Креатинфосфат 53, **64**, 66, **231–232**, 235

- використання 64

- гідроліз 53, 63, **64**

Криста (-и) 42

Коефіцієнт

- АДФ/О (Р/О) 159, 202

-- розрахунок 287

- дихальний 15, 17

-- білків 16

-- вуглеводів 16

-- жирів 16

-- усереднений 16

- корисної дії

-- окиснення сукцинату 197

-- м'язів 234

Комплекс

- α -кетоглутаратдегідрогеназний 130, 131, 137

- I дихального ланцюга 144, **144–146**, 178, 261

- II дихального ланцюга 144, **146–147**, 192, 205, 279

- III дихального ланцюга 144, **148–149**, 178

- IV дихального ланцюга 144, **150–151**, 264, 280

- V комплекс дихального ланцюга **164–166**

- піруватдегідрогеназний **127**

Константа (-и)

- Міхаеліса–Ментен (Michaelis–Menten) 86

-- гексокінази II 86

- рівноваги 28–32, 33

-- аденілаткіназної реакції 61

- седиментації 46

- фізичні у термодинаміці 33

Контрактура 228

- втоми 228

Контроль

- дихальний

-- за Ларді 286

-- за Чансом 286
 - реципрокний алостеричний 96
 Кофермент
 - А 102, 111, 128
 - Q (убіхінон) 108, 144, 146, **147**, 148, 149, 154, 155, 171, 172, 185, 192, 193, 205, 262
 Крохмаль 83
Лактат 17, 90, 94, 98, 202, 229–232, 243, 252, 260–263, 267, 274
 Лактатдегідрогеназа 243, 263, 274
 Лактоферин 183
 Ланцюг
 - дихальний (електронтранспортний) 265
 -- комплекс I 144, **144–146**, 178, 261
 -- комплекс II 144, **146–147**, 192, 205, 279
 -- комплекс III 144, **148–149**, 178
 -- комплекс IV 144, **150–151**, 264, 280
 -- комплекс V **164–166**
 -- розміщення 43, **143**
 - електронтранспортний (див. дихальний)
 Ланцюжки
 - аліфатичні 101
 -- насичені 101
 -- ненасичені 101
 -- полінасичені 101
 Лейцин 116, 122
 Лихоманка 110
 Ліпаза (-и) 102
 Ліпоат 128, 131
 Лімфоцит (-и) 199–201
Макрофаги 102
 Малат 76, 120–124, 131, 132, 135, 137, 145, 170, 194, 196, 198, 211, 212, 244, 245, 247, 251, 283, 293
 Малатдегідрогеназа 43, 123, 132
 Малонат 193
 Малоніл-КоА 105
 Маноза 94
 Матрикс 40, **43**, 45, 48, 104, 105, 107, 111, 118, 123, 127, 128, 130, 136, 144–148, 151–153, 161–166, 168–171, 178, 183, 197, 209, 212, 213, 215–216, 218–220, 222, 263, 269, 272, 289
 Мембрана
 - ендоплазматичного ретикулуму
 асоційована з мітохондріями (МAM) 43–45
 - мітохондрій 40, 41, 42
 -- внутрішня 42–43
 -- проникність 209

-- зовнішня 40–41
 --- транслоказа 211
 -- транспортувальні системи 43, 44, 209–222
 Метаболон 197
 Метилмалоніл-КоА 122
 Метіонін 46, 104, 116, 117, 122
 Метод (-и)
 - Вільямса 279
 - диференціального центрифугування 277
 - ензиматичні (визначення активності)
 -- глутаматдегідрогенази 281
 -- глутатіонпероксидази 281
 -- каталази 281
 -- моноамінооксидази 281
 -- сукцинатдегідрогенази 279
 -- супероксиддисмутизи 281
 -- цитохромоксидази 280
 - НАД(Ф)Н-флюороскопії 267
 - позитронно-емісійної томографії 263, 294–295
 - полярографічний **282**, 287
 - ядерно-магнітного резонансу 289–293
 - ³¹P-ЯМР-спектроскопії 267, 289–293
 - рН-метричний 287–289
 Метаболізм 13, **19**, 22, 75, 135, 180, 185, 199, 202, 220, 245, 259, 262, 263, 265
 - амінокислот 115–122
 - анаеробний 232
 - анаболічний 262
 - АТФ 58, 243
 - вуглеводів 81–99
 - жирних кислот 101–107, 155
 - жирової тканини 245
 - кисневий 179
 - м'язів 66, 237, 245
 - печінки 245
 Міксотіазол 148
 Міоглобін 134, 235
 Міозин 227
 Міокіназа (аденилаткіназа) 60
 Місточок (-чки)
 - поперечний 227
 Мітофузин 43
 Мітохондрія (-ії)
 - буфер іонів Ca²⁺ 220
 - виділення 278
 - ДНК 43, **45–46**
 - кількість 38–39
 - β-клітин 243
 - матрикс 43

