

# Биологическое окисление - 2

*Тканевое дыхание, окислительное  
фосфорилирование.*

*Микросомальное и перекисное окисление*

Проф. А.И. Грицук

# Биоэнергетика М.Мир, 1985 г



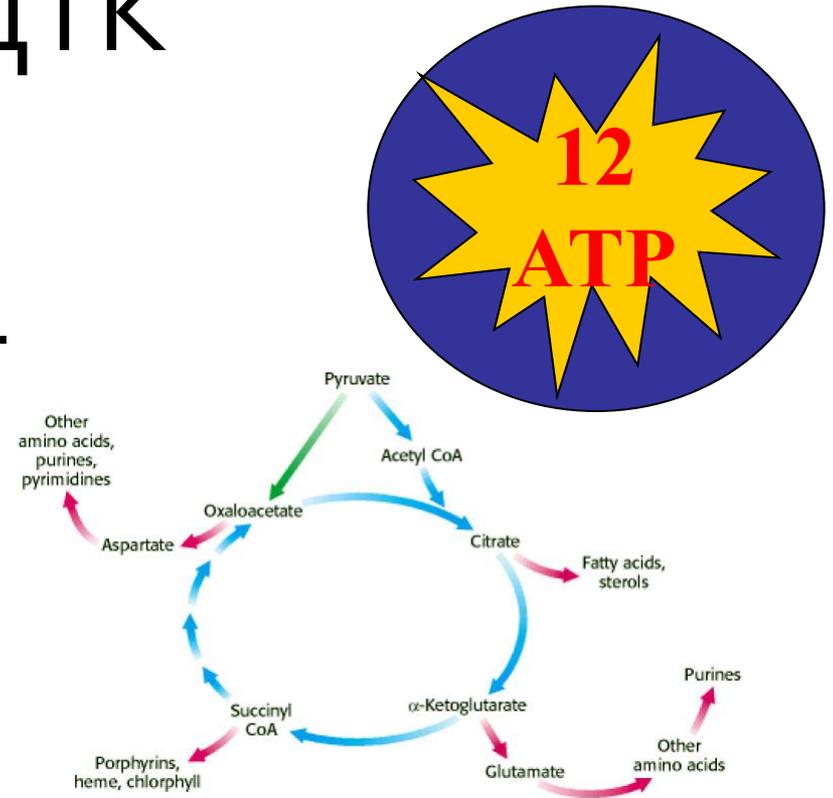
AB TULP

# Содержание

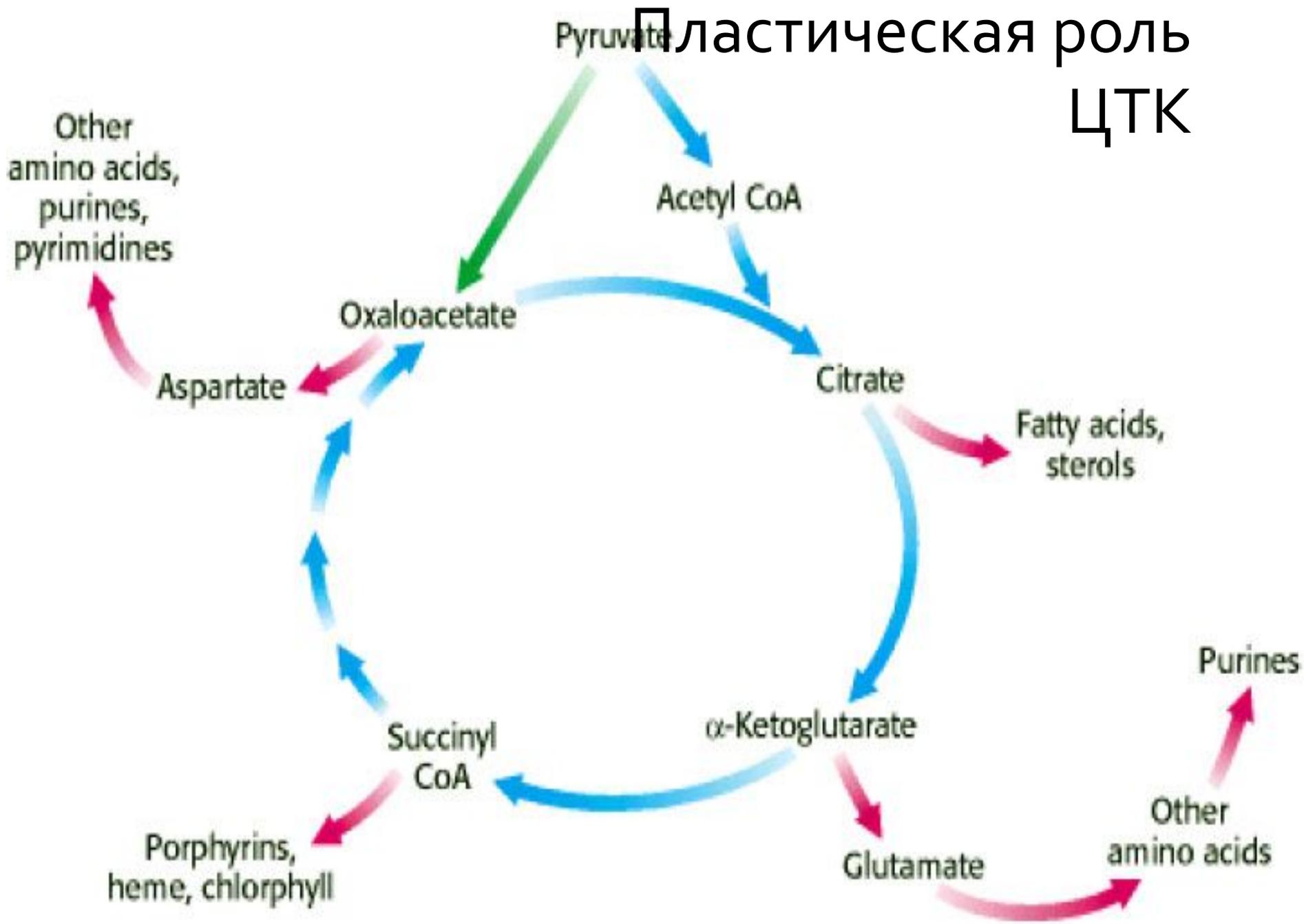
- Роль и регуляция ЦТК
- Пути потребления  $O_2$  в организме
- Структура и функция Мх
- Окислительное фосфорилирование
- Митохондриальное окисление
- Пероксидазный путь
- Моноксигеназные системы Диоксигеназные системы
- Свободные радикалы, Перекисное окисление и антиоксиданты

# Роль ЦТК

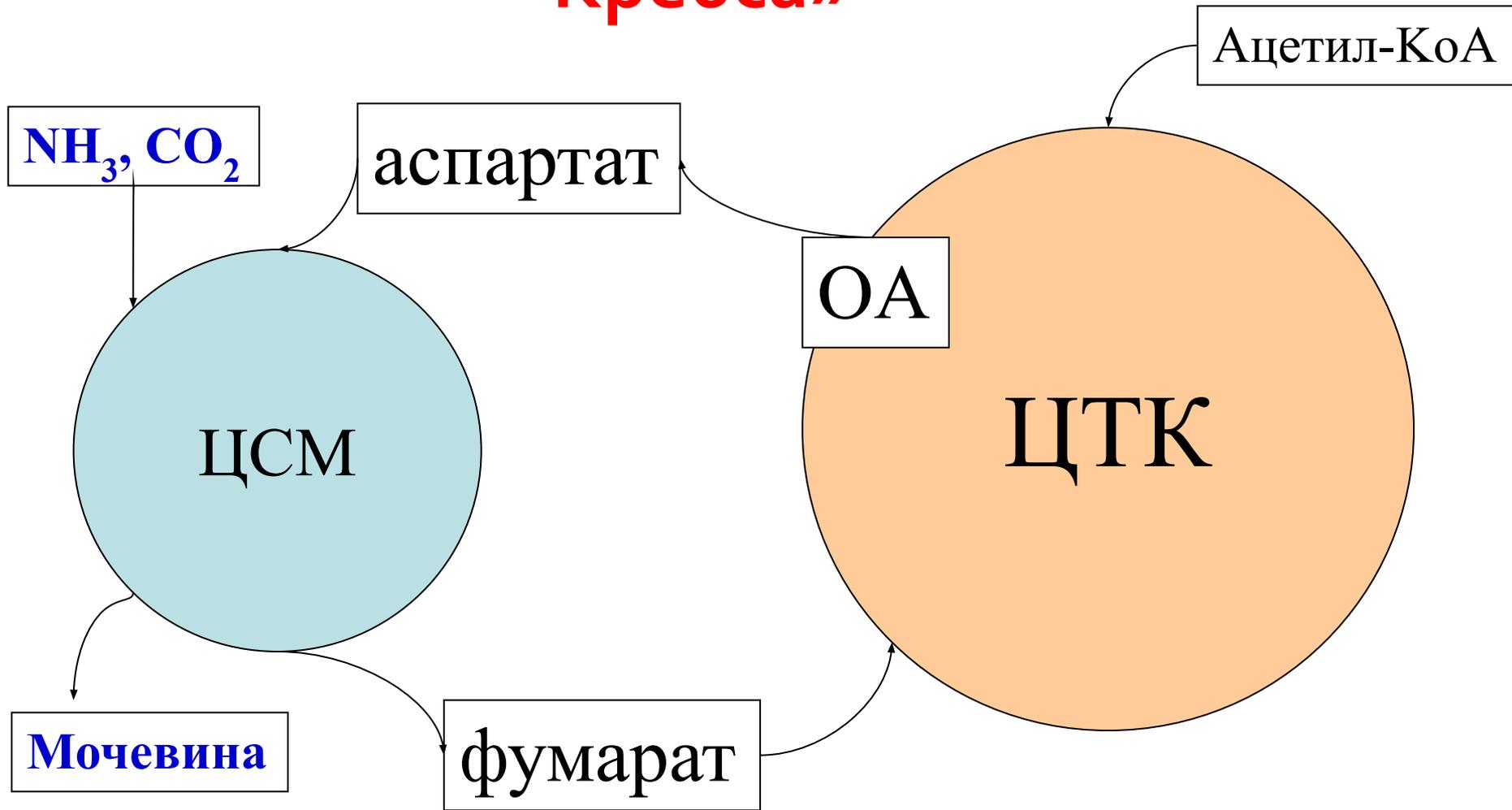
- Энергетическая
  - 1 оборот ЦТК = 12 АТФ.
- Пластическая
  - $\alpha$ -КГ  $\square$  glu.
  - ОА  $\square$  asp.
  - Succinyl-CoA  $\square$  heme.
- Регуляторная
  - ЦСМ (образование мочевины в печени) связан с ЦТК.



