Биологическое окисление
(В помощь учителю биологии и химии)

А. А. Чиркин, профессор Витебского государственного университета имени П. М. Машерова, доктор биологических наук,
Е. О. Данченко, профессор Витебского государственного университета имени П. М. Машерова, доктор медицинских наук

Окончание. Начало в № 3 за 2016 год.

5. Окислительное фосфорилирование

Определение окислительного фосфорилирования.

Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, сопряжённый с переносом протонов и электронов по дыхательной цепи от субстратов к кислороду, называется *окислительным фосфорилированием* .

Энергия окисления, достаточная для образования молекулы АТФ, выделяется в дыхательных цепях в следующих участках:

1) НАДН-Ко(^-редуктаза (комплекс I, ДС?° = -69,5 кДж/моль);

2) КоQ-цитохром с-оксидоредуктаза (комплекс III, AG°= -36,7 кДж/моль);

3) цитохром с-оксидаза (комплекс IV, ДС°= -112 кДж/моль). На этих стадиях изменения ОВП превышают 0,22 В, что достаточно для образования макроэргической связи АТФ (>30,2 кДж/моль). Уменьшение свободной энергии, сопровождающее перенос протонов и электронов на кислород в результате одного дегидрирования, составляет примерно 220 кДж/моль. При этом на синтез АТФ в полной дыхательной цепи может быть израсходовано 30,2 ■ 3 = = 90,6 кДж/моль. Отсюда коэффициент полезного действия ЦПЭ составляет приблизительно 40 %. Остальная энергия рассеивается в виде тепла (поддержание температуры тела).

Механизм окислительного фосфорилирования.

Известны три основные гипотезы окислительного фосфорилирования:

1. *Механохимическая, или конформационная* (Д. Грин, Р. Бойер, 60-е гг. XX в.). В процессе переноса протонов и электронов изменяется конформация белков-ферментов. Они переходят в новое, богатое энергией, состояние, а затем при возвращении в исходную конформацию отдают энергию для синтеза АТФ. Гипотеза частично подтверждена: Еокисл. Е к о н ф о р м . сдвигов Е а т ф -

2. *Гипотеза химического сопряжения* (Ф. Липман, Е. Слейтер, А. Ленинджер, 30-40-е гг. XX века). В сопряжении дыхания и фосфорилирования участвуют сопрягающие вещества, например вещество Х. Вещество Х акцептирует протоны и электроны от первого фермента в пункте сопряжения, взаимодействует с H_3PO_4. В момент отдачи протонов и электронов второму ферменту пункта сопряжения связь становится макроэргической. Далее макроэрг передаётся на АДФ с образованием АТФ. До настоящего времени не выделены сопрягающие вещества.

3. *Хемиосмотическая гипотеза П. Митчелла (1961).* В 1961 году Питер Митчелл предположил, что синтез АТФ сопряжён с протонным градиентом поперёк внутренней мембраны митохондрий. Согласно его модели, перенос электронов вдоль компонентов дыхательных цепей внутренней мембраны митохондрий обеспечивает перенос протонов через (поперёк) внутреннюю мембрану митохондрий на её цитозольную сторону. В результате на внутренней мембране митохондрий сформировался электрохимический градиент. Эта идея П. Митчелла была названа хемиосмотической гипотезой. Установлено, что величина pH снаружи мембраны была на 1,4 единицы ниже, чем на внутренней поверхности мембраны, а мембранный потенциал составил 0,14 В. Этот потенциал соответствовал свободной энергии 5,2 ккал (21,8 кДж) на моль протонов.

По современным представлениям, дыхание и фосфорилирование связаны между собой *электрохимическим потенциалом* (ЭХП) на внутренней мембране митохондрий (рис. 10).

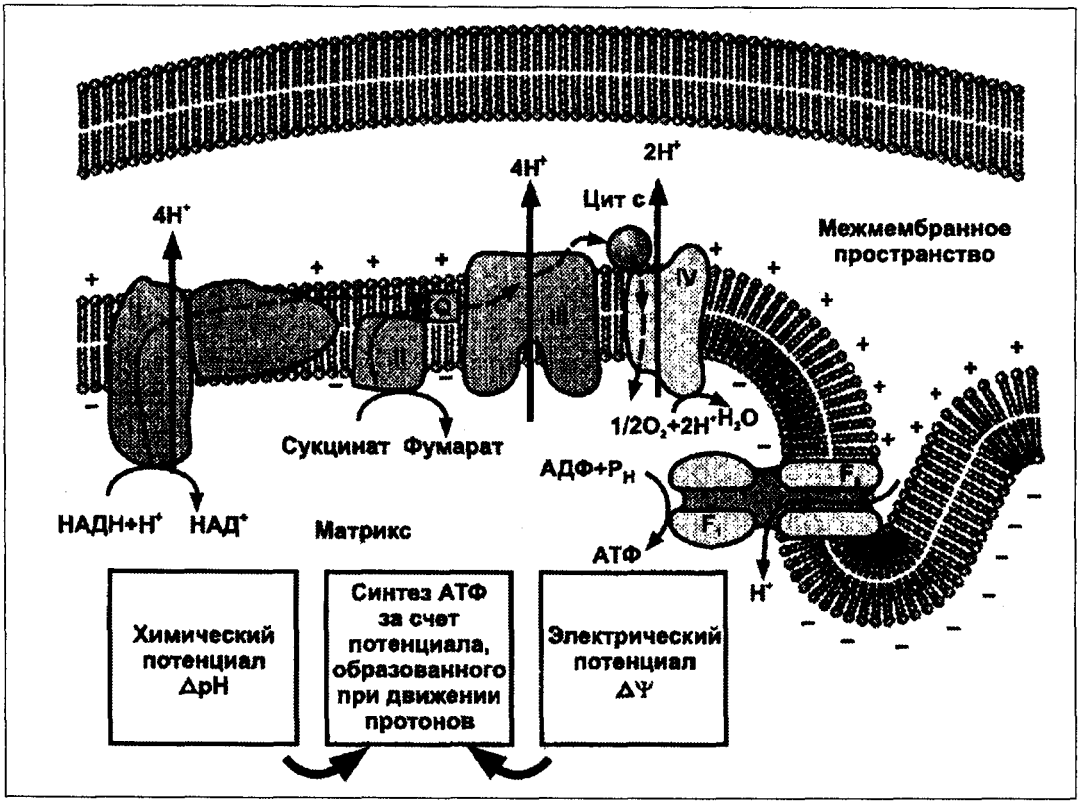

Рисунок 10 — Хемиосмотическая теория Митчелла [D. L. Nelson, M. M.Cox]

Для объяснения необходимы следующие понятия: а) внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для H^+ и “ОН; б) во внутреннюю мембрану митохондрий вмонтирована АТФ-синтаза *(комплекс V)*, катализирующая обратимую реакцию: АТФ + H_2O АДФ + Рн. АТФ-синтаза состоит из следующих компонентов: F_o (oligomycin-sensitive) — гидрофобный сегмент из 13 полипептидных цепей, связанный с внутренней мембраной митохондрий; F_o — это протонный канал, по которому в норме через мембрану могут перемещаться только протоны; Fj (первый фактор, который был определён как необходимый для окислительного фосфорилирования) — периферический мембранный белок (сопрягающий фактор), катализирующий синтез АТФ при перемещении протонов; в) синтез АТФ осуществляется при перемещении протонов через АТФ-синтазу в направлении от ММП (межмембранное пространство) к матриксу.