- мембрана
 - внутрішня 42–43
 - кристи 42
 - транслоказа 211
 - зовнішня 40–41
- метаболічні стани 282, **284–286**
- міжмембранний простір 41
- ушкодження 258
- походження 37
- розміри 40
- розташування 40
- форма 40
- Міокард 235
 - субстрати окиснення 235
- Міопатія (-ії) 259
- Мозок 248, 271
- Молочна кислота (*див.* Лактат) 17, 51
 - продукти дисоціації 17
- Мононуклеотид
 - флавіновий 145, 146
- Моноаміноксидаза
 - визначення 281
- Моноацилгліцерол (-и) 102
- М'яз (-и) **225**, 237
 - білі 229, 231
 - гладенькі 225
 - джерело енергії 228–229, 232, 237
 - ККД 234
 - серцевий *див.* Міокард 225, **235**, 238
 - скелетні (поперечносмугасті) 225, 229, 270
 - принцип роботи 225
 - теплопродукція 234
 - червоні 229
- НАД** 74, 75, 76, 79, 81, 87, 89, 90, 92, 93, 106, 128, 130, 131, 136, 137, 170, 209, 246
- НАДН 19, 75, 83, 84, 87–92, 94, 98, 105–109, 112, 122, 123, 127, 128, 132, 136–140, 143–146, 148, 152, 153, 161, 163, 168, 170–172, 211–213, 222, 243, 248, 253
- НАДН-дегідрогеназа 46, 106, 176
- НАДН-оксидаза 178
- НАДН-цитохром-с-редуктаза 178
- НАДФ 19, 73, 75, 76, 79, 130, 209, 222
- НАДФН **19**, 73, 75, 96–98, 106, 107, 145, 185, 212, 244, 264
- НАДФН-цитохром-с-редуктаза 178
- Нейрон (-и) 248, 253, 272
- Некроз 219, 267, 272, 274
- Неоплазія 264, 274
- Ніацин (вітамін B₃) 77, 128

Нікотинамід 74–76, 89

Нітроген 75, 121

- виведення 121

Нуклеотиди

- піридинові **74**, 75, 79

- піримідинові 134

- пуринові 134

- флавінові **74**, 79, 145, 146

Нуклеотиддифосфаткіназа 131

Обмінник

- глутамат/ОН⁻ 122

- H⁺/Ca²⁺ 219

- Na⁺/H⁺ 218

- Na⁺/Ca²⁺ 218

Оксалоацетат 122, 124, 130, 132–134

Оксиген

- активні форми 175–179, 180, 182, 183, 185, 188, 189, 221, 267, 269, 274

- генерування 176–177

- джерела 177–178

- концентрація 178

- роль 179

Окиснення

- α-окиснення 107

- β-окиснення 105

- етапи 105–106

- у пероксисомах 107

- вільнорадикальне 179–182

- стадії 180, 181

- ініціювання 180, 181

- обрив (термінація) 180, 181

- розгалуження 180, 181

- інтенсифікація 180, 182, 185, 186

Окисник (окиснювальний агент, акцептор) 70, 72

Оксалоацетат 117, **121**, 123, 124, 130, 132–137, 139, 170, 171, 194–196, 199, 250

Організм (-и) 11, 14–17, 19, 21, 22, **26**, 32, 37, 39, 42, 47, 52, 53, 58, 59, 61, 62, 64, 83, 84, 90, 93, 98, 102, 104, 109, 115, 117, 118, 135, 138, 175, 180, 182, 185–189, 191, 195, 197, 199–201, 206, 230, 231, 234, 235, 248, 249, 257, 271,