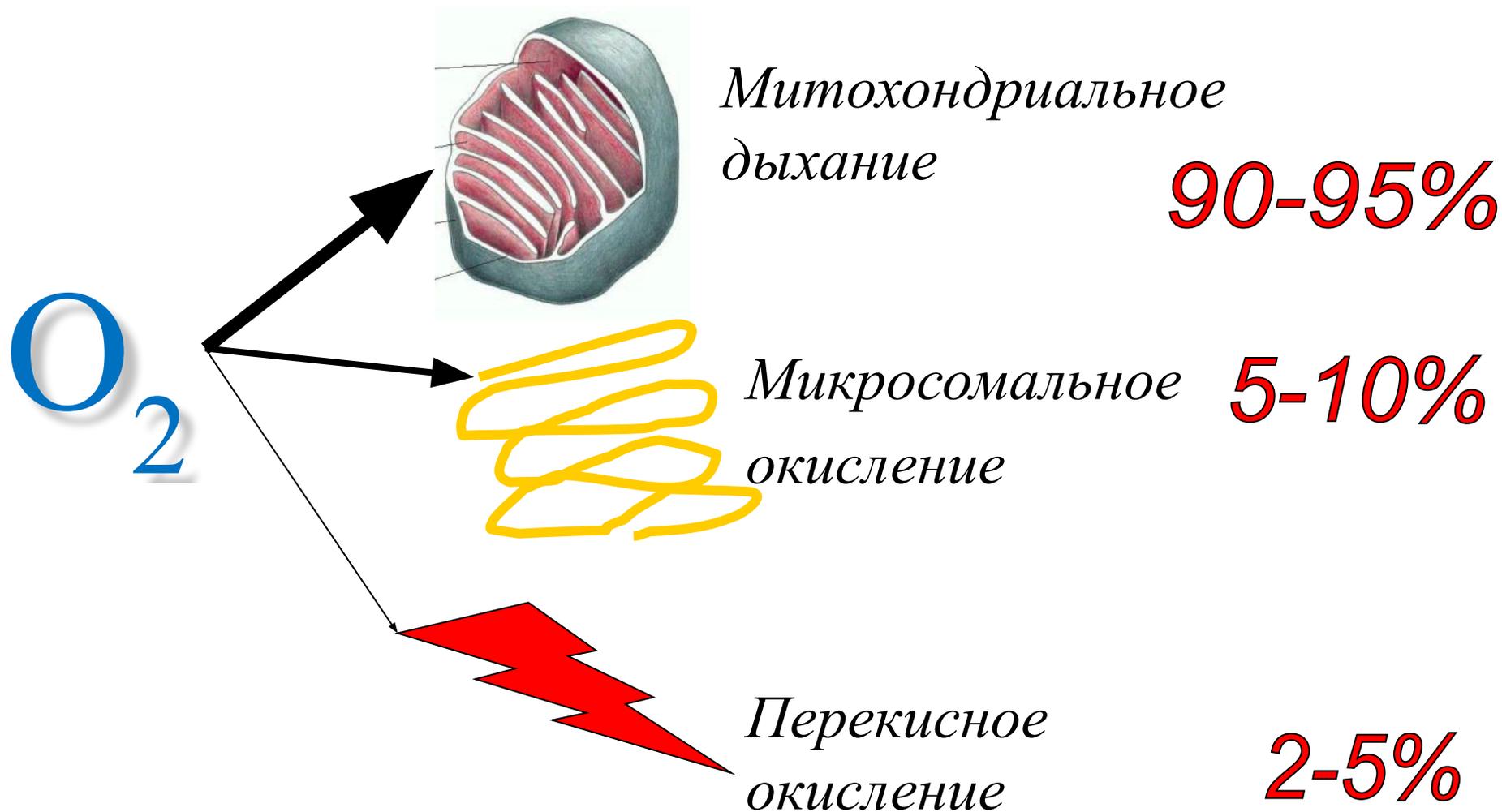
# Пластическая роль ЦТК



# Регуляторная роль «велосипеда Кребса»



# Пути утилизации $O_2$ в организме



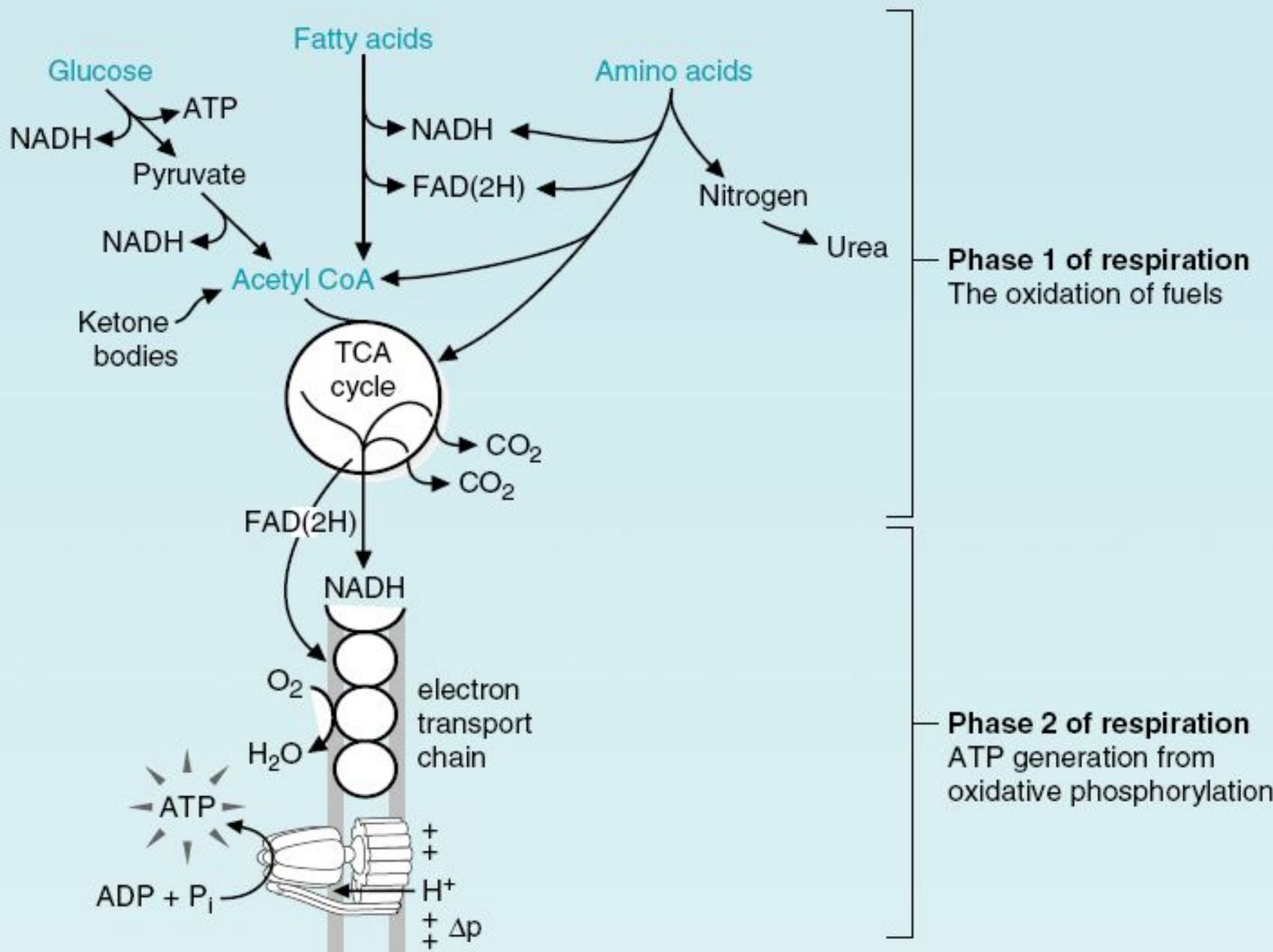
# Биологическое окисление (БО)

- **Окисление** – процесс отнятия электронов  
**Восстановление** – их присоединение
- **Биологическое окисление** может происходить без участия молекулярного кислорода
- **Тканевое дыхание** – процесс производства клетками энергии в форме АТФ путем контролируемой реакции взаимодействия водорода с кислородом с образованием воды
- $2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O \longrightarrow H_2O$

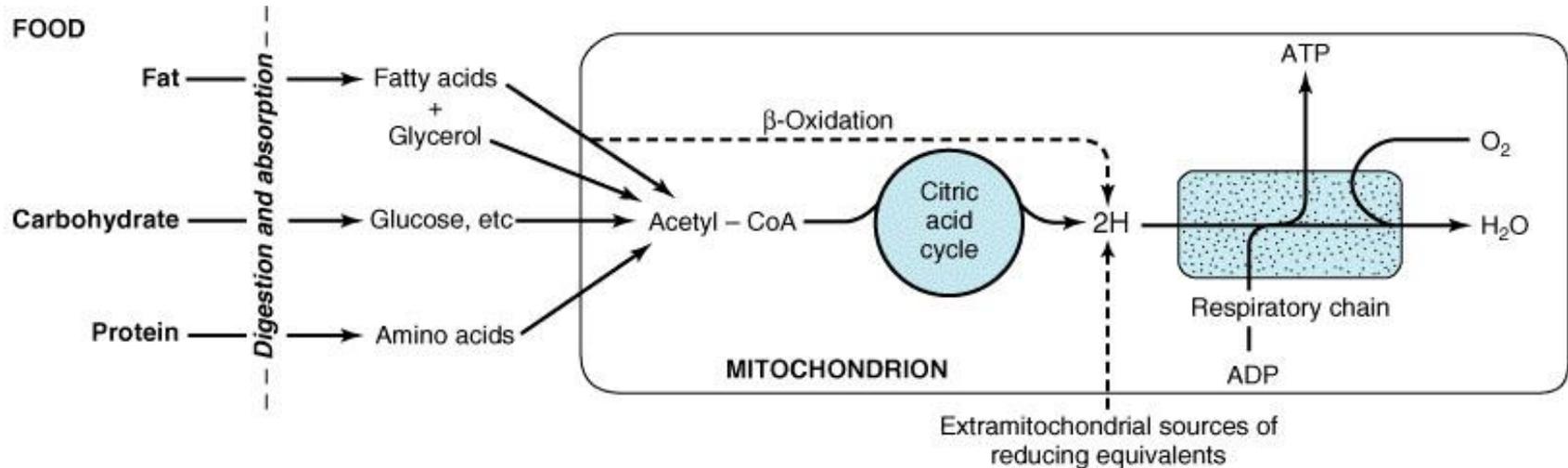
# Биомедицинское значение

## БО

- Основа жизнедеятельности обеспечивает антиэнтропийную функцию организма
- $O_2$  внедряется в структуру различных субстратов с помощью ферментов **оксигеназ**
  - Многие лекарства, поллютанты, химические канцерогены и другие **ксенобиотики** метаболизируют с помощью ферментов этого класса и известны как **система цитохрома P450**
- Пероксидным путем образуются многие БАВ (гормоны, медиаторы, P<sub>g</sub>, LT, ТХА и др.)
- Применение  $O_2$  может быть жизненно необходимым для лечения дыхательной и сердечной недостаточности



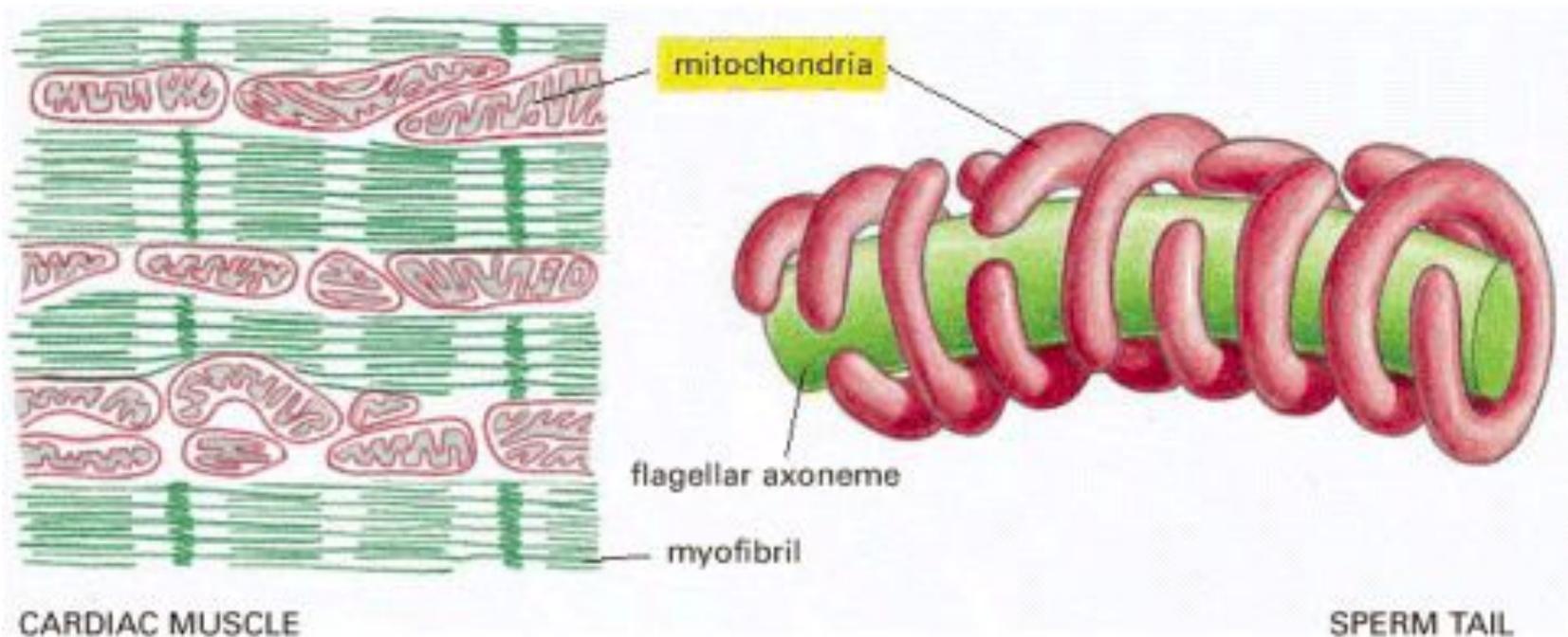
# Превращение энергии: Митохондрии



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc.  
All rights reserved.

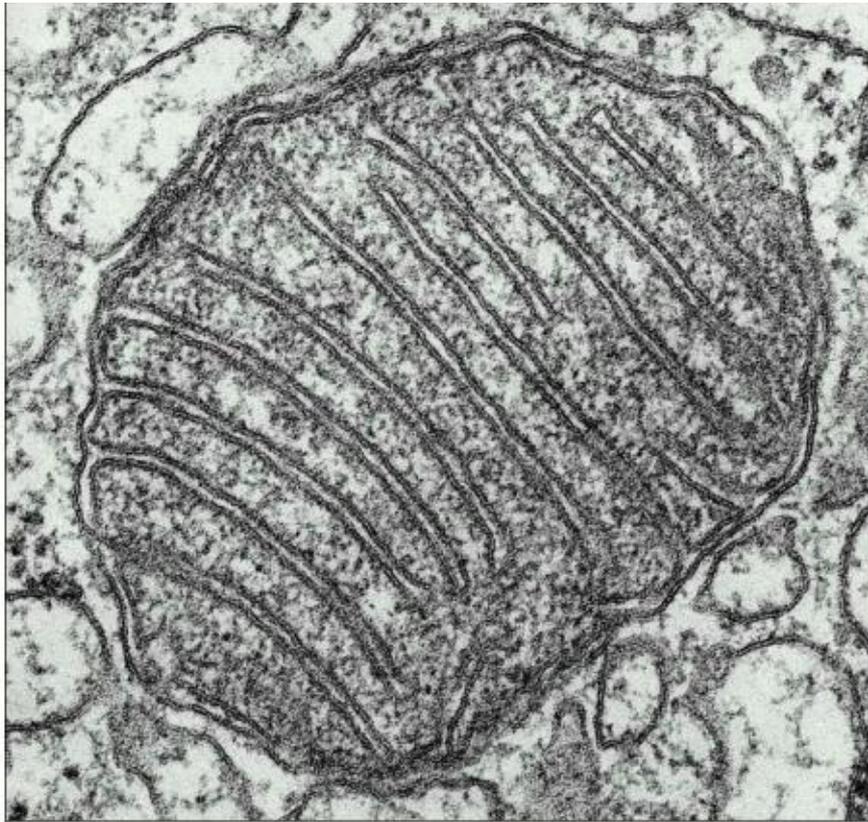
- После цитозольной стадии БО, энергия производится из частично окисленных молекул углеводов и используется для производства АТФ
- Производства энергии более эффективно на сопрягающих мембранах
- При аэробном окислении продукция АТФ из «пищевых» молекул **max** эффективно