Суть окислительного фосфорилирования: за счёт энергии переноса электронов в ЦПЭ (^окисления) происходит движение протонов через мембрану в ММП и создаётся электрохимический потенциал ($E_{эхп}$). При возвращении протонов назад через АТФ-синтазу энергия ЭХП трансформируется в энергию АТФ ($E_{дтф}$).

Итак: Еокисл. Еэхп ~> $E_{дтф}$-

НАДН-Ко(^-редуктаза, KoQ-цитохром с-редуктаза и цитохром с-оксидаза выталкивают протоны в межмембранное пространство. Протоны берутся из H_2O матрикса или за счёт конформационных изменений в ферментах. Со стороны матрикса на мембране будет преобладать отрицательный заряд (избыток "ОН), а со стороны ММП — положительный (за счёт H^+). *Возникает ЭХП, который состоит из двух компонентов: электрического (разности электрических потенциалов) и химического (разности концентраций ионов H^+): \1H+ = Ду + &pH.* Эта величина измерена и она равна примерно +21 кДж/моль протонов. При *обратном токе протонов через канал АТФ-синтазы.* (разрядка мембраны) синтезируется АТФ.

Структура АТФ-синтазы. Митохондриальный Fx компонент состоит из 9 субъединиц пяти типов: a_3p_3у8е. |3-субъединицы имеют один каталитический сайт для

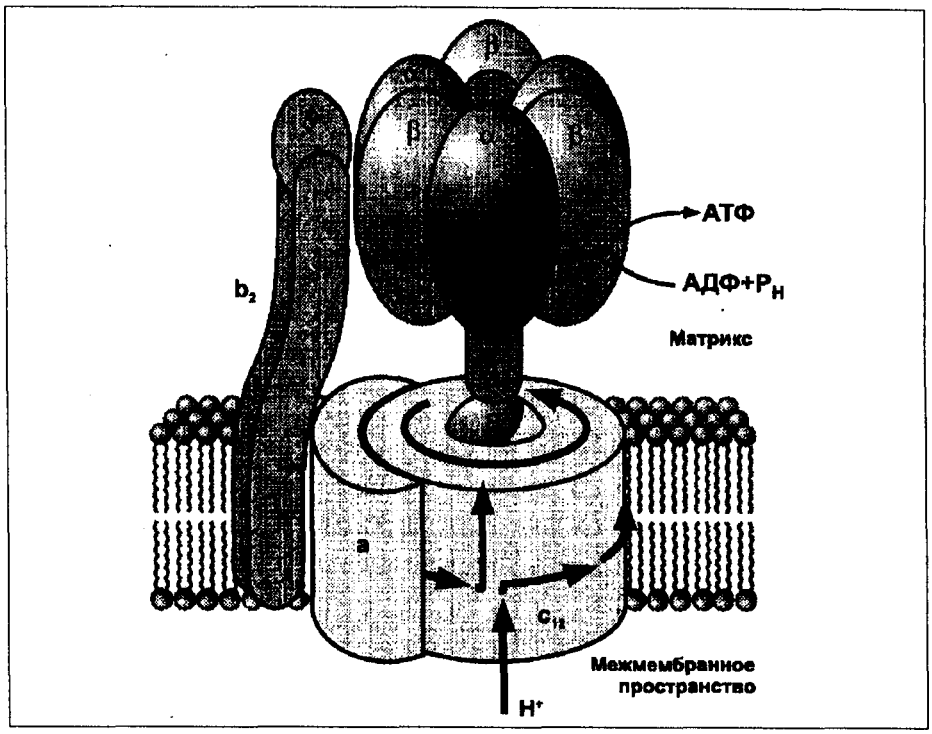

Рисунок 11 — Структура F_0Fj комплекса [D. L. Nelson, M. M. Cox]

синтеза АТФ. Головка каталитического F_x компонента представляет собой сферу высотой 8 нм и шириной 10 нм, состоящей из а- и р-субъединиц, расположенных подобно долькам апельсина (рис. 11). Полипептиды, которые образуют стебель Fx, расположены асимметрично: один домен у-субъединицы образует центральный ствол, который проходит через Fx; второй домен у-субъединицы связан с одной из трёх р-субъединиц, которая обозначается р-«пустая». Хотя аминокислотная последовательность трёх р-субъединиц идентична, они отличаются по конформации, и поэтому у-субъединица может связываться только с одной из р-субъединиц. Конформации р-субъединиц обозначаются как р-АТФ, р-АДФ и р-«пустая», показывая, какие нуклеотиды с ними связаны в данный момент. Это важно для механизма действия комплекса.

F_o компонент образует протонный канал и состоит из субъединиц трёх типов *a, b* и *c* в соотношении ab_2Cio-i2- с-Субъединица представляет собой небольшой (м.м. 8000) гидрофобный полипептид, состоящий из двух трансмембранных спиралей, локализованных почти полностью в мембране с небольшой петлёй, выступающей из матриксной стороны мембраны.

Механизм синтеза АТФ. Механизм синтеза АТФ был предложен P. Boyer и включает три стадии, в результате которых происходит изменение конформации р-субъединицы:
1) р-субъединица находится в р-АДФ конформации и связана *с* АДФ и Рн; 2) субъединица изменяет конформацию, способствующую образованию р-АТФ формы, которая прочно связывает и стабилизирует АТФ; 3) субъединица меняет конформацию на р-«пустая», которая имеет низкое сродство к АТФ, и вновь синтезированная молекула АТФ освобождается с поверхности фермента. Следующий цикл начинается, когда р-субъединица снова переходит в конформацию р-АДФ и связывает АДФ и Рн (рис. 12).