- енергетичний обмін 13

- термодинамічно відкрита система 12, 26

Орнітин 118

Основний обмін 18

- жінок 18

- умови визначення 18

- чоловіків 18

Острівці Лангерганса (Langerhans) 242

- α -клітини 242
- β -клітини 242
- δ -клітини 242
- PP-клітини 242

Окисне фосфорилування

- ефективність (АДФ/О) **168**, 202, 287
- час 287
- швидкість 287

Окисно-відновна пара (редокс-пара) 69–**70**, 152, 187

Окисно-відновний потенціал 70, **71**

- стандартний 72–74

β -Оксибутират 109

Патерн

- функціональний 199
- глибокий спокій 199
- оперативний спокій 199
- стан помірної активації 199
- гіперактивація 199
- пригнічення 199

Пелагра 76, 77

Пентан 182

Пентоза (-и) 83

- утворення 96

Пентозофосфат 97, 98

Переносник (-и) 93, 94, 147, 149, 210, 246

- білки 143, 181
- глутамат-аспаратний 122, 123
- глюкози (GLUT) 242
- GLUT 1 87
- GLUT 2 86, 87
- GLUT 3 273
- GLUT 4 270
- дихального ланцюга 152, 286
- електронів 19, 23, 69, 72, 76, 78, 81, 90, 127, 139, 144, 148, 151, 152, 185, 186
- карнітиновий 212
- малат-аспаратний 121, 213, 243
- пірувату 212

Пероксид-аніон 175, **177**, 189

Пероксиди 176, 186

- ліпідів 180, 182, 185

Пероксисома (-и) 107

- морфологія 107
- система β -окиснення 107

Печінка 77, 86, 87, 102, 109, 118, 219, 228, 229, 245, 258, 271, 277, 278, 279, 288, 289

- маркер порушення функцій 281
- мітохондрії 42, 43, 170, 188, 202, 216, 250

Піруват 43, 63, 76, 83, 84, 85, 87, 88, 90, 98, 117, 118, 121–123, 128, 130, 132, 135, 136, 138, 139, 145, 162, 168, 194, 195, 198, 202, 209, 211, 212, 222, 226, 228, 229, 243, 252, 260, 261, 263, 284, 294

- метаболізм 259, 262, 273

- перетворення 90–91, 92, 94, 127, 140

Піруватдегідрогеназа **128**, 137, 138, 219, 245, 263, 265

Піруваткарбоксилаза 94, **135**, 245

Піруваткіназа 83, **90**, 263

Пневмонія

- немовлят 202

Поліпептид панкреатичний 242

Помпа (АТФ-аза)

- Ca^{2+} 267
- $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ 248
- $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ 228, 248, 267, 271, 273

Пора мітохондріальна транзійної проникності 216, **219**, 265, 267, 272

- роль 219
- природа 219

Порин (-и) 222

Потенціал

- відновний 98, 150, 152
- дії 225–227
- електрохімічний 151, 152, 161, 169, 183, 209, 213, 214, 219, 236, 243, 248, 266, 286
- стандартний відновний 146, 149, 152
- трансепітеліальний 248

Потенціалозалежні аніонні канали (VDAC) 45, **211**, 215, 219, 222, 263

Препарат (-и)

- протипухлинні 265

Пролін 116, 117, 121

Пропіоніл-КоА 122

Протеїнкіназа 129, 137, 154, 264

- АМФ-залежна 61, 62, 105, 264, 268, 270, 273

Протофібрила (-и) 225

- товсті 225, 227
- тонкі 225, 227

Пурин (-и) 121

Радикал (-и) 147, 175, 177, 187, 267, 273

- алкіл 180
- вільні 77, **176**, 179–181, 185, 186, 219
- гідроксильні 187
- карбонільні 187
- кисню 176, 177, 267, 273
- токофероксильні 185, 186

Рак 262–266

Реакція (-ії)

- аденілаткіназна (міокіназна) 232, 234, 237
- анаболічна (-і) 19, 251
- анаплеротична (-і) 135
- вільнорадикальна (-і) 183
- екзергонічна (-і) 27, 31, 32
- екзотермічна (-і) 27
- ендотермічна (-і) 27
- ендергонічна (-і) 27, 31
- катаболічна (-і) 19, 232, 251
- окисно-відновні 19, 69–74, 287
- стрес 182, 245
- термодинамічно вигідні 31
- Фентона 181