# Митохондрии: локализация в клетке

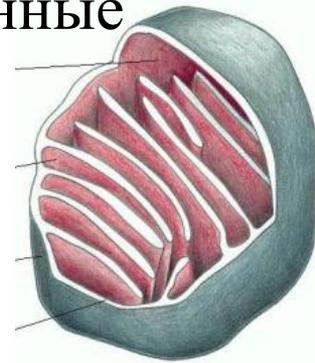


- **Митохондрии:** вытянутые цилиндры,  $\varnothing$  0.5 - 1.0  $\mu\text{m}$ .
  - В живых клетках Мх мобильные и пластичные органеллы, постоянно изменяющие форму, способные к делению и слиянию в соответствии с физиологическим состоянием ткани

# Общая структура Мх



- В печени около 67% общего белка Мх находится в матриксе, 21% - во внутренней мембране, по 6% - в межмембранном пространстве и в наружной мембране.
- Каждые из этих компартментов содержит специфические белки, выполняющие определенные функции



# Сравнительная характеристика мембран Мх

## Наружная мембрана

- MAO (моноаминооксидаза)
- Элонгаза ЖК
- Холинфосфотрансфераза
- Фосфолипаза А

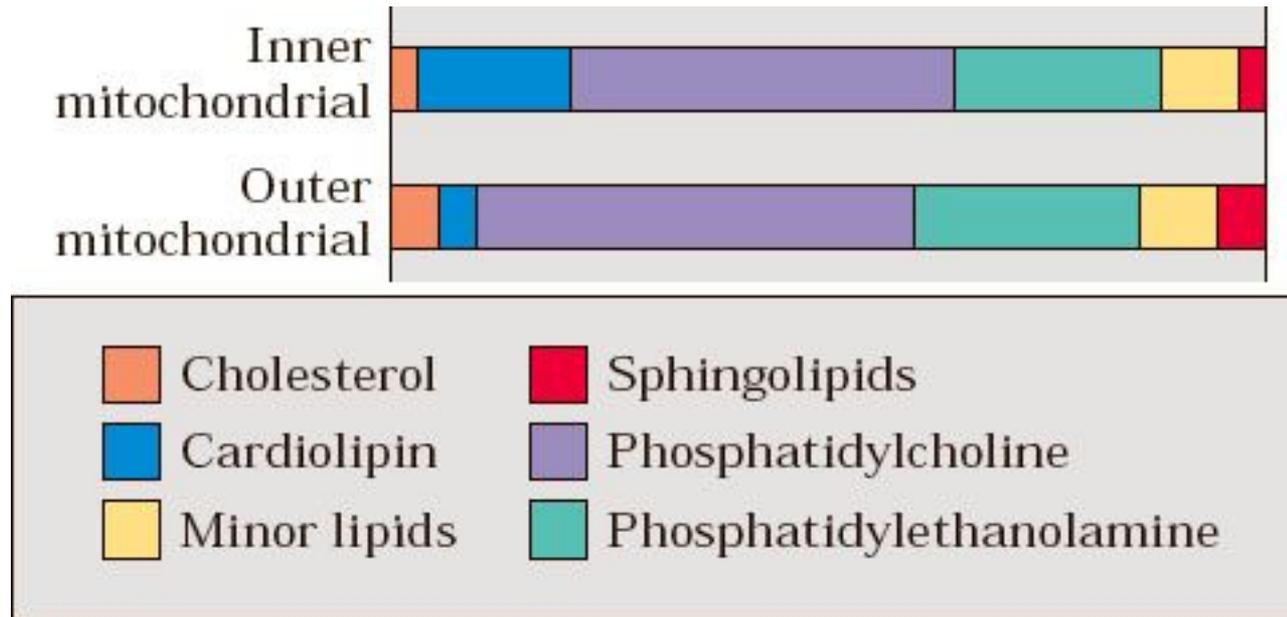
## Matrix

- Ферменты ЦТК
- Ферменты  $\beta$ -окисл ЖК
- ПВК-карбоксилаза
- ГДГ

## Внутренняя мембрана

- NADH ДГ
- СДГ
- Цитохромы  $b, c_1, c, a, a_3$ 
  - Карнитинацил трансфераза
  - АДФ-АТФ транслоказа
  - Фосфат трансфераза
  - Глу-асп транслоказа
  - Глу-ОН<sup>-</sup> транслоказа
  - ПВК транслоказа
  - Малат-цитрат транслоказа
  - Малат- $\alpha$ -КГ транслоказа translocase

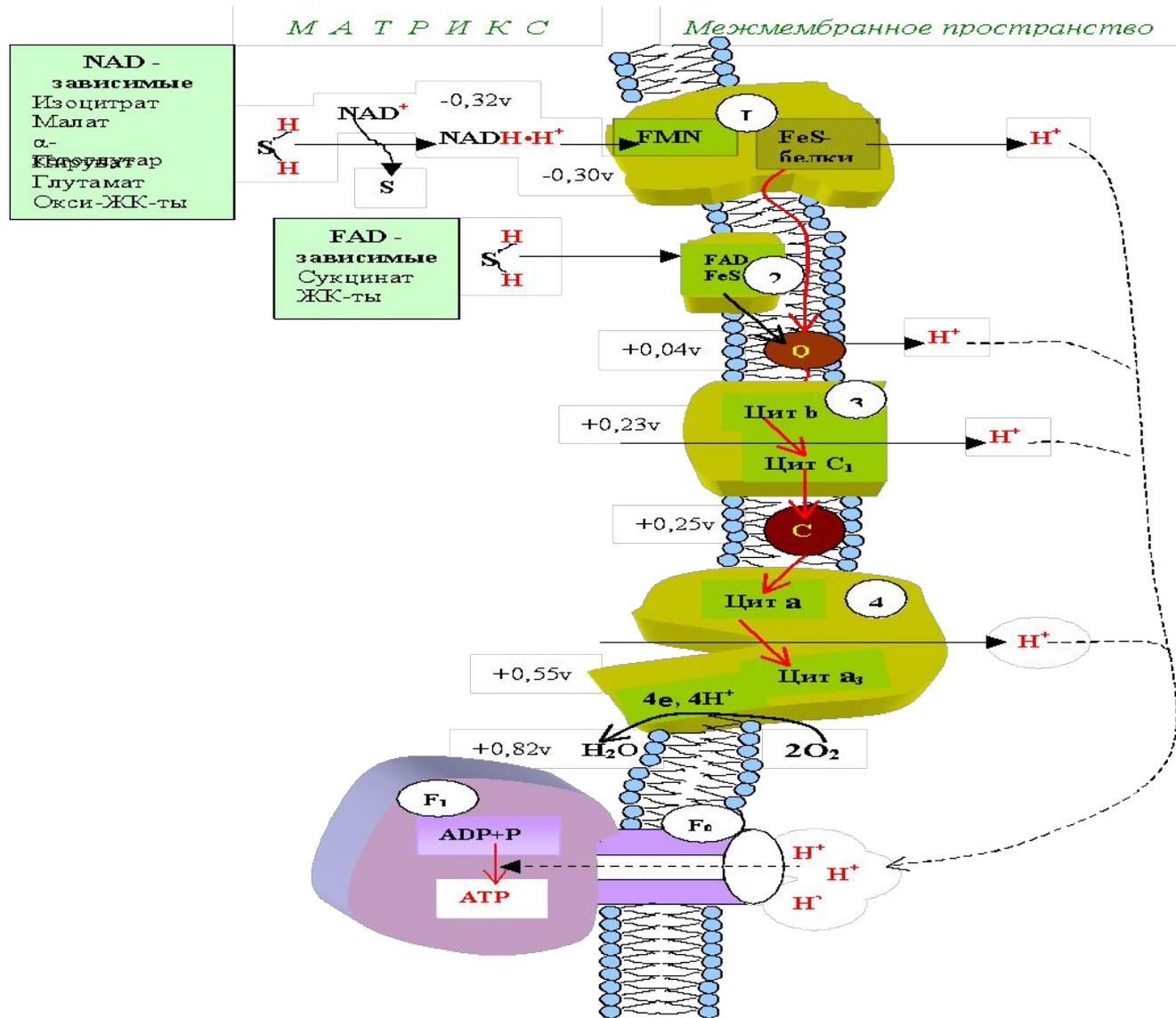
# Липидный состав мембран Мх



## Внутренняя мембрана:

- содержит 70 % белка и 30 % липидов
- Специфический ФЛ - **кардиолипин**
- Мало холестерина и сфинголипидов

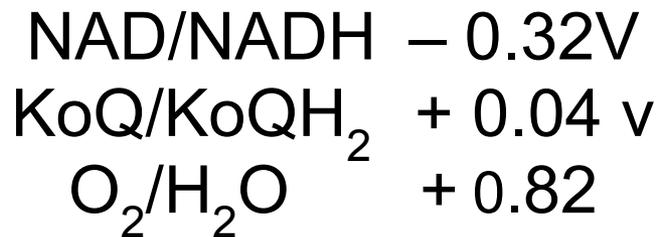
# Общая структура ДЦ Мх



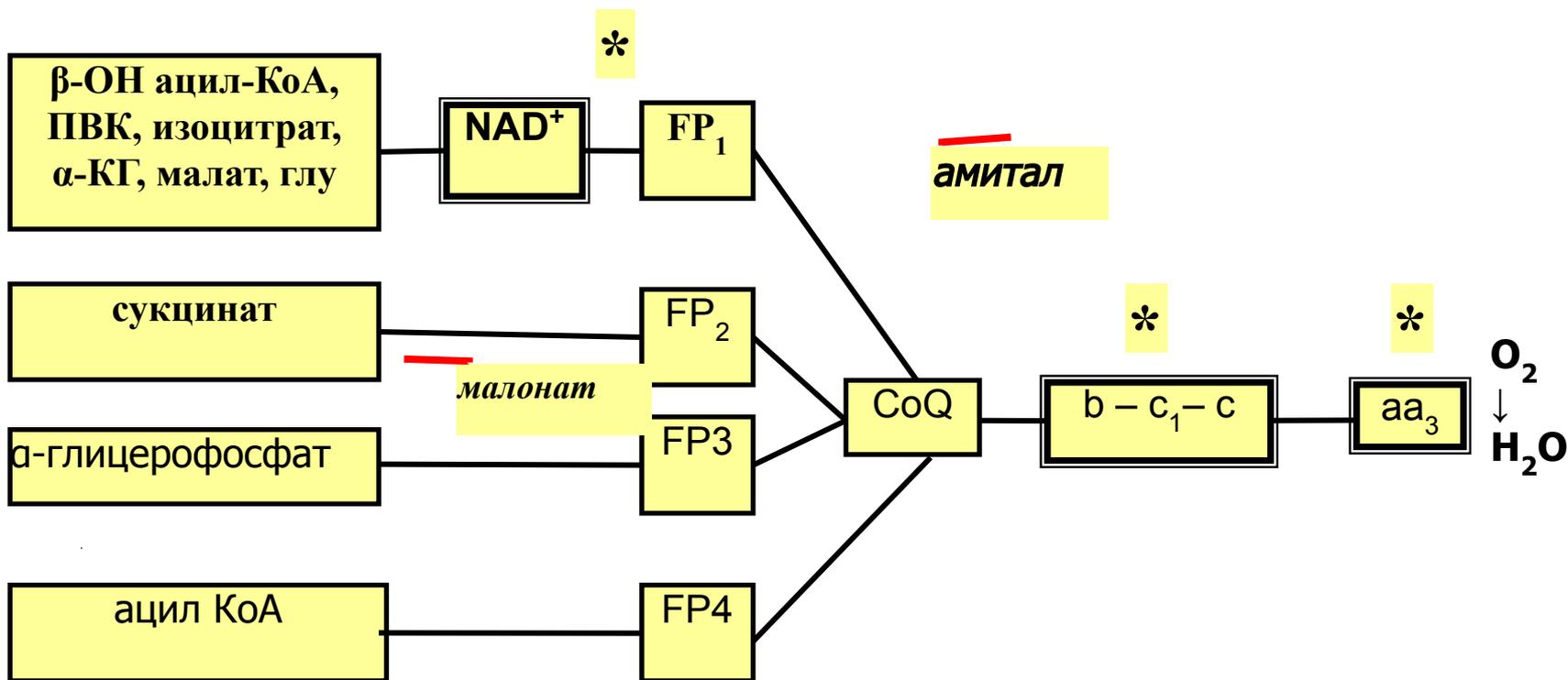
Дыхательная цепь и 5-й комплекс

# Электрон-транспортная (дыхательная) цепь ЭТЦ (ДЦ)

- В Мх содержатся ферментные ансамбли - ЭТЦ ДЦ (*до 70 белков*) транспортирующие восстановленные эквиваленты и направляющие их на финальную реакцию с  $O_2$  с образованием воды
- Компоненты ДЦ иммобилизованы во внутренней мембране Мх
- Движущей силой транспорта электронов по ДЦ является разница ОВП (редокс-потенциала) ее компонентов