Роль протонного градиента в активном транспорте.

Для синтеза АТФ используется энергия протонного потенциала на мембране митохондрий. Однако эта энергия используется также для процессов обмена АТФ матрикса на АДФ цитозоля. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для заряженных молекул, но в ней находятся две специфические системы транспорта АДФ и Рн в матрикс и АТФ из матрикса в цитозоль.

Адениннуклеотидтранслоказа (интегральный белок внутренней мембраны) связывает $АДФ^{3-}$ в межмембранном пространстве и

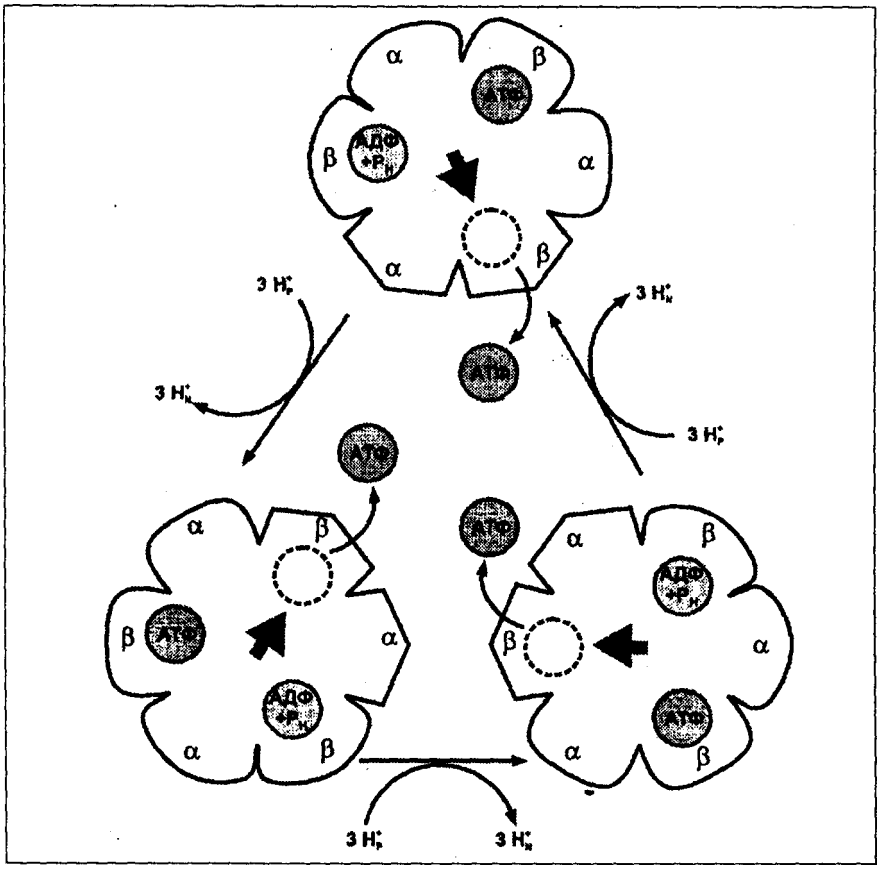

Рисунок 12 — Механизм синтеза АТФ [D. L. Nelson, M. M. Cox]

транспортирует его в матрикс в обмен на молекулу $АТФ^{4-}$, одновременно транспортируемую из матрикса. Поскольку при этом транспорте перемещаются четыре отрицательных заряда наружу и три внутрь, образуется электрохимический трансмембранный градиент, который заряжает матрикс отрицательно. Электрохимический градиент обеспечивает обмен АТФ-АДФ. Транслоказа специфически ингибируется *атрактилозидом* — токсическим гликозидом, выделяемым чертополохом. Если транспорт АДФ и АТФ ингибируется, цитозольный АТФ не может синтезироваться из АДФ.

Второй транспортной системой, необходимой для окислительного фосфорилирования, является *фосфаттранслоказа*, которая обеспечивает симпорт $H_2PO_4^-$ и одного H^+ в матрикс. Этот процесс обеспечивает образование протонного градиента.

Количественная оценка окислительного фосфорилирования. Для количественного выражения окислительного фосфорилирования введён *коэффициент окислительного фосфорилирования, который представляет собой отношение числа молекул неорганического фосфата, перешедших в состав АТФ в процессе дыхания, на каждый поглощённый атом кислорода.*

В начальных исследованиях этот коэффициент Р/О при окислении НАДН был равен 3, а при окислении сукцината — 2. В процессе совершенствования методических подходов эти величины были уточнены (при окислении НАДН Р/О = 2,5, при окислении сукцината Р/О = 1,5). Поэтому суммарное уравнение окислительного фосфорилирования может быть записано:

$$НАДН + H^+ + /4O_2 + 2{,}5АДФ + 2{,}5Рн \rightarrow НАД^+ + H_2O + 2{,}5АТФ.$$

Возникает вопрос, какое количество протонов необходимо для синтеза 1 молекулы АТФ? Количество протонов, выталкиваемых в межмембранное пространство, равно 10 H^+ для окисления молекулы НАДН и $6H^+$ — для окисления молекулы сукцината. Большинство исследователей считают, что для синтеза одной молекулы АТФ необходимо $4H^+$, один из которых используется для транспорта Рн, АТФ и

АДФ через митохондриальную мембрану. Следовательно, коэффициент Р/О равен 2,5 (10/4) для НАДН и 1,5 (6/4) — для сукцината. Считают, что примерно 2,5 молекулы цитозольной АТФ образуется в процессе переноса пары электронов от НАДН на O_2. Для электронов, поступающих от KoQ-цитохром-с-редуктазы, равно как и от сукцината, образуется 1,5 молекулы АТФ на пару электронов.

Образуется 2,5 молекулы АТФ при окислении молекулы НАДН и 1,5 молекулы АТФ при окислении молекулы $ФАДН_2$.

Образованная в результате окислительного фосфорилирования в митохондриях АТФ обменивается на внемитохондриальную АДФ с помощью специальных белков *транслоказ* (транслоказы составляют до 6 % от всех белков внутренней мембраны митохондрий).

6. Дыхательный контроль и нарушения клеточного дыхания

Дыхательный контроль — это регуляция скорости переноса электронов по дыхательной цепи *отношением АТФ/АДФ*. Чем меньше это отношение (преобладает АДФ), тем интенсивнее идёт дыхание (это обеспечивает реакцию АДФ + Рн —> АТФ). Это видно по увеличению потребления кислорода митохондриями после добавки АДФ (эксперименты Б. Чанса, см. раздел решения задач) или по усиленному дыханию бегущего человека.