Редокс-пара (*див.* Окисно-відновна пара)

Реперфузія 267

Респіраторний апарат Дугласа 15

Рецептор

- N-метил-D-аспаргату (NMDA) 272, 274
- PGC-1 α 270

Рибозо-5-фосфат 96

Рибофлавін (вітамін B₂) 77, 128

D-рибоза 96

D-рибулозо-5-фосфат 97

Розчин Кребса–Генселейта
(Krebs–Henseleit) 279

Ротенон 145

Рух 225

- амебоїдний 225
- джгутиковий 225
- м'язовий 225

Сарколема 226

- деполяризація 226

Саркомер 225

Саркоплазма 227

- підвищення концентрації іонів Ca²⁺ 227

Середовище

- гомогенізації 277
- дихання мітохондрій 283

Серин 116, 117, 121, 137, 264

Серце 61, 101, 202, 203, 228, 235, 238, 245,
260, 266, 267–269, 271, 277–279, 283, 293
- мітохондрії 42, 43, 170, 214, 216, 218, 250,
252, 288, 292

Сечовина (-и) 115

- цикл 117–121, 124, 138

Сила

- електрорушійна 69, 71, 290

- протонрушійна 152, 159, 161–163, 165,
169, 267

Симпорт 210

Синдром

- Кернса–Сейра (Kearns–Sayre) 259
- Лебера 261
- Лі 194
- Пірсона 260
- MELAS 260
- MERRF 260

Синтез 19

- АТФ 20, 51–53, 64, 83, 89, 108, 109
- білків 37, 45
- глюкози 94
- жирних кислот 61, 97
- нуклеїнових кислот 97, 98
- нуклеотидів 97, 98

Система (-и)

- антиоксидантного захисту 182–187
- виведення кальцію з мітохондрій 218,
219, 222
 - H⁺/Ca²⁺-обмінник 219
 - Na⁺/H⁺-обмінник 218
 - Na⁺/Ca²⁺-обмінник 218
- надходження кальцію в матрикс
мітохондрій 215, 222
 - ріанодинчутливі Ca²⁺-канали 216, 217
 - система швидкого поглинання 215, 216
 - Ca²⁺-уніпортер 215, 216, 218
- реципрокні субстратно-гормональні 251,
253
- термодинамічна 12, 25, 26
 - показники 26
 - вільна енергія Гіббса 26
 - ентальпія 27
 - ентропія 27

Сік травний 246

Скевнджер-рецептори 102

Скорочення 225–227

Соматостатин 242

Способи перенесення електронів 70–71

- безпосереднє 70
- у складі атомів водню 70
- у складі гідрид-іона 71
- пряма взаємодія відновника з киснем 71