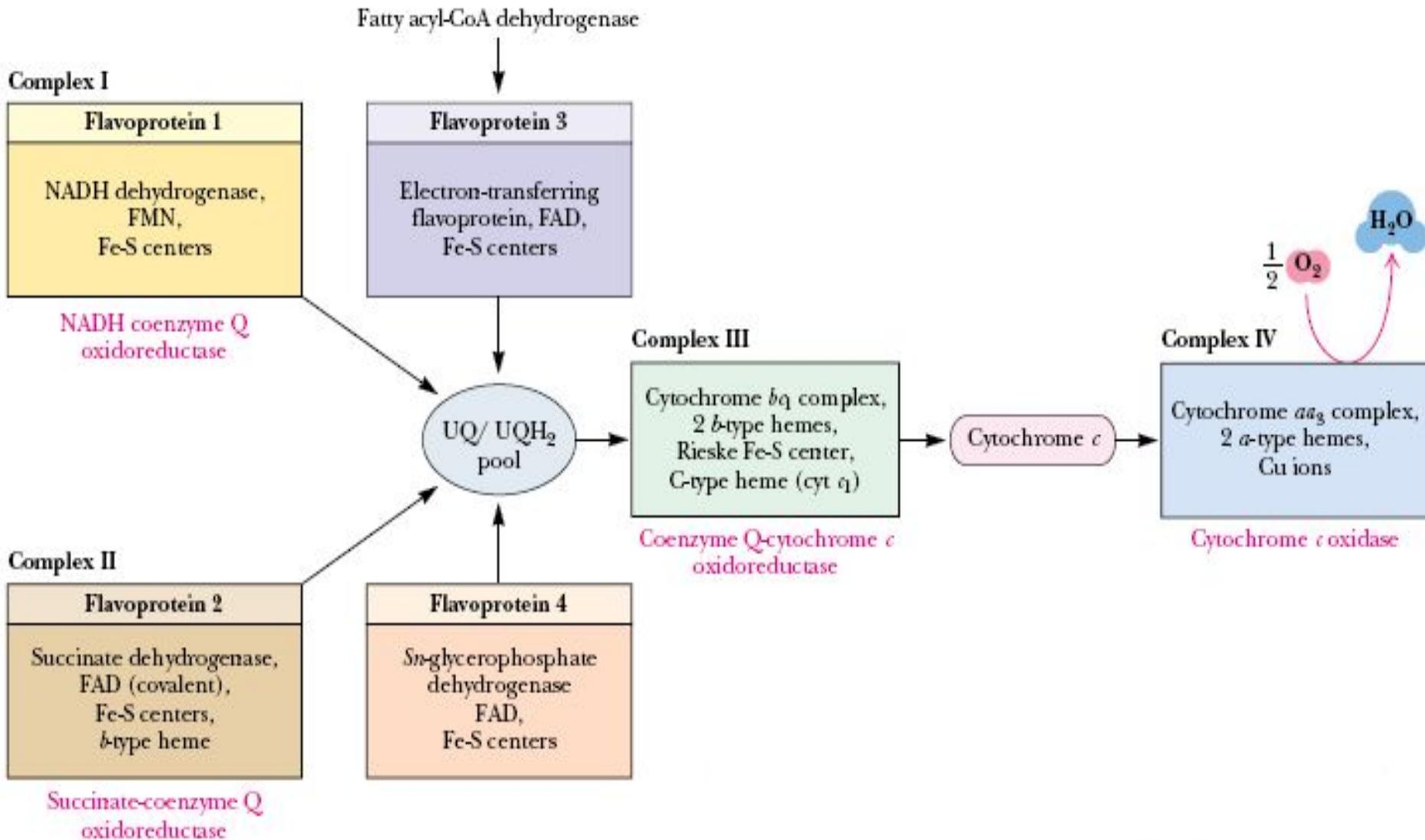
# Схема ДЦ и действие ингибиторов



# Отношение P/O

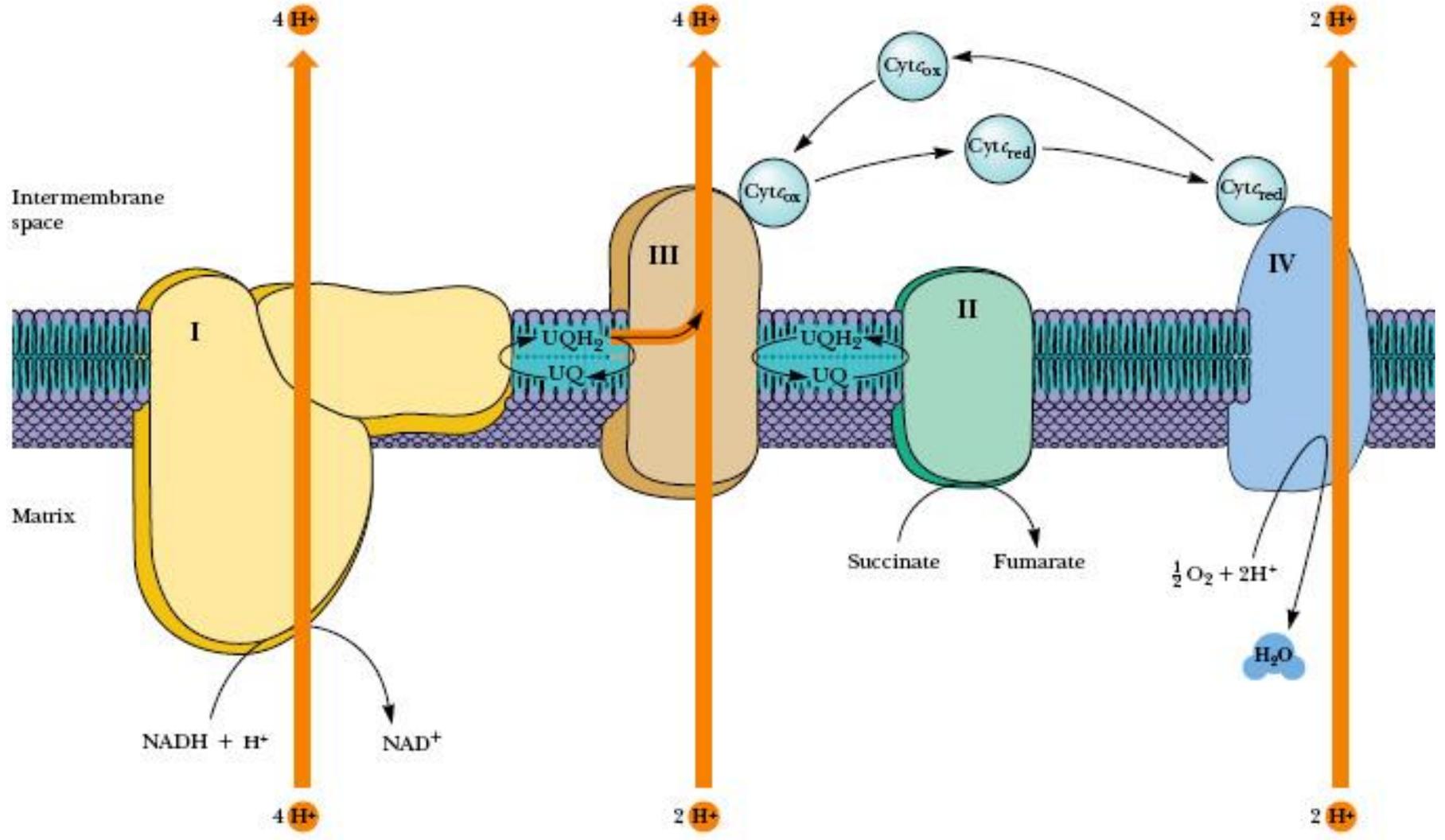
- **P/O** количественный показатель степени сопряжения ОФ
- Отношение **P/O** отражает кол-во молекул  $\Phi_n$ , пошедших на образование АТФ к количеству поглощенных атомов кислорода
- При транспорте электронов с  $NADH$  в ДЦ образуется  $\approx 3$  молей АТФ
- При транспорте электронов с  $FADH_2$  в ДЦ образуется  $\approx 2$  молей АТФ
  - $NADH$  зависимые субстраты  $P/O = 3$
  - $FADH_2$  зависимые субстраты  $P/O = 2$
  - Адреналин, аскорбат  $P/O = 1$

# Структура ДЦ : Обзор



# Электрон-транспортная (дыхательная) цепь

## ЭТЦ (ДЦ)



# Функции ДЦ

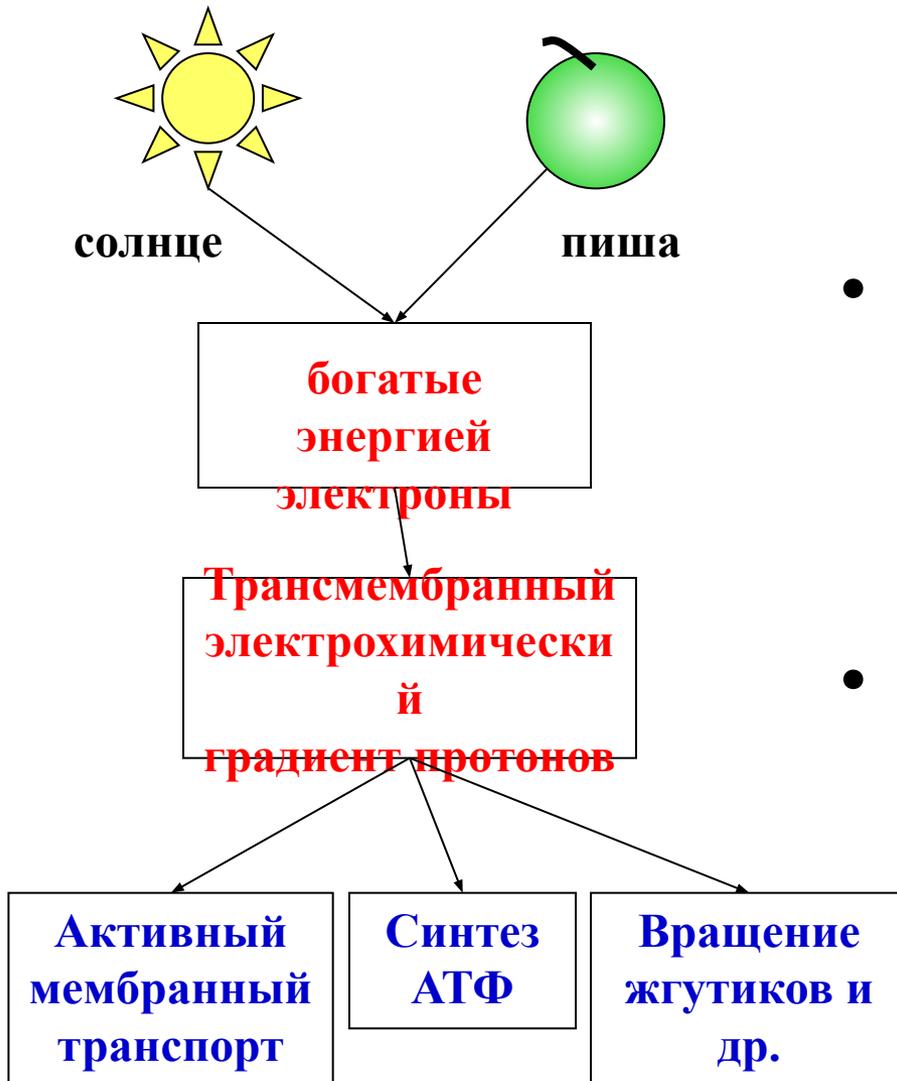
1. Общая финальная стадия БО всех аэробных клеток
2.  $\text{NAD}^+$  и  $\text{FAD}$  восстановленные до  $\text{NADH} + \text{H}^+$  и  $\text{FADH}_2$  в окислительных реакциях в ДЦ реокисляются до  $\text{NAD}^+$  и  $\text{FAD}$
3. В сопрягающих комплексах (I, III и IV) происходит превращение энергии транспорта электронов в энергию АТФ
4. Главный источник АТФ и др. видов биологически конвертируемой энергии аэробных клеток

# Механизм образования АТФ в Мх

(гипотезы сопряжения ТД и ОФ)

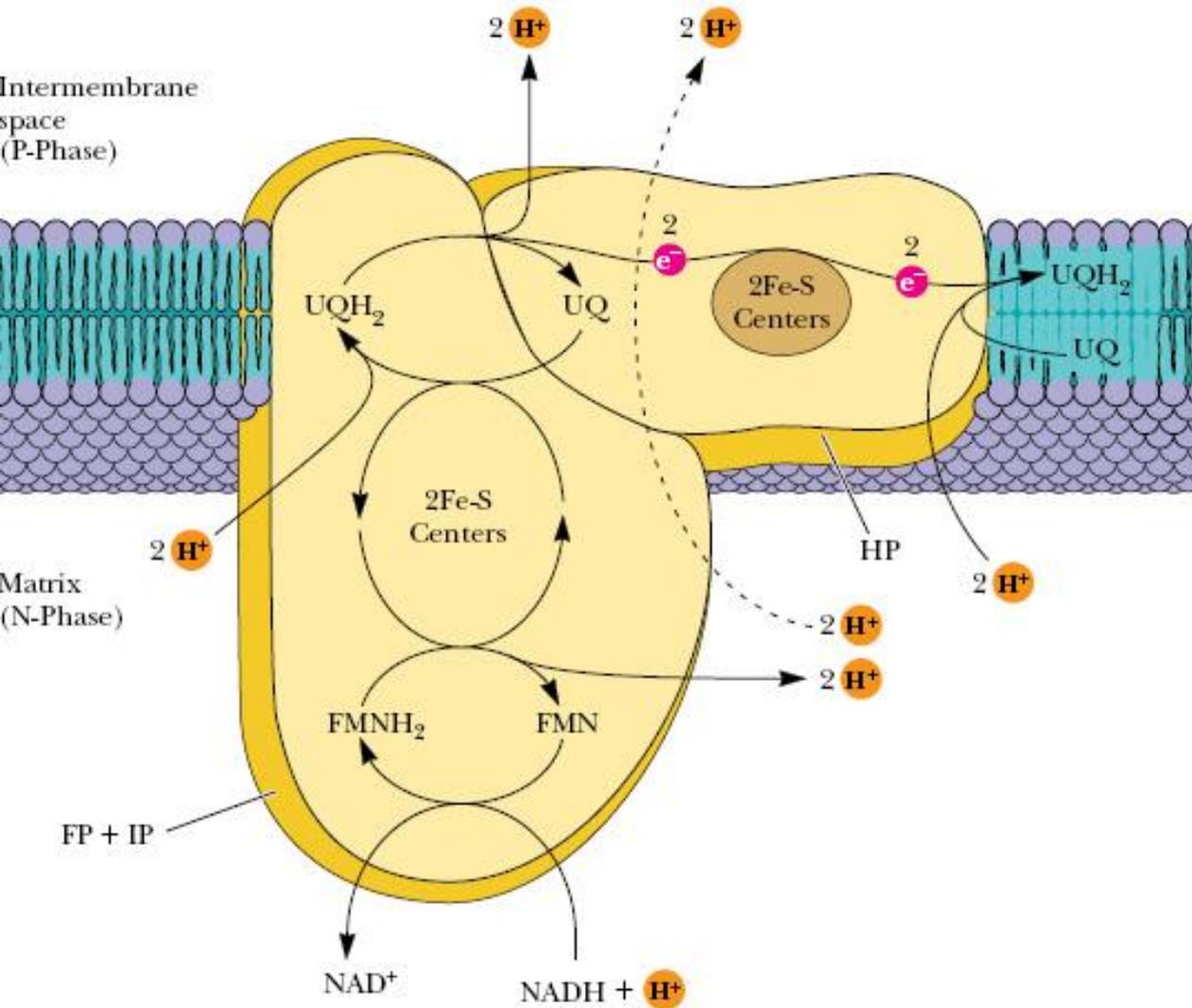
- Химического сопряжения (Слейтер)
- Конформационного сопряжения (Бойер)
- Хемиосмотического сопряжения (Митчел, 1961) Нобелевская премия 1978 г