Ингибиторы дыхания.

Вещества, прекращающие поток электронов по дыхательной цепи ферментов, называют ингибиторами дыхания.

1. Ингибиторы транспорта электронов от НАДН к коферменту Q: *ротенон* (инсектицид), *барбитураты* (амобарбитал, секобарбитал), *пирицидин* (антибиотик). Предотвращают генерирование протонного градиента в комплексе I. В то же время указанные ингибиторы не нарушают окисления сукцината.

2. *Антимицин А* тормозит поток электронов от KoQ к цитохрому *с*, предотвращая синтез АТФ, сопряжённый с генерированием протонного градиента в комплексе III. Этот блок можно обойти добавлением *аскорбиновой кислоты*, которая непосредственно восстанавливает цитохром *с*.

3. Транспорт электронов может быть блокирован между цитохромоксидазным комплексом и кислородом под действием *CN~*, N_3~ *и CO*. В присутствии этих ингибиторов из-за блокирования тока электронов не происходит фосфорилирования, сопряжённого с генерированием протонного градиента в комплексе IV.

4. Олигомицин и дициклогексилкарбодиимид (DCCD) предотвращают поток протонов через АТФ-синтазу.

5. АТФ-АДФ-транслоказа специфически ингибируется очень низкими концентрациями *атрактилозида* (растительный гликозид) или *бонкрековой кислотой* (антибиотик). Атрактилозид связывается с транслоказой на поверхности мембраны со стороны межмембранного пространства, а бонкрековая кислота — на стороне матрикса. Блокада транслоказы ведёт к остановке окислительного фосфорилирования.

Разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования. Оно возникает при повышении проницаемости мембраны митохондрий для протонов в любом месте, а не только в канале АТФ-синтазы. При этом не создаётся электрохимический потенциал и энергия окисления рассеивается в виде тепла. Так действуют ионофоры *(2,4-динитрофенол, валиномицин* и др.). Они переносят обратно протоны через мембрану, выравнивая градиенты pH и мембранного потенциала. Лекарственные препараты *(аминобарбитал),* продукты *жизнедеятельности микроорганизмов, избыток тиреоидных гормонов* (вызывают накопление ненасыщенных жирных кислот, являющихся ионофорами) и др. приводят к разобщению дыхания и фосфорилирования, обеспечивая гипертермию.

На разобщении дыхания и фосфорилирования базируется терморегуляторная функция тканевого дыхания. Тканевое дыхание, протекающее в митохондриях и не сопровождающееся образованием макроэргов, называют *свободным, или нефосфорилирующим, окислением.*

Природным разобщающим агентом является *термогенин,* протонный канал в митохондриях бурых жировых клеток. Бурый жир обнаружен у новорождённых и животных, впадающих в зимнюю спячку, и служит для теплообразования. При охлаждении организма норадреналин активирует гормонзависимую липазу. Благодаря активному липолизу в

организме образуется большое количество свободных жирных кислот, которые распадаются в результате р-окисления и в дыхательной цепи. Так как жирные кислоты одновременно открывают протонный канал термогенина, их распад не зависит от наличия АДФ, т. е. протекает с максимальной скоростью и генерирует энергию в форме тепла.

Гипоэнергетические состояния возникают при нарушении:

1) поступления субстратов для дегидрирования (на всех этапах от пищи до матрикса митохондрий);

2) поступления Ог в митохондрии (на всех этапах от дыхания, связь кислорода с гемоглобином, транспорт и пр.);

3) мембран митохондрий, композиции липидного бислоя и ферментативных ансамблей внутренней мембраны митохондрий.

Напомним, что предложено вычислять *энергетическое состояние клетки,* вычисляя «заполнение» системы АТФ-АДФ-АМФ макроэргами. Если все три компонента представлены АТФ, то система энергетически полностью заполнена и её энергетический заряд равен 1,0. Если же система представлена только АМФ, то её энергетический заряд равен 0. Энергетический заряд клетки является важной величиной, определяющей соотношение катаболических и анаболических процессов в ней. В тканях животных важную регуляторную роль выполняет величина отношения АТФ/АДФ.

В сутки человек потребляет в среднем 27 моль кислорода. Основное его количество (примерно 25 моль) используется в митохондриях в ЦПЭ. Следовательно, ежесуточно синтезируется 125 моль АТФ, или 62 кг (при расчёте использован коэффициент Р/О = 2,5, т. е. среднее значение коэффициента фосфорилирования). Масса всей АТФ, содержащейся в организме, составляет примерно 20-30 г. Следовательно, каждая молекула АТФ за сутки 2500 раз проходит процесс гидролиза и синтеза.

Окислительные системы, не связанные с запасанием энергии.

Пероксидазный путь. Другой тип дегидрирования субстратов, заключающийся в переносе двух атомов водорода на молекулу кислорода, называется пероксидазным: $RH_2 + O_2 \longrightarrow \longrightarrow R + H_2O_2$. Энергия окисления выделяется в виде тепла. Это *простые окислительные системы, представленные ФМН- и ФАД-содержащими ферментами, а также металлопротеинами.* Они более широко распространены в растительных клетках, чем в клетках животных и человека. В клетке около 80 % этих ферментов сосредоточено в пероксисомах, кроме того, они встречаются в мембранах, граничащих с цитозолем. Так происходит окисление альдегидов, аминов, L- и D-аминокислот, пуринов и др. Некоторые из названных веществ токсические. В лейкоцитах, гистиоцитах и других клетках, способных к фагоцитозу, пероксидазный путь окисления субстратов очень активен. Образующаяся H_2O_2 используется для обезвреживания болезнетворных бактерий и распада инфекционного материала, поглощённого клетками. Однако *избыточное накопление перекиси водорода токсично,* особенно для нефагоцитирующих клеток. Накопление пероксидов и генерация свободных радикалов могут приводить к повреждению мембран (рак, атеросклероз).

Для предотвращения повреждающего действия пероксидов служат две ферментативные системы. Первая — фермент *пероксидаза,* простетической группой которой является протогем. Ферменты этого типа широко представлены у растений, а также встречаются в молоке, лейкоцитах, тромбоцитах и тканях, продуцирующих эйкозаноиды: $H_2O_2 + RH_2 \longrightarrow 2H_2O + R$, где RH_2 — аскорбиновая кислота, хиноны, цитохром С, глутатион. В эритроцитах и некоторых других тканях присутствует глутатионпероксидаза, содержащая Se в качестве простетической группы. Этот фермент защищает мембраны и гемоглобин от окисления пероксидами. Второй фермент — *каталаза,* являющийся гемопротеином (4 гема): $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$. Эта реакция напоминает пероксидазную, только вместо RH_2 используется H_2O_2. Каталазу находят в крови, костном мозге, слизистых оболочках, печени, почках, т. е. в клетках, где происходит интенсивное окисление с образованием H_2O_2.