Спринтер 230

Стани метаболічні за Чансом 282, 284

Старіння 187, 188, 259

- теорії
 - вільнорадикальна 187
 - мітохондріальна 188

- Стрес
- оксидативний 273
- Сукцинат (бурштинова кислота, янтарна кислота, бутандіонова кислота, етан-1,2-дикарбонова кислота) 131, 144, 146, 147, **191**, 194–197, 205, 206, 212, 247, 250–253, 262, 264, 280
- адаптаційна реакція активації 202
- окислення 132, 147, 152, 155, 162, 168, 192, 283, 284, 287, 293
-- механізм 193
- продукція 192
- терапевтична дія 202–204, 205
- утворення 131, 192, 195, 198
- фармацевтичний препарат 192
- харчова добавка 191
- Сукцинатдегідрогеназа (сукцинат-КоQ-редуктаза) 78, **146**, 147, 155, **193**, 264
- будова 193
- гіперактивація 199
- інгібітори 193
-- карбоксин 193
-- малат 193
-- малонат 193
-- оксалоацетат 193
-- теноїлтрифлуороацетон 193
- мембраностабілізуюча дія 202
- радіопротекторні властивості 204
- Сукциніл-КоА 119, 121, 124, 130–132, 134, 138, 194, 195, 205
- Сукциніл-КоА-синтаза 131
- Сукцинілфосфат 131, 192,
- Супероксид-аніон 175, **176**–178, 181, 183, 186, 189, 193, 194, 267, 281
- Супероксиддисмутаза 183
- визначення активності 281
- купрум/цинквісна 184
- манганвісна 183
- ферумвісна 183
- Сфінгомієлін 181
- Т**еноїлтрифлуороацетон 193
- Теорія
- субстратно-гормональних систем 250–252
- Термогенін 153
- активація 154
- Тирозин 116, 122
- Тіамін 128
- Тіамінпірофосфат 128, 129, 131
- Тіла
- кетонів **109–110**, 228, 235, 249, 253
- Тіоефіри 63, **66**, 67
- Тіокіназа (ацил-КоА-синтаза) 102
- Тканина
- жирова 61, 97, 102, 153, 186, 228, 243, 245, 246, 271
-- бурий жир 153, 271
- Токоферол (-и) 185, **186**, 187, 189
- α -токоферол 183, 186
- Трансаміназа (-и) 118, 198, 250, 252
- Трансжири 110–111
- Транслоказа (-и) 111, 169, 212, 213, 273
- внутрішньої мембрани мітохондрій 43, 169
- зовнішньої мембрани мітохондрій 40, 211
- Транспорт
- глутамату 122
- електронів 134, 143, 150, 152, 153, 160–162
-- способи 143
- протонів 123, 145, 161, 162
- Транспортер
- амінокислот (EAATs) 271
- α -кетоглутаратний 122
- Транспорт
- активний 210
-- вторинний 210
-- первинний 210
- пасивний 210
- Транспортування 211, 222
- АДФ 213
- відновних еквівалентів 212
- ди- і трикарбонових кислот 212
- катіонів K^+ 213
- монокарбонових жирних кислот 212
- неорганічного фосфату 212
- Трансферин 181
- Треонін 121, 122
- Триацилгліцероли **101**, 203, 243, 270, 271
- ресинтез 102
- Триптофан 40, 76, 116, 121
- Тріозофосфат 85
- α -Токоферол 183, 186
- Тромбоцит 221
- Тропоміозин 227
- Тропонін С 227
- У**бісеміхінон 147, 148
- Убіхінол 147, 148, 192, 193, 205
- Убіхінон (кофермент Q) 144, 146, **147**–149, 154, 155, 171, 192, 193, 205
- відновлення 147, 192, 205
- УДФ-галактоза 94

УДФ-глюкоза 94

Уніпорт 210

Уніпортер

- Ca^{2+} 215, **216**, 218

ФАД 74, 77–79, 81, 106, 107, 128, 131, 146, 147, 192, 193, 205

ФАДН₂ 19, 81, 105, 107, 108, 112, 127, 132, 139, 143, 147, 161, 163, 212, 213

Фактор

- транскрипційний

-- p53 264

-- c-Myc 265

- HIF-1 α 263, 264, 265, 268

Фенілаланін 116, 122

Феритин 181

Флавопротеїни 77–79, 106, 145–147, 155, 185, 193

ФМН 74, 77–79, 144–147

Формула

- Нернста (Nernst) 71

- розрахунку

-- загальної протонорушійної сили $\Delta\phi$ 161

-- зміни вільної енергії хімічної реакції 74

-- зміни стандартної вільної енергії 30

-- коефіцієнта корисної дії (ККД) 234

-- протонорушійної сили ($\Delta G \text{H}^+$) 153

Фосфатидилетаноламін 44, 181

Фосфатидилінозит 181

Фосфатидилсерин 181

Фосфатидилхолін 181

Фосфогліцераткіназа 89

Фосфоглюкомутаза 93

Фосфоенолпіруват 55, 63, 66, 67, 90, 94, 135

Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа 94, 136

6-фосфоглюконатдегідрогеназа 97

6-фосфоглюконат 97

6-фосфоглюконо- δ -лактон 97

Фосфопротеїнфосфатаза 129, 137

Фосфоліпаза

- A2 40

- C 221

Фосфоліпід (-и) 40, 42, 44, 102, 180, 181, 193, 209

Фосфорилування

- окисне 123, 132, 143, 159–168, 170–172, 175, 189, 197, 212, 220, 221, 229, 230, 243, 258, 259, 260, 262, 263, 267, 270, 271, 273, 274