# Хемиосмотическое сопряжение



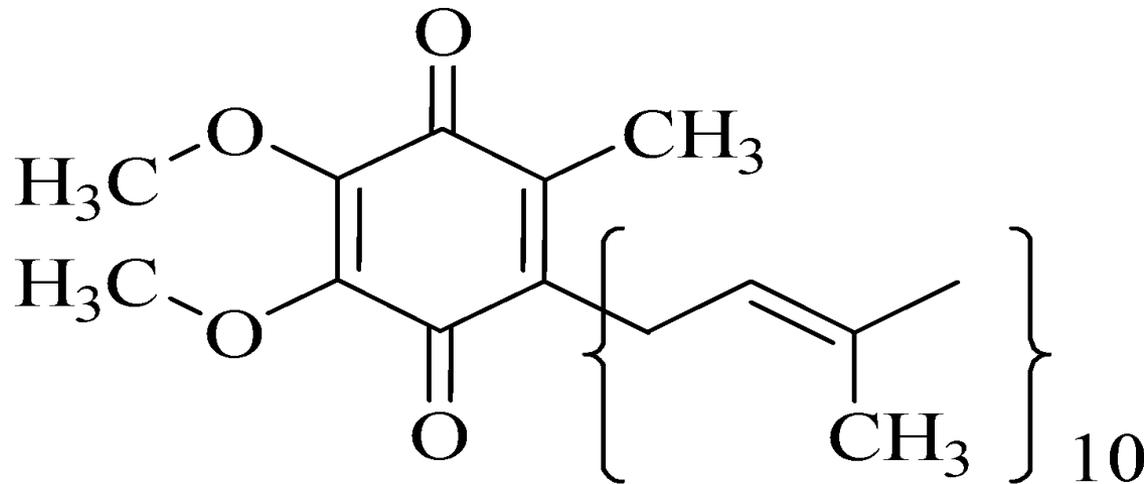
- Общий путь используется *Мх, хлоропластами и прокариотами* для производства энергии на биологические нужды
- **Хемиосмотическое сопряжение** отражает связь между химическими реакциями («хеми») генерации АТФ и мембранным транспортом («осмотическое»)
- Процесс сопряжения протекает в две связанные стадии, каждая из которых происходит с участием комплексов ДЦ внутренней мембраны Мх

# Комплекс I (*NADH-CoQ reductase*)



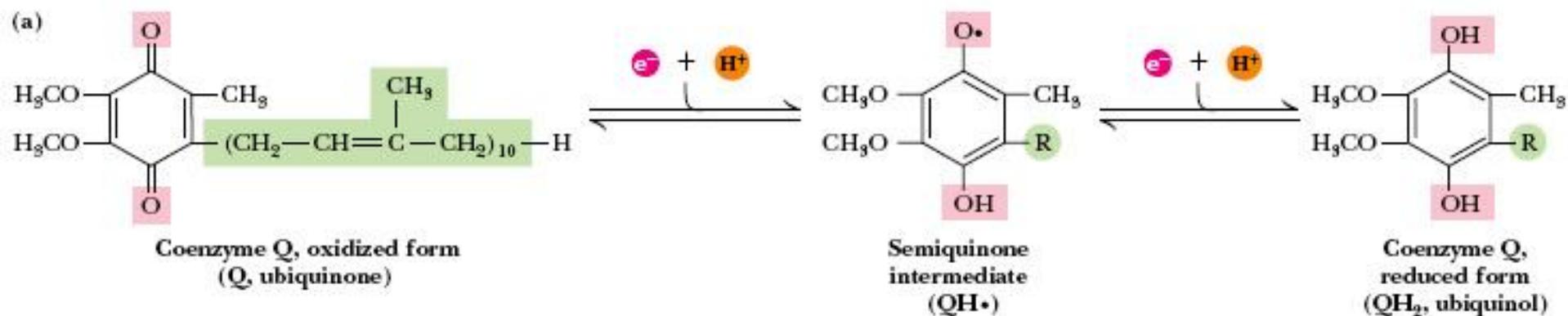
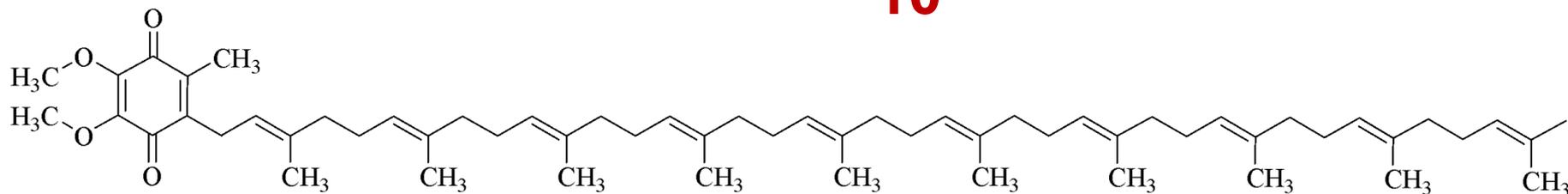
- Содержит:
  - FMN
  - FeS центры (22-24 (Fe-S) белка в 5-7 кластерах)
- Акцептор электронов Ко Q

# Коэнзим Q<sub>10</sub> (КоQ<sub>10</sub>) или Убихинон



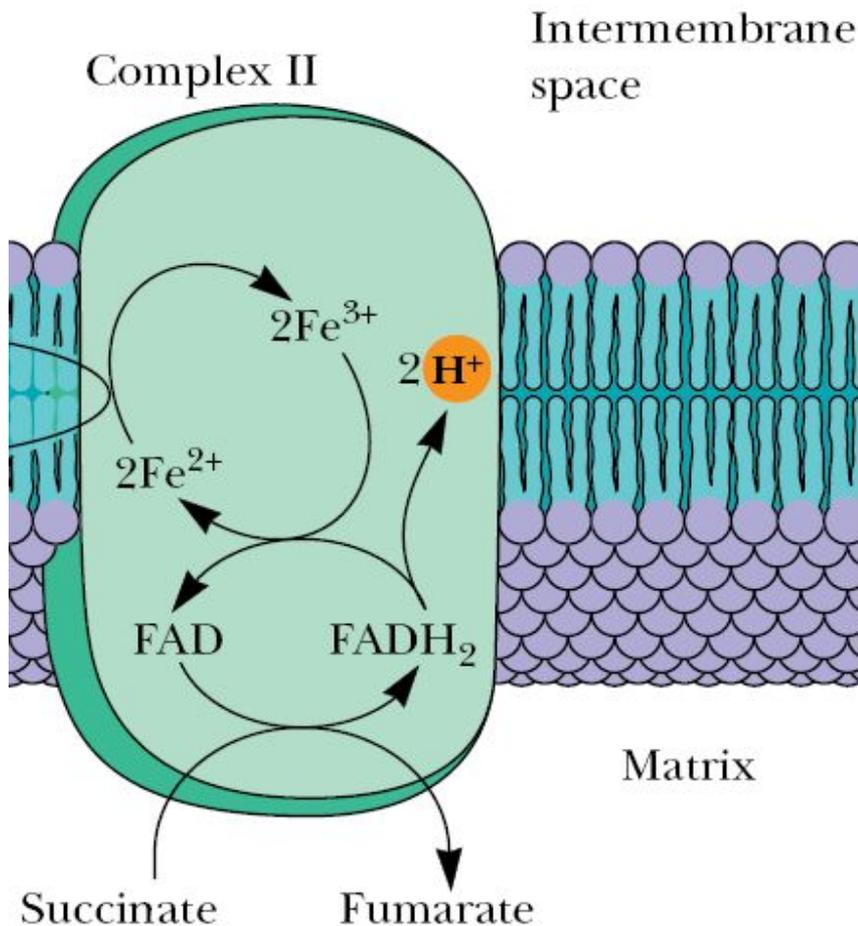
- КоQ<sub>10</sub> компонент расположенный в «середине» ДЦ
- транспортирует электроны с **NADH**, с *сукцината, ацил-КоА* и *α-глицерофосфата*

# KoQ<sub>10</sub>



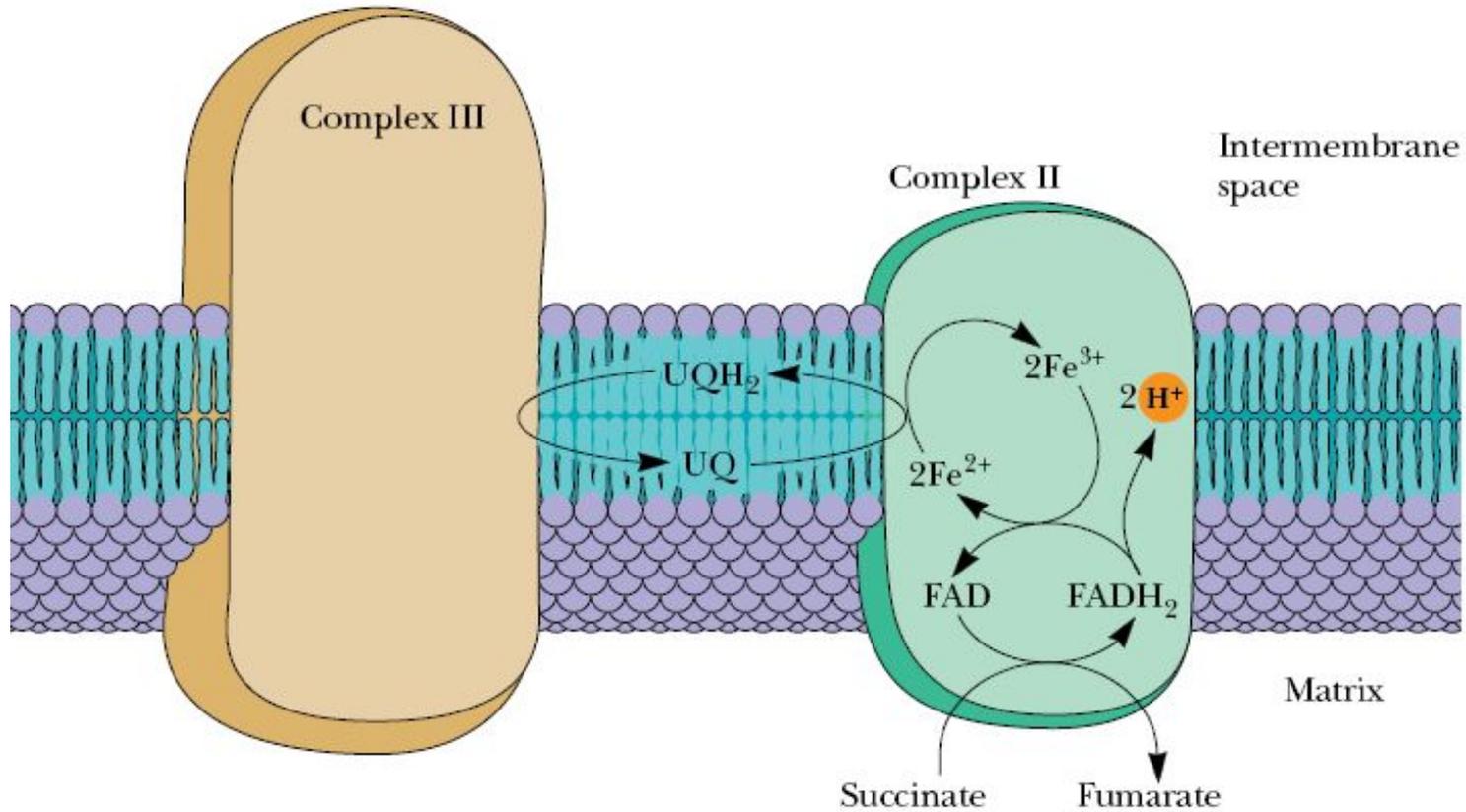
- Окисляется цитохромами
- Это коллектор электронов нескольких FAD-зависимых ДГ

# Комплекс II (Сукцинат-КоQ редуктаза) или СДГ



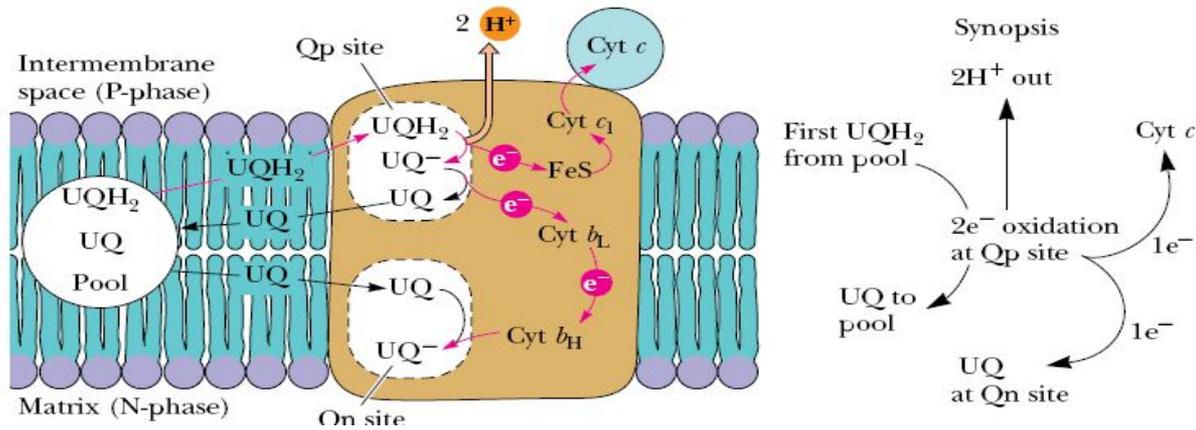
- **Комплекс II** содержит FAD и 7-8 Fe-S белков в 3 кластерах
- **Комплекс II** СДГ, одновременно фермент ЦТК и интегральный белок внутренней мембраны Мх
- Масса СДГ от 100 до 140 kD

# Комплекс II и III



- КоQ акцептирует электроны с обеих комплексов I и II и переносит на комплекс III.