Оксигеназный путь. Оксигеназы — это ферменты, катализирующие включение атома или молекулы кислорода в субстрат окисления. Служат для синтеза и деградации различных метаболитов. Оксигеназы представлены двумя типами ферментов.

Монооксигеназы (оксигеназы со смешанной функцией, гидроксилазы, микросомальное окисление) катализируют присоединение одного атома кислорода к молекуле субстрата. При этом возникает *гидроксильная группа,* повышается растворимость вещества и проявляются новые фармакологические свойства. Для работы монооксигеназной системы необходимы следующие основные компоненты: неполярный субстрат R-CH_3; кислород 0=0; дополнительный субстрат НАДФН + H^+ — донор атомов водорода; цитохром Р-450.

Связанный с СО цитохром Р-450 имеет максимум поглощения при 450 нм (отсюда название — цит Р-450). Выполняет две функции: 1) связывание субстрата гидроксилирования; 2) на цит Р-450 происходит активация молекулярного кислорода.

Монооксигеназный путь окисления локализован в мембранах эндоплазматического ретикулума (после разрушения клеток эти мембраны замыкаются в микросферы — микросомы). Микросомальное окисление представляет короткую цепь, включающую НАДФ, ФАД, $Fe2S_2$ — белки (адренодоксин), цитохромы Р-450, $Ъ_5$. В общем виде микросомальное окисление неполярных ксенобиотиков (лекарств) осуществляется с помощью *гидроксилазного цикла.*

Процесс микросомального гидроксилирования можно представить следующим уравнением:

$$RCH_3 + НАДФН + H^+ + 0_2 \text{ ->}$$

$$\text{-> } RCH_2OH + НАДФ^+ + H_20,$$

где RCH_3 — окисляемый субстрат.

Окисление органических соединений в микросомальных монооксигеназных реакциях в отличие от реакций митохондриального окисления, как правило, не решает никаких энергетических задач, а *выполняет защитную (детоксикационную)* и пластическую функции. Окисленные продукты могут быть использованы в качестве пластического материала или сразу же удаляются из организма.

Весь каталитический процесс микросомального окисления может быть разбит на шесть основных стадий.

1. Вещество, подвергающееся биотрансформации (RCH_3), на этой стадии взаимодействует с окисленной формой цитохрома Р-450(Fe^{3+}) с образованием фермент-субстратного комплекса RCH_3-Р-450(Fe^{3+}). Трёхвалентное железо не может связывать кислород.

2. НАДФН + H^+ передаёт два атома водорода на ФАД. ФАД восстанавливается в ф а д н$_2$.

3. С помощью FeS-белков происходит разделение потоков протонов и электронов. Первый электрон связывается с комплексом RCH_3-Р-450(Fe^{3+}) и переводит его в RCH_3-Р-450(Fe^{2+}).

4. Восстановленный фермент-субстратный комплекс взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием тройного оксигенированного фермент-субстратного комплекса RCH_3-Р-450(Fe^{2+})-0_2.

5. Происходит восстановление кислорода за счёт второго электрона и превращение его в анион-радикал RCH_3-Р-450 (Fe^{2+})-O_2'~.

6. Стадия характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса и его распадом с высвобождением воды и гидроксилированного субстрата (RCH_2OH). При этом цитохром Р-450 переходит в исходную форму, готовую к взаимодействию со следующей молекулой субстрата.

В митохондриях содержится монооксигеназная система, локализованная на внутренней стороне внутренней мембраны митохондрий, которая выполняет биосинтетическую функцию, т. е. введение ОН-групп при биосинтезе стероидных гормонов (кора надпочечников, семенники, яичники, плацента), холестерола, при образовании кальцитриола (витамин $Д_3$) из 25-гидроксихолекальциферола в почках и при синтезе желчных кислот в печени.

Диоксигеназный путь. Включение двух атомов кислорода в молекулу субстрата R + 0_2 —> —> $R0_2$ катализируется ферментами диоксигеназами. Этот путь служит для превращения молекул, содержащих ароматические кольца, например гомогентизиновую кислоту. Одной из биологически важных диоксигеназных реакций является разделение молекулы Р-каротина на 2 молекулы ретиналя (одна из форм витамина А).

Свободно-радикальное окисление. Под свободными радикалами понимают частицы, содержащие *неспаренный электрон на внешней электронной оболочке.* Появление неспаренного электрона — реализация у молекулы свободной валентности. Свободные радикалы реакционноактивны и вступают

в химические реакции для приобретения недостающего электрона. Полное восстановление O_2 до H_2O требует присоединения 4 электронов: $0_2 + 4e\sim + 4H^+ \text{-»} 2H_2O$.

$$O_2 \xrightarrow{\ddot{e}\ 2H^+} H_2o_2 \xrightarrow{\ddot{e}} HO + HO' \xrightarrow{\ddot{e}\ 2H^+} 2H_2O.$$

При неполном восстановлении O_2 (т. е. присоединении одного, двух или трёх электронов) образуются свободно-радикальные (активные) формы кислорода: $O_2'\sim$ — супер-оксидный анион-радикал; HO’ — гидроксильный радикал (R0‘ — алкоксильный радикал); $'O_2H$ — гидропероксильный радикал. К АФК относят также $^xO_2$ — синглетный кислород, СЮ$^-$ — гипохлорит и ONOO" — пероксинитрит. На этот процесс расходуется до 5 % потребляемого кислорода, который в результате различных реакций превращается в активные формы кислорода:

- в результате «утечки» *е*~ в цепи переноса электронов (НАДН-Ко($-редуктаза, KoQ-цитохром с-редуктаза) с участием KoQ;
- в результате «утечки» *е*~ в электрон-транспортной системе мембран эндоплазматического ретикулума, включающей в себя цитохромы Р-450 и $Ь_5$, а также НАДН- и НАДФН-зависимые редуктазы, включая НАДФН-цитохром Р-450-зависимую редуктазу в микросомах;
- в реакциях, катализируемых НАДФН-оксидазой, ксантиноксидазой, циклооксигеназой и др.;
- при реализации фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов крови, а также тканевых макрофагов в борьбе с бактериями через образование O_2’~ активированным НАДФН-оксидазным комплексом *и* НС1О (гипохлорит) миелопероксидазой;
- при действии ионов Fe^{2+} (а также других металлов переменной валентности — медь, кобальт) образуется HO’ посредством реакции Фентона;
- при аутоокислении гемоглобина в метгемоглобин;
- в условиях действия на клетки ультрафиолетовых лучей и ионизирующей радиации.