-- визначення параметрів 282, 287

-- роз'єднувач 163, 217, 284, 286

- субстратне 53, **89**, 91, 131, 205

Фосфофруктокіназа 246, 263, 274

- 1 31, 61, 83, **87**, 93, 94, 96, 138, 234

- 2 **87**

-- кіназна активність 87

-- фосфатазна активність 87

Фототрофи **21**

Фотоавтотрофи 21, 69

Фотогетеротрофи 21

Фруктоза 94

Фруктозо-1,6-дифосфат 31, 32, 86, 87, 94, 96, 98

Фруктозо-2,6-дифосфат 87, 96, 136

Фруктозо-6-фосфат 31, 32, 86, 87, 88, 94, 98

Фруктозо-1,6-дифосфатаза 94, 96

Фумараза 131

Фумарат 193

Хвороба (-и)

- спадкові мітохондріальні 257–262, 273

-- лікування 262

-- Люфта (Luft) 258

-- синдром Кернсф–Сейра 259

-- синдром Лебера (Leber) 261

-- синдром Пірсона (Pirson) 260

-- синдром MELAS 261

-- синдром MERRF 260

-- тип успадкування

--- домінантний 258

--- материнський 258, 273

--- рецесивний 258

--- X-зчеплений 258

Хемотрофи 21, 25

Хемоавтотрофи 21

Хемотротрофи 21, 69

Хінон (-и) 176, 183, 185

Холестерин 197, 203, 278

- утворення 197

-- гіпертрофоване 197

Холін 226

Холінацетилтрансфераза 225

Церулоплазмін 183

Цикл

- адреналіновий 251, 252

- амфіболічний 135

- ацетилхоліновий 252

- глюкозо-аланіновий 118

- Ембдена–Мейєргофа–Парнаса 83

- Корі 229

- Кребса (трикарбонових кислот, цикл лимонної кислоти) 89, 90, 105, 106, 108–110, 112, 117, 118, 120–122, 124, **127–139**
-- амфіболічний 135, 140
-- етап 1 (утворення цитрату) 130
-- етап 2 (утворення ізоцитрату) 130
-- етап 3 (декарбоксилювання ізоцитрату) 130
-- етап 4 (декарбоксилювання α -кетоглутарату) 130–131
-- етап 5 (перетворення сукцинілу-КоА) 131
-- етап 6 (окислення сукцинату) 131
-- етап 7 (гідратація фумарату) 131
-- етап 8 (окислення малату) 132
-- “відрубаний” 197
-- переваги 134
-- регуляція 136–138
- сечовини 115, **118**–121, 138
- Q 148

цис-аконітат 130, 194, 212
цис- Δ^3 -еноіл-КоА-ізомераза **106**, 107
Цистеїн 89, 116, 117, 121, 149, 150, 187
Цитратсинтаза 130, 132, 136, 137, 140, 198
Цитохром (-и) **149**, 150, 155, 230
- α 148–152
- β 148–152
- *c* 40, 41, 144, 148–152, 186, 264
Цитохром-*c*-оксидаза 46, 150, 151, 176, 186
- визначення активності 280
Цитроїл-КоА 130
Цитрулін 118

Шлях

- амфіболічний 135
- пентозофосфатний 96
- PI3K-AKT1-mTOR 264

Шунт

- аспартат-аргініносукцинатний 118–120
- малат-аспартатний 172

Навчальне видання

Серія “Біологічні Студії”

БАБСЬКИЙ Андрій Мирославович
ІККЕРТ Оксана Володимирівна
МАНЬКО Володимир Васильович

ОСНОВИ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Підручник

Редактор	<i>Лариса Сідлович</i>
Технічний редактор	<i>Ігор Старунько</i>
Комп’ютерна графіка та верстання	<i>Ігор Старунько</i>
Дизайн обкладинки	<i>Ігор Старунько, Андрій Бабський</i>

Формат 70×100/16. Умовн. друк. арк. 25,15. Тираж 200 прим.

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Університетська, 1, Львів 79000, Україна

Свідоцтво
про внесення суб’єкта видавничої справи до державного реєстру
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.
Серія ДК № 3059 від 13.12.2007 р.

Видруковано з готових діапозитивів у книжковій друкарні “Коло”
(Свідоцтво про внесення суб’єкта видавничої справи до державного реєстру
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.

Серія ДК № 498 від 20.06.2001 року).
вул. Бориславська, 8, м. Дрогобич 82100, Україна
тел. +380 3244 29060; ел. пошта: kolodruk@gmail.com
Замовлення №