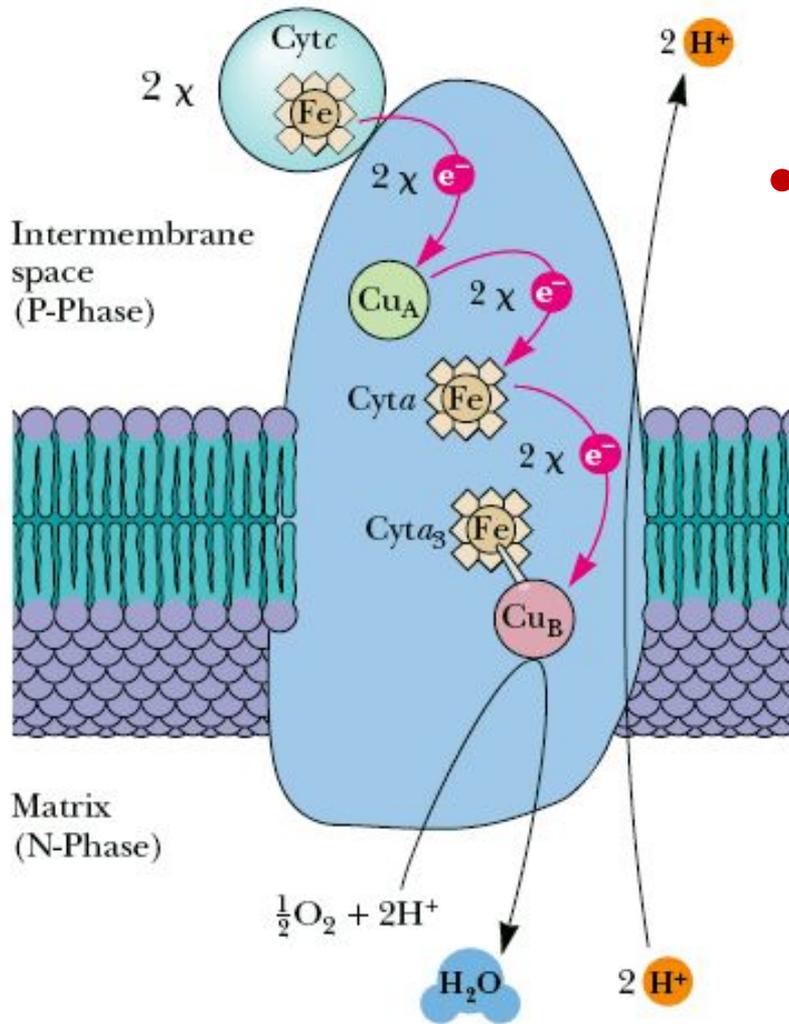
# Q-ЦИКЛ (1/2)



- The electron transfer pathway following oxidation of the first UQH<sub>2</sub> at the Q<sub>p</sub> site near the cytosolic face of the membrane.

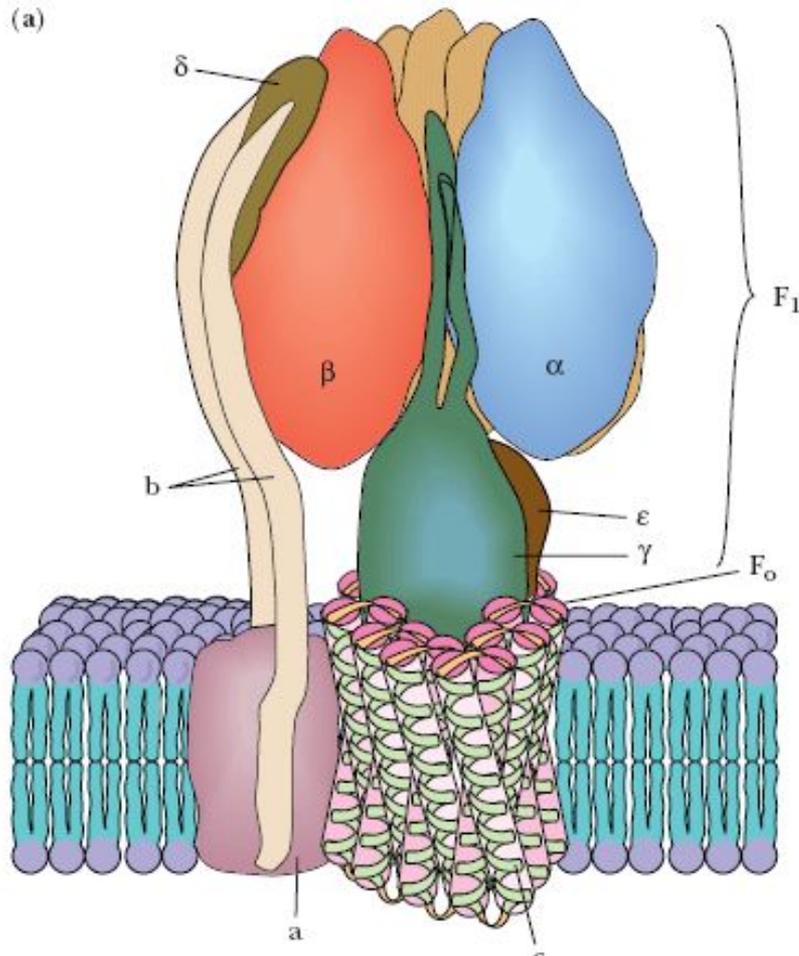


# Комплекс IV: Цитохром с Оксидаза



- **Комплекс IV** назван **Цитохром с Оксидазой** потому что акцептирует электроны с цитохрома с и направляет для **4-х** электронного восстановления  $O_2$  до  $H_2O$

# Комплекс V $H^+$ -АТФ-аза (АТФ-синтаза)



- Ионные градиенты на внутренней мембране - форма хранения биологически конвертируемой энергии, которая совершает полезную работу, когда поток ионов идет в обратном направлении
- Обратный поток  $H^+$  против его электрохимического градиента через АТФ-синтазу – источник синтеза АТФ из АДФ и Фн
- Этот вездесущий фермент играет роль турбины превращающей энергию протонного градиента в АТФ

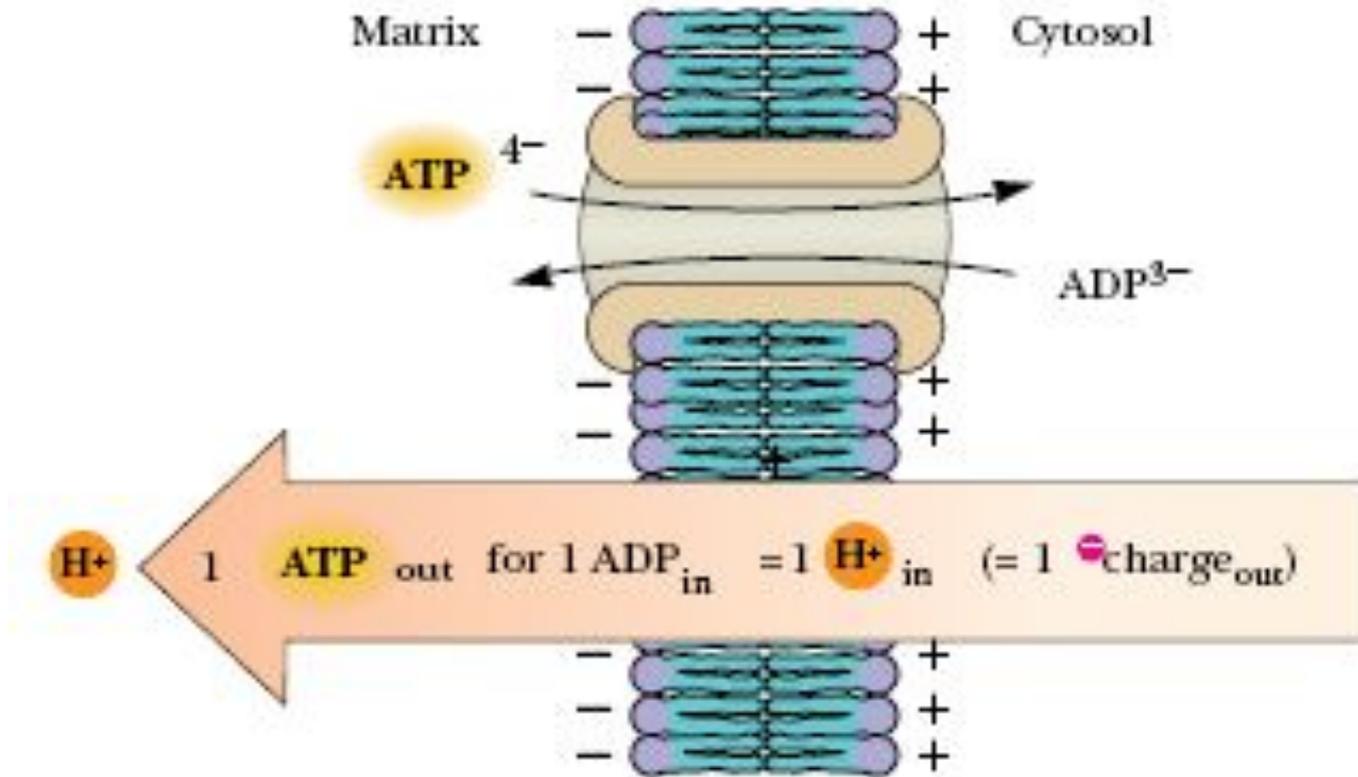
# Структура протонного градиента

- $\Delta \mu_{H^+}$  состоит из  $\Delta \Psi$  и  $\Delta p_{H^+}$

- 

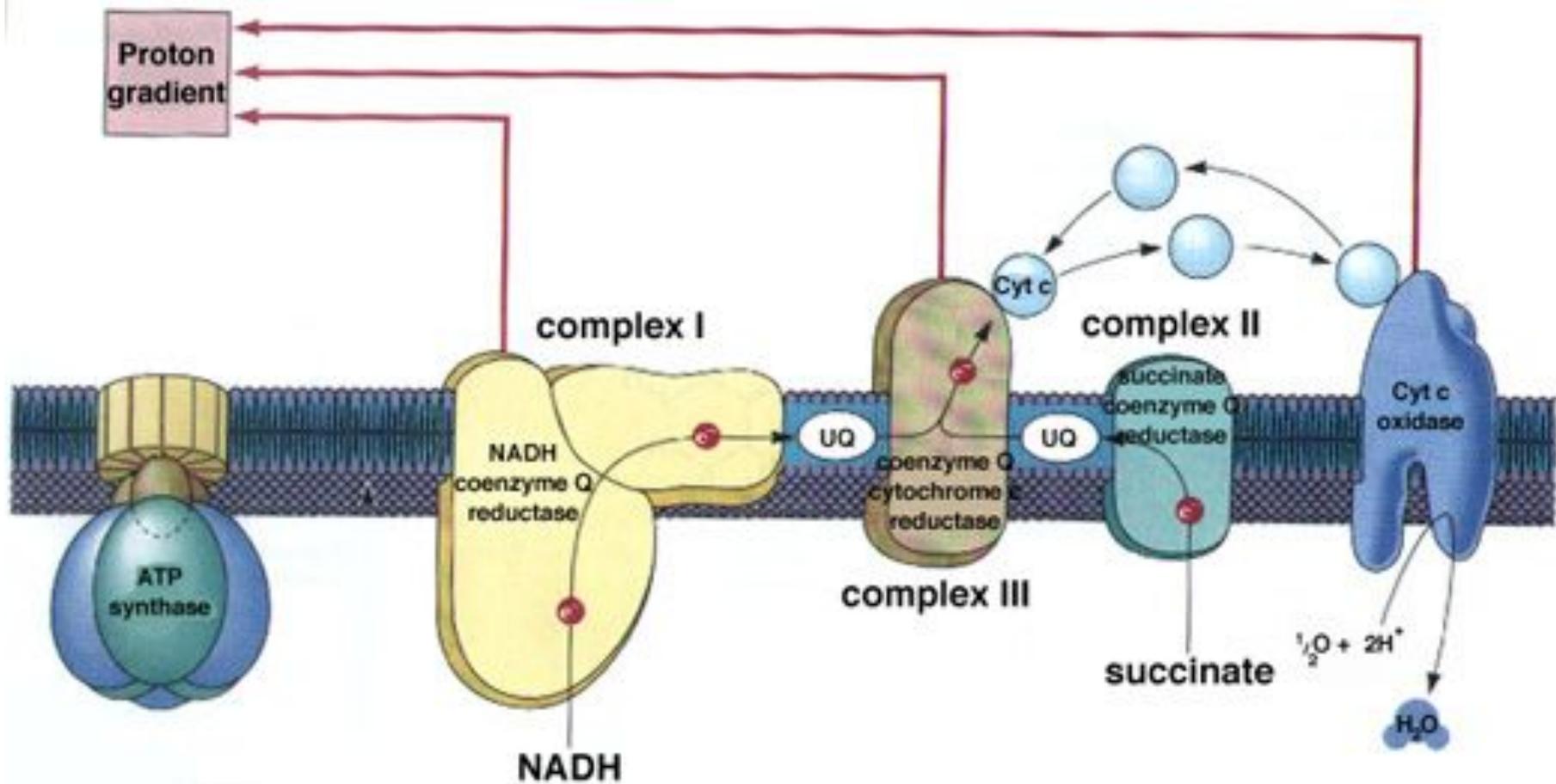
- Величина  $\Delta \mu_{H^+} \approx \mathbf{180}$  мВ ( $\approx \mathbf{250}$  кВ/см<sup>2</sup> внутр мембраны МХ)
- $\Delta p_{H^+}$  составляет  $\approx \mathbf{1}$  рН
- Рассеять энергию  $\Delta \mu_{H^+}$  (разобщить ОФ) можно воздействуя на оба компонента