Время жизни, химическая активность и, следовательно, расстояние, которое успевают пройти частицы АФК до взаимодействия с мишенью, зависят от их типа (табл. 6).

Таблица 6 — АФК и время их жизни при физиологических условиях

Название	Обозначение	Время жизни, с
Молекулярный кислород	o_2	>100
Синглетный кислород	$^r0_2$	$10"^6$
Супероксидный анион-радикал	o_2	$10“^6$
Гидроксильный радикал	HO-	$10\sim^9$
Гидропероксильный радикал	HO_2-	$10"^8$
Пероксид водорода	H_2O_2	10—100
Монооксид азота	N0'	1—100
Диоксид азота	NO_2-	$10"^7$—$10"^8$
Нитрозоний (нитрозильный катион)	NO^+	$10"^{10}$
Нитроксил (нитроксильный анион)	NO"	$10“^3$
Пероксинитрит-ион	ONOO"	0,05—1
Карбонатный анион-радикал	СОз"	$10"^7$—$10\sim^8$
Монооксид углерода	СО	10

Среди различных АФК можно выделить две группы: первичные и вторичные. Первичные АФК — это те АФК, которые образуются непосредственно в ферментативных реакциях, протекающих в клетках. Вторичные АФК — это те АФК, которые образуются в результате взаимодействия АФК между собой или другими молекулами. Принципиальная разница в

биологическом действии первичных и вторичных АФК состоит в том, что первичные АФК (O_2'~, H_2O2, NO', СЮ", СО) выполняют прежде всего *регуляторные функции* и участвуют в процессах внутриклеточной и внеклеточной сигнализации, в то время как вторичные АФК (НО', NO_2', CO_3'~) вызывают *повреждение биомолекул и* несут ответственность за развитие многих заболеваний.

Свободные радикалы инициируют цепные реакции. Если в реакцию вступают ненасыщенные жирные кислоты, то говорят о пероксидном окислении липидов (ПОЛ). Этот процесс важен для развития патологических состояний, связанных с повреждением мембран. Схема цепных реакций:

1. Инициация при действии R', металлов, излучений: X'+ RH -> R'–+ XH.
2. Удлинение, разветвление:

R' + 0_2 —> ROO' (пероксидный радикал).

ROO' + RH —> R' + ROOH (гидроперекись) И т. д.

3. Терминация (обрыв цепи):

ROO + Rj —ROORj; R 4- Rj —> RRj_t

Во всех полиненасыщенных жирных кислотах присутствует дивинилметановая структура, которая легко вступает в реакцию отрыва водорода, сопровождающуюся образованием свободного радикала. Применительно к фрагменту ненасыщенной жирной кислоты фосфолипидов можно показать следующие продукты перекисного окисления: АФК (O_2'–, H_2O_2, НО') -> ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран —» промежуточные продукты (алкильные, алкоксильные, пероксильные радикалы) —> первичные продукты (гидроперекиси липидов, диеновые конъюгаты и др.) -> вторичные продукты (малоновый диальдегид, триеновые конъюгаты и др.) -> конечные продукты (шиффовы основания и газообразные соединения). Эти процессы лежат в основе повреждения мембран клеток.

Антиоксидантная защита. Сдерживание процессов свободно-радикального окисления осуществляется с помощью неферментативных и ферментативных механизмов.

1. *Неферментативная защита* включает: комплексоны, связывающие металлы (этилендиаминотетрауксусная кислота); в водной фазе — витамин С, ураты, ароматические амины, SH-соединения; в липидной фазе — жирорастворимые витамины А (р-каротин), Е гормоны стероидной природы, тироксин К экзогенным антиоксидантам относят *каротиноиды* (около 500 соединений), *флавоноидь* и *полифенолы* (около 10 000 соединений). В эндогенным антиоксидантам относят *таурин* гистидинсодержащий дипептид *карнозин,* продукт катаболизма гемсодержащих белков — *билирубин,* гормон эпифиза *мелатониъ* (N-ацетил-б-метокситриптамин).

2. *Ферментативная защита* включает фермент супероксиддисмутазу (в цитозоле, ядрах и лизосомах простетическая группа — $Си^{2+}$. Zn^{2+}, в митохондриях и у бактерий — $Мп^{2+}$; $O2'^{-}$ + O_2' + $2H^+$ -» H2O2 + O2. Перекись водорода обезвреживается в каталазной или пероксидазной (чаще глутатионпероксидазнои реакциях. Активатор реакции — селен Se В продукты питания добавляют антиоксидантные добавки: р-каротин, а-токоферол, ВНА — бутилгидроксианизол, ВНТ — бутил - гидрокситолуол. Для профилактики радиационных поражений используют комплексы витаминов А, Е, С и р-каротин, Е, С.

В настоящее время не вызывает сомнения факт образования различных АФК при нормальных физиологических условиях. В большинстве работ, посвящённых изучению регуляторной и токсической роли АФК, термин «окислительный стресс» используется для обозначения «чрезмерного» образования АФК в клетке. В свою очередь, постоянно высокое значение концентрации восстановителей, или *восстановительный стресс,* также может иметь драматические последствия для жизнедеятельности клеток. В клетке постоянно протекают процессы и образования, и утилизации АФК. В результате сопряжённого функционирования систем генерации АФК и антиокислительной защиты, а также мембранных систем транспорта различных типов окислителей и восстановителей в клетке устанавливается определённый окислительно-восстановительный баланс, или *редокс-состояние.* Для поддержания редокс-состояния, прежде всего, служат тиолсодержащие молекулы: трипептид глутатион и редокс-зависимые белки (тиоредоксины, глутаредоксины и пероксиредоксины).

Благодаря высокой внутриклеточной концентрации (0,1-10 миллимоль) восстановленный глутатион (Г-SH, GSH) играе^ роль «ловушки» свободных радикалов.