# АТФ/АДФ транслоказа

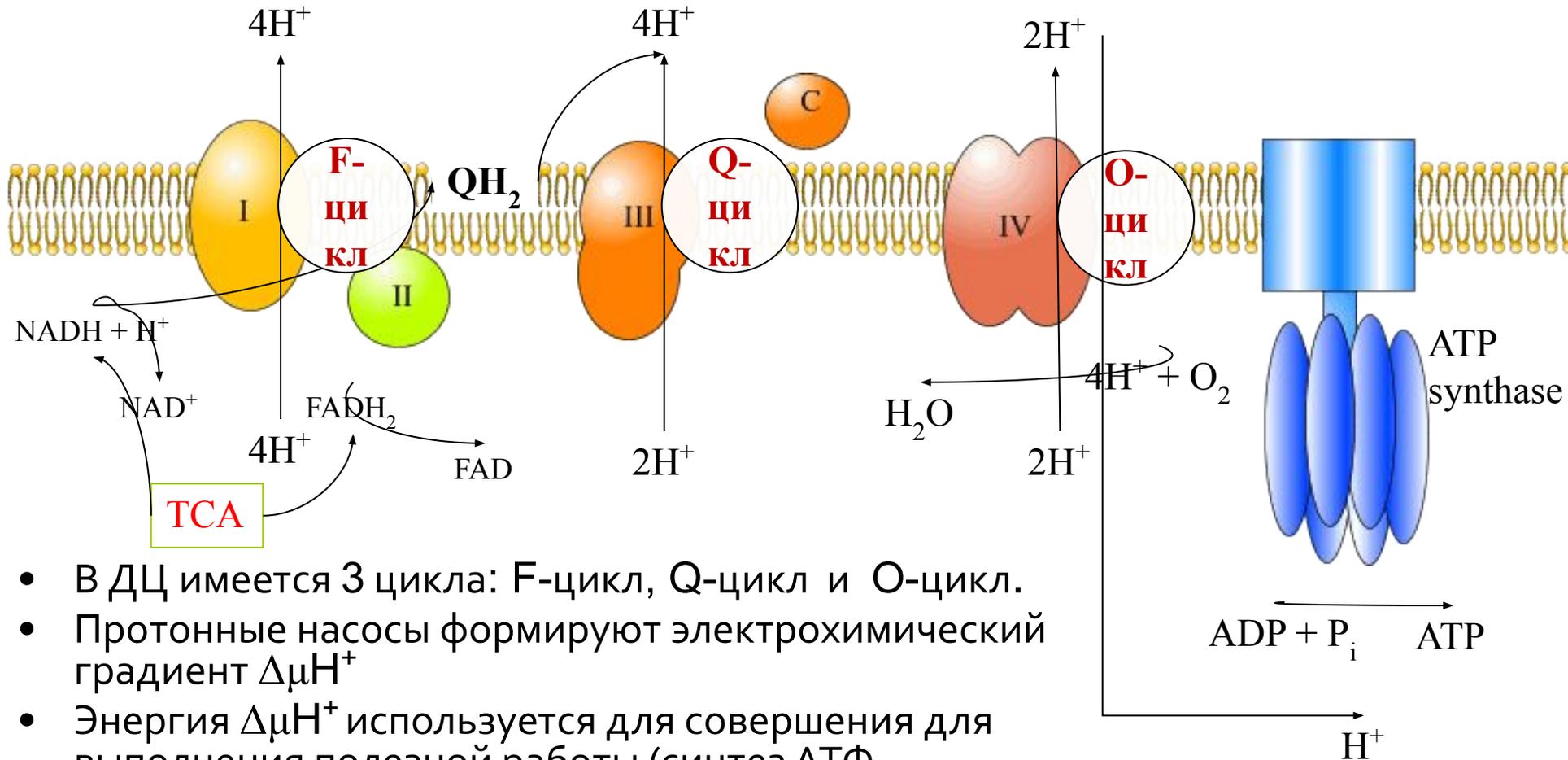


- Транспорт АТФ из Мх (ч/з АТФ/АДФ транслоказу) происходит в мембране митохондрии по электрохимическому потенциалу ( $\Delta\mu H$ )

# Функционирование ДЦ



# Функциональная схема ДЦ

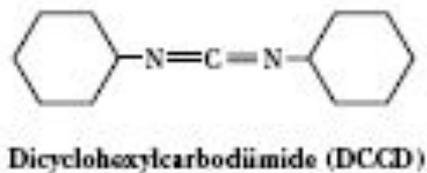
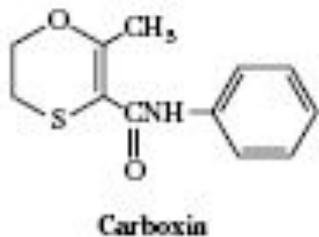
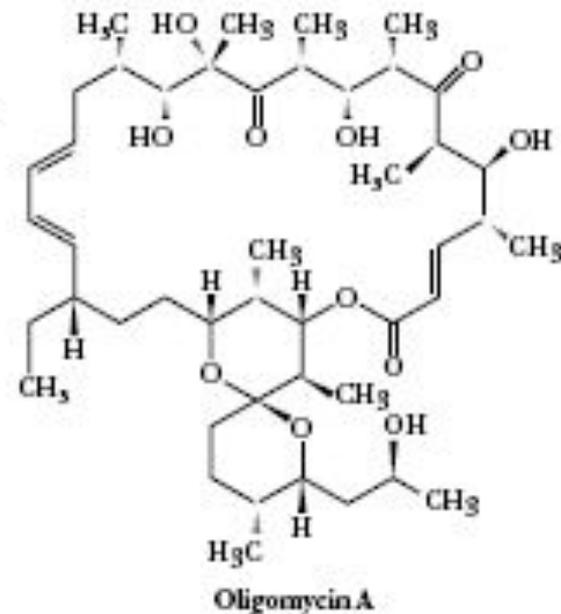
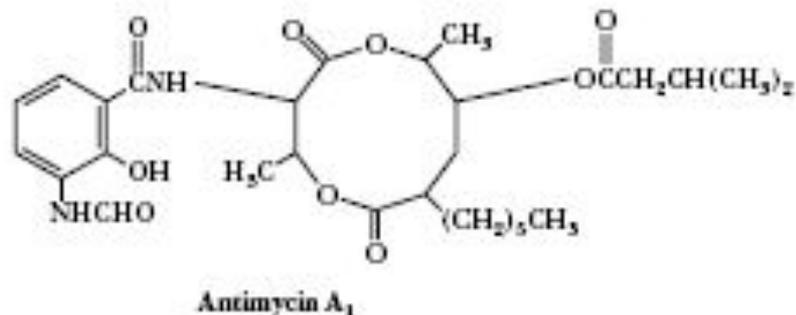
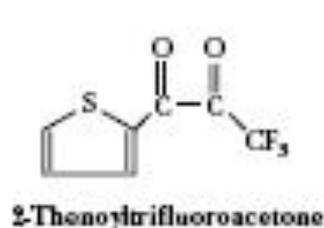
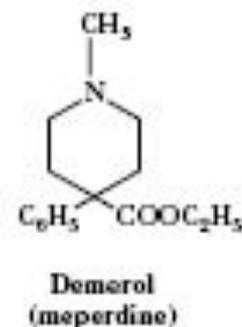
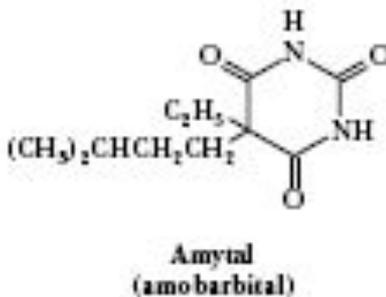
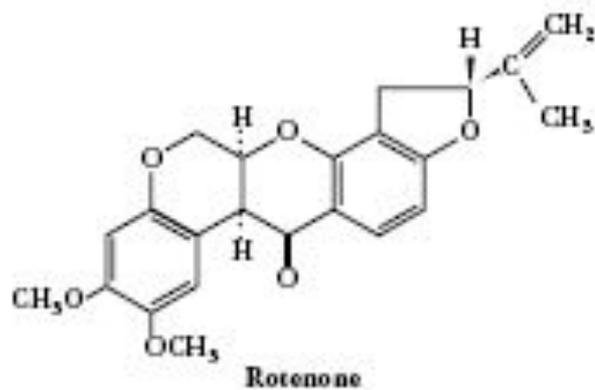


- В ДЦ имеется 3 цикла: F-цикл, Q-цикл и O-цикл.
- Протонные насосы формируют электрохимический градиент  $\Delta\mu\text{H}^+$
- Энергия  $\Delta\mu\text{H}^+$  используется для совершения для выполнения полезной работы (синтез АТФ, осмотической, механической и др.)

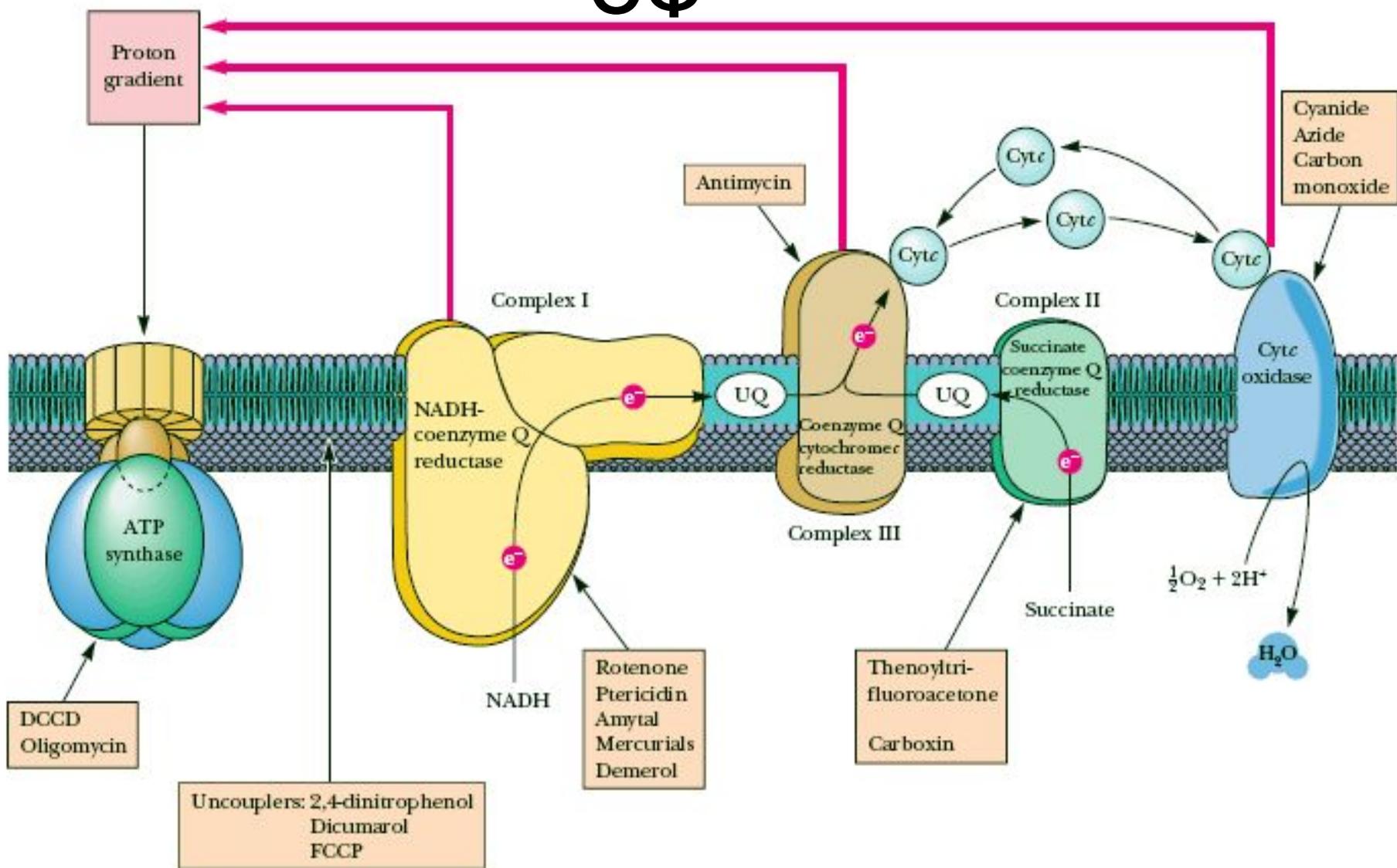
# Inhibitors of Oxidative Phosphorylation

Name	Function	Site of Action
Rotenone	$e^-$ transport inhibitor	Complex I
Amytal	$e^-$ transport inhibitor	Complex I
Antimycin A	$e^-$ transport inhibitor	Complex III
Cyanide	$e^-$ transport inhibitor	Complex IV
Carbon Monoxide	$e^-$ transport inhibitor	Complex IV
Azide	$e^-$ transport inhibitor	Complex IV
2,4,-dinitrophenol	Uncoupling agent	transmembrane $H^+$ carrier
Pentachlorophenol	Uncoupling agent	transmembrane $H^+$ carrier
Oligomycin	Inhibits <b>ATP synthase</b>	OSCP fraction of <b>ATP synthase</b>