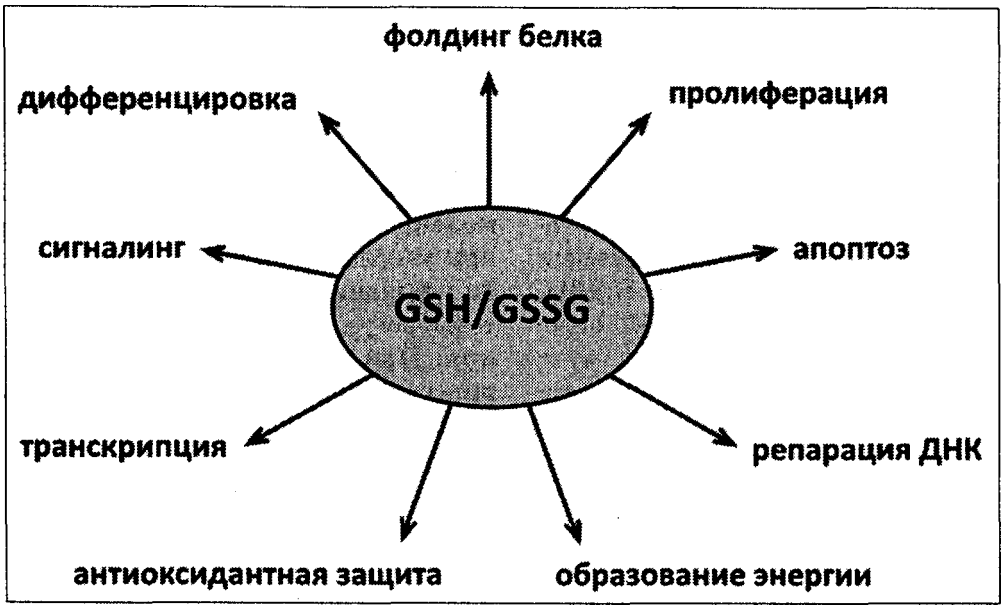

Рисунок 13 — Роль глутатиона в редокс-регуляции основных процессов жизнедеятельности (Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова, 2014)

Он окисляется (Г-SS-г, GSSG) в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых глутатионпероксидазами (7 изоферментов), а также в восстановлении окисленной формы глутаредоксина. Кроме того, глутаредоксин и тиоредоксин наряду с глутатионзависимым превращением рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды способны восстанавливать дисульфидные связи в белках, способствуя формированию у них правильной третичной структуры. Восстановление окисленного глутатиона катализирует глутатионредуктаза. Для жизнедеятельности клеток является важным поддержание соотношения 2r-SH/r-SS-r (рис. 13).

Повышение уровня Г-SH способствует повышению резистентности клеток к действию радиации, уменьшает гибель клеток по механизмам некроза и апоптоза. Снижение уровня Г-SH относительно значений, характерных для состояния нормы, сигнализирует о дефиците антиоксидантной системы. Глутатион-S-трансферазы используют нуклеофильный Г-SH для конъюгации с неполярными соединениями, содержащими электрофильные атомы C, N и S. Суперсемейство этого фермента служит для детоксикации ксенобиотиков, редокс-регуляции чувствительности клеток к апоптозу и детоксикации продуктов окислительного стресса.

Выводы

В основе биологического окисления лежат окислительно-восстановительные процессы, определяемые переносом электронов. Существуют три основных пути использования кислорода в клетках путём дегидрирования, оксигенирования и свободно-радикального окисления. Под тканевым (клеточным) дыханием понимают молекулярные процессы, в результате которых происходят поглощение клеткой кислорода и выделение углекислого газа. ЦПЭ — это универсальный конвейер по переносу электронов от субстратов окисления к кислороду, построенный в соответствии с градиентом окислительно-восстановительного потенциала. Главные компоненты дыхательной цепи расположены в порядке возрастания их окислительно-восстановительного потенциала. В процессе переноса электронов по градиенту окислительно-восстановительного потенциала высвобождается свободная энергия. Электроны для дыхательной цепи образуются в результате действия ферментов дегидрогеназ — пиридинзависимых дегидрогеназ и флавиновых ферментов. Дегидрогеназы обеспечивают получение электронов от субстратов катаболических путей и аккумуляцию их в универсальных акцепторах электронов — никотинамидных нуклеотидах ($НАД^+$ или $НАДФ^+$) или флавиновых нуклеотидах (ФМН или ФАД). Метаболическая роль

коферментов: НАД$^+$ используется в окислении, которое является частью катаболических процессов; НАДФН используется как восстановитель в анаболических реакциях (биосинтезы, обезвреживание). Дыхательная цепь переноса электронов состоит из пяти полиферментных комплексов. Комплексы I и II катализируют перенос электронов от различных доноров электронов: комплекс I — от НАДН, комплекс II — от $ФАДН_2$, комплекс III переносит электроны от убихинона к цитохрому *c*, комплекс IV переносит электроны от цитохрома *c* на кислород. Движение электронов через комплексы I, III и IV сопровождается выталкиванием протонов из матрикса в межмембранное пространство. Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, сопряжённый с переносом электронов по дыхательной цепи от субстратов к кислороду, называется окислительным фосфорилированием. Суть окислительного фосфорилирования: за счёт энергии переноса электронов в ЦПЭ ($E_{окисления}$) происходит движение протонов через мембрану в ММП и создаётся электрохимический потенциал ($E_{эхп}$). При возвращении протонов назад через V комплекс (АТФ-синтазу) энергия ЭХП трансформируется в энергию АТФ — $E_{АТФ}$. Образуется 2,5 молекулы АТФ при окислении молекулы НАДН + Н$^+$ и 1,5 молекулы АТФ при окислении молекулы $ФАДН_2$. На разобщении дыхания и фосфорилирования базируется терморегуляторная функция тканевого дыхания. При неполном восстановлении O_2 (т. е. присоединении 1, 2 или 3 электронов) образуются свободно-радикальные формы кислорода: O_2‘~ —супероксидный анион-радикал; НО’ — гидроксильный радикал; ’O_2Н — гидропероксильный радикал. Утечка электронов из ЦПЭ и непосредственное их взаимодействие с кислородом — основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток. Антиоксидантная система включает неферментативные и ферментативные механизмы.

Задачи, примеры решения и вопросы

1. Рассчитайте количество стандартной свободной энергии, выделяемой при окислении НАДН в митохондриальной цепи окисления.

Решение. Для нестандартных условий, которые могут быть в клетках, для вычисления ДО используют следующий подход. Возьмём реакцию:

•^окисл. + ®восстан. -^-восстан. + ®окисл.’ ТОГДа

—Д(2° ↓ •^^'^[•^восстан.][®окисл.]
[Ao кисл.][В восстал.1

В этом примере А — акцептор электронов, а В — донор электронов.

Рассчитаем изменение энергии при поступлении электронов в ЦПЭ от НАДН:

НАДН + Н$^+$ + 1/2O_2 *5 НАД$^+$ + H_2O.

В стандартных условиях это экзэргоническая реакция:

ДО° - -*nF&EF* = -2(96,485 кДж х моль$^{-1}$ х В$^{-1}$) х х (0,82В - (-0,32В)) = -220 кДж/моль.

С помощью этой формулы можно рассчитать изменение стандартной свободной энергии для любого фрагмента цепи переноса электронов по разности между стандартными потенциалами двух окислительно-восстановительных пар (электронодонорной и электроноакцепторной).

2. Оцените вклад компонентов в величину ДцН$^+$, если *&pH* = +0,75, а Ду = 0,15-0,20 В.

Решение. Величина ДцН$^+$ может быть вычислена по уравнению:

Д|лН$^+$ = 2,3 *RT&pH* + ЕДу.

Др,Н$^+$ называют также Др или pmf.

ApH имеет положительное значение (+0,75), так как оно находится как разница между pH матрикса и pH межмембранного пространства (вспомним, что pH = -log[H]). Отсюда вклад градиента pH в электрохимический потенциал составляет 2,3.RT(+0,75) = = +4,5 кДж/моль при 37 °С (310 К). Величины трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий при активном митохондриальном дыхании (от 0,15 до 0,20 В) необходимо умножить на *F* (постоянная Фарадея 96,5 кДж х моль$^{-1}$ х В$^{-1}$). Полученные значения соответствуют вкладу электрического компонента от +14,5 до +19,3 кДж/моль. Таким образом, общая свободная энергия переноса протонов из матрикса в межмембранное пространство равна примерно +21 кДж на моль протонов.

3. Из значений *E*°, взятых из таблицы, рассчитайте константу равновесия для глутатионпероксидазной реакции при 37 °С:

R-OOH + GSH GSSG + H_2O + ROH,

где GSH — восстановленный глутатион, GSSG — окисленный глутатион.

Ответ: 1,8 x 10^{17}.

Подсказка: рассчитайте AG° = *-nFAE°'*. Используйте *E°*= +0,30 В для H_2O_2.

4. Из лекции Ю. А. Владимирова («Биоэнергетические функции митохондрий», МГУ). Один из способов изучения функций митохондрий — измерение скорости потребления кислорода суспензией органелл в различных функциональных состояниях методом полярографии. На рисунке 14 приведена схематизированная запись изменения концентрации кислорода в суспензии в ходе инкубации изолированных митохондрий. Наклон кривой в каждый момент времени характеризует скорость потребления кислорода (дыхания) в данном состоянии, эти величины принято обозначать как V_{lf} V_2, V_3, V_4 *и* V_5, где цифрами помечены состояния по классификации Б. Чанса. Наиболее информативны V_3 — скорость дыхания митохондрий при окислительном фосфорилировании, т. е. в присутствии субстратов окисления, АДФ и ортофосфата, и V_4 — скорость дыхания митохондрий в присутствии субстратов окисления и ортофосфата, но в отсутствие АДФ (состояние дыхательного контроля).

Изучите рисунок 14 и опишите процессы в состояниях Vj—V_5. После этого сравните сделанные заключения с приведёнными ниже.

Ответ. *V* — это состояние митохондрий, к которым не добавлены ни субстраты, ни АДФ; V_2 — к митохондриям добавили АДФ, но не добавили субстраты окисления (-SH_2, +АДФ). Непродолжительное увеличение потребления кислорода за счёт эндогенных субстратов. Это деэнергизованное состояние, так

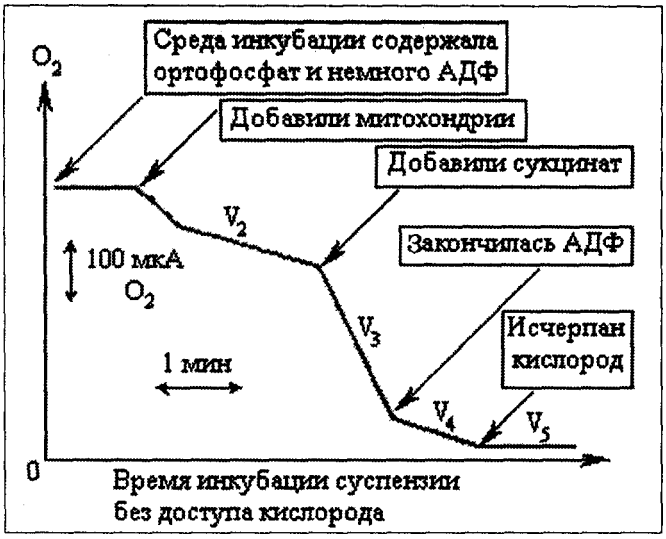

Рисунок 14 — Функциональные состояния митохондрий по Б. Чансу

как в отсутствие субстратов дыхательная цепь не работает и митохондрии не поддерживают мембранный потенциал; V_3 — состояние окислительного фосфорилирования (+SH_2, +АДФ), окисление субстратов приводит к энергизации митохондрий, мембранный потенциал тянет протоны внутрь через АТФ-синтазу и происходит синтез АТФ из добавленного АДФ; V_4 — состояние дыхательного контроля (+SH_2, -АДФ): митохондрии энергизованы, но дыхание подавлено, поскольку в отсутствие АДФ высокий мембранный потенциал останавливает перенос протонов через мембрану и следовательно — перенос электронов по дыхательной цепи; V_5 — состояние анаэробиоза (в среде закончился кислород). Митохондрии деэнергизованы и нет ни потребления кислорода, ни синтеза АТФ независимо от того, есть в среде субстраты и АДФ или нет.

После ознакомления с ответами самостоятельно ответьте на вопрос: каковы потребление кислорода и образование АТФ при добавлении к суспензии митохондрий 2,4-динитрофенола?

Литература

1. Биохимия. Учебное руководство / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — М. : Мед. лит., 2010. — 624 с.
2. *Калинина, Е. В.* Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биологической химии. — 2014. — Т. 54. — С. 299-348.
3. *Ленинджер, А.* Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер; пер. с англ. — М. : Мир, 1985. — 1056 с.
4. Biochemistry. Concepts and connections / D. R. Appling, S. J. Anthony-Cahill, C. K. Mathews. — Pearson, 2015. — 912 p.
5. Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N-Y : W. H. Freeman and Company, 2002. — 1514 p.
6. Lehninger principles of biochemistry / D. L. Nelson, M. M. Cox. — N-Y : Worth Publishers, 2000. — 1152 p.