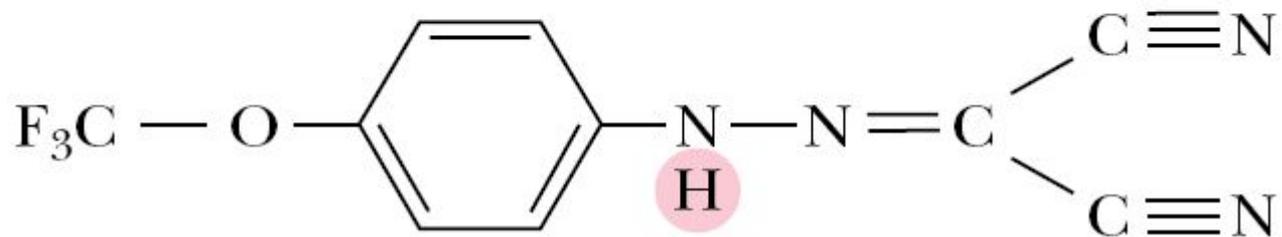
# The Structures of Several Inhibitors of ETC and OP



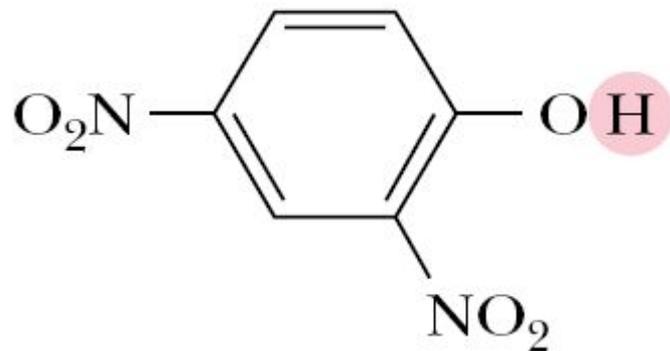
# Участки связывания ингибиторов ДЦ и ОФ



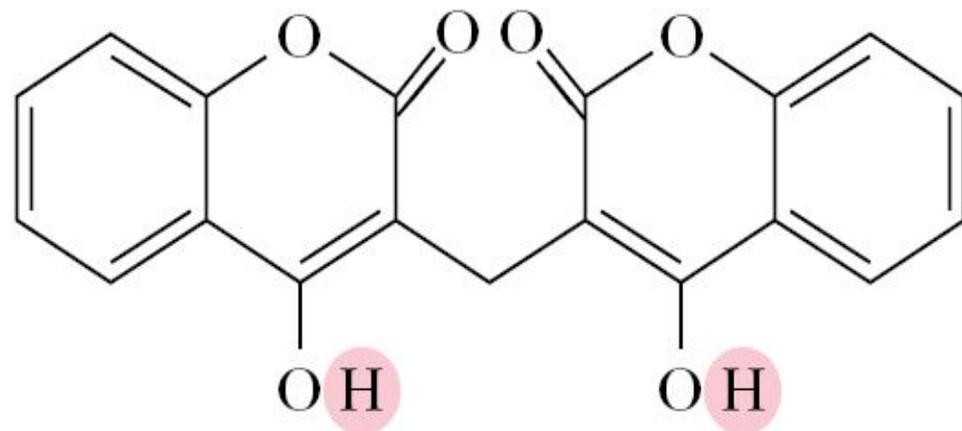
**S** Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone  
—best known as **FCCP**; for **F**luoro **C**arbonyl  
**C**yanide **P**henylhydrazone



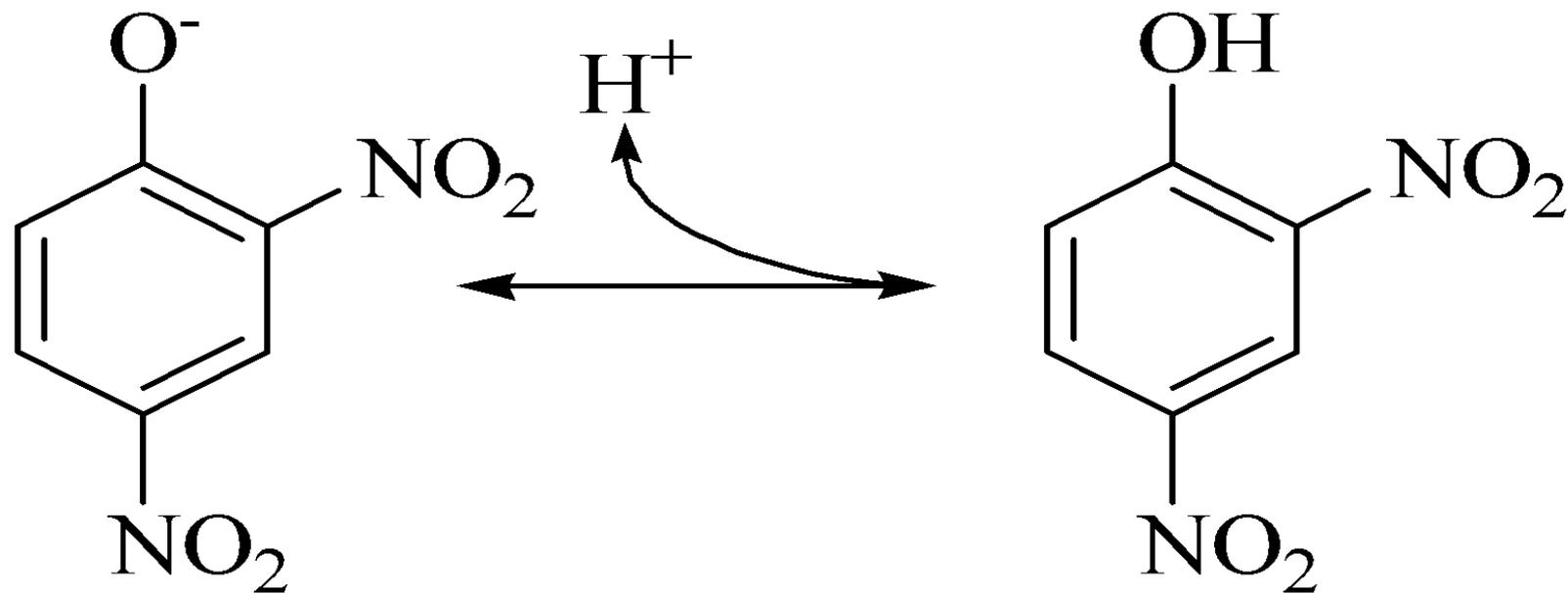
**Dinitrophenol**



**Dicumarol**



# Действие разобщителей ОФ



- 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ), как слабая кислота связывает протон в межмембранном пространстве и переносит его в матрикс Мх (рассеивая энергию  $\Delta\mu H^+$ )



# Эндогенные разобщители генерируют тепло

- Некоторые животные в процессе адаптации к холоду, анабиоза, а также новорожденные животные содержат **БЖТ** и производят большое кол-во тепла за счет разобщения ОФ
- **БЖТ** этих организмов содержат много Мх, во внутренней мембране которых мало **АТФ-синтазы**, но присутствует белок **термогенин** или белок-разобщитель, образующий пассивные протонный канал, рассеивающий энергию  $\Delta\mu H^+$  в виде тепла

# Разобщающие белки

## *Uncoupling Proteins (UCP 1-5)*

- В различных тканях человека и животных выделено **5** видов *UCP 1-5*, уровень экспрессии и функция которых различна:
- Разобщение ОФ (регуляция продукции АТФ)
- Генерация тепла (адаптация к холоду)
- Предотвращение образования АФК
- Предотвращение апоптоза и др.

# Нарушения митохондриального ОФ

- Согласно концепции ***D. Wallace*** (1998-2008) любой ткани необходим минимально допустимый (пороговый) уровень производства АТФ
- Снижение этого уровня ведет к нарушению энергозависимых функций
- Наиболее энергозависимые ткани (нервная, сетчатка, миокард, скелетная м-ра, железистая )
- Резкий дефицит АТФ в организме «дает» симптоматику поражения именно этих тканей

# Митохондриальные болезни

## (Митохондриальная медицина)

- Мх содержат кольцевую ДНК (mtDNA)
- **13** белков ДЦ из **1000** белков Мх кодируются в mtDNA., другие - в ядерной
- Описаны некоторые заболевания и синдромы, связанные с повреждением mtDNA

# Некоторые Мх заболевания

- Названия Мх заболеваний образуются путем аббревиатур (сокращений). Клинически протекают в виде комплекса синдромов поражения энергозависимых тканей
  - **LHON**, *Lebers hereditary optical neuropathy*;
  - **MERRF**, *myoclonic epilepsy and ragged-red-fiber disease*;
  - **MELAS**, *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes*;
  - **NARP**, *neurological muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa*;
  - **Leigh disease** — **SNE**, *subacute necrotizing encephalomyelopathy*;
  - **KSS**, *Kearns–Sayre syndrome*;
  - **CPEO**, *chronic progressive external ophthalmoplegia*.

# Клинические проявления и лечение Мх заболеваний

- **Манифестация**

- Мышечные судороги и слабость
- Утомляемость,
- Лактат-ацидоз,
- Нарушение функций ЦНС,
- Нарушение зрения.

- **Лечение**

- *Очень трудное и часто мало эффективное*
- *Облегчает состояние назначение КоQ, менадиона, витаминов B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP, C, K, N-ацетил карнитина, сукцината и глутамата*

# LHON

- LHON is a hereditary disease that often leads to sudden blindness from death of the optic nerve especially among males.
  - Any one of several point mutations in
    - subunits ND1, 2, 4, 5, and 6 of NADH dehydrogenase (complex I),
    - cytochrome *b* of complex II, or
    - subunit I of cytochrome oxidase
  - may cause this syndrome.
    - Most frequent is an R340H mutation of the ND4 gene at position 11,778 of mtDNA. It may interfere with reduction of ubiquinone.
    - Mutations in the ND1 gene at position 3460 and in the ND6 gene at position 14484 or in the cytochrome *b* gene at position 15257 cause the same disease.

# MERRF, MELAS et al.

- The most frequent (80 – 90%) cause of MERRF, which is characterized by epilepsy and by the appearance of ragged red fibers in stained sections of muscle, is an A → G substitution at position 8344 of mtDNA in the T $\psi$ C loop of mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup>.
- A similar disease, MELAS, is accompanied by strokes (not seen in MERRF) and is caused in 80% of cases by an A → G substitution in the dihydrouridine loop of mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>.
- CPEO, Leigh disease, and KSS often result from large deletions of mtDNA.
- NARP and related conditions have been associated with an L156R substitution in the ATPase 6 gene of ATP synthase.

# Can Mitochondrial Diseases be Treated?

- Attempts are being made to improve the function of impaired mitochondria by adding large amounts of ubiquinone, vitamin K, thiamin, riboflavin, and succinate to the diet.
  - One report suggests that mitochondrial decay during aging can be reversed by administration of *N*-acetylcarnitine.

# Микросомальное окисление

- Микросомы (МС) - (микротельца) искусственные везикулы, образованные из обрывков ЭПС в процессе гомогенизации ткани.
- В мембранах МС расположены микросомальные ДЦ, основные функции которых:
  - Синтез БАВ (гормоны, медиаторы, P<sub>g</sub>, LT, ТХА)
  - Детоксикация ксенобиотиков

Цитохром P<sub>450</sub> монооксигеназы  
важная система детоксикации многих лекарств и  
гидроксилирования стероидов

- Цитохром P<sub>450</sub> - суперсемейство гем-содержащих монооксигеназ, известно > 1000 ферментов

- NADH и NADPH поставляют восстановительные эквиваленты для восстановления цитохромов, которые обратимо окисляют субстраты в реакциях именуемых *гидроксилазным циклом*

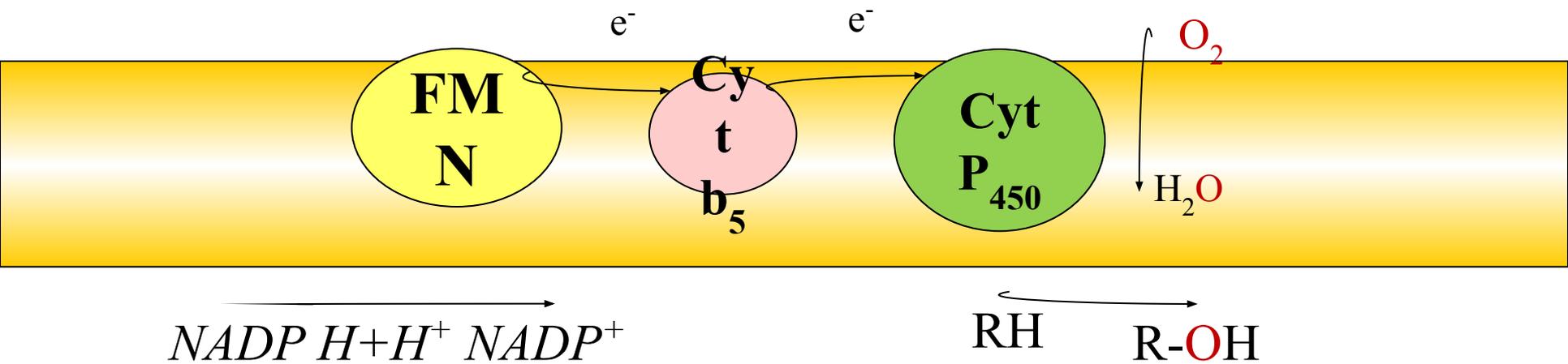
# Cytochrome *b5*

- In liver microsomes, cytochromes P<sub>450</sub> are found together with **cytochrome *b5*** and have an important role in detoxification.
  - Benzpyrene, aminopyrine, aniline, morphine, and benzphetamine are hydroxylated, increasing their solubility and aiding their excretion.
  - Many drugs such as phenobarbital have the ability to induce the formation of microsomal enzymes and of cytochromes P450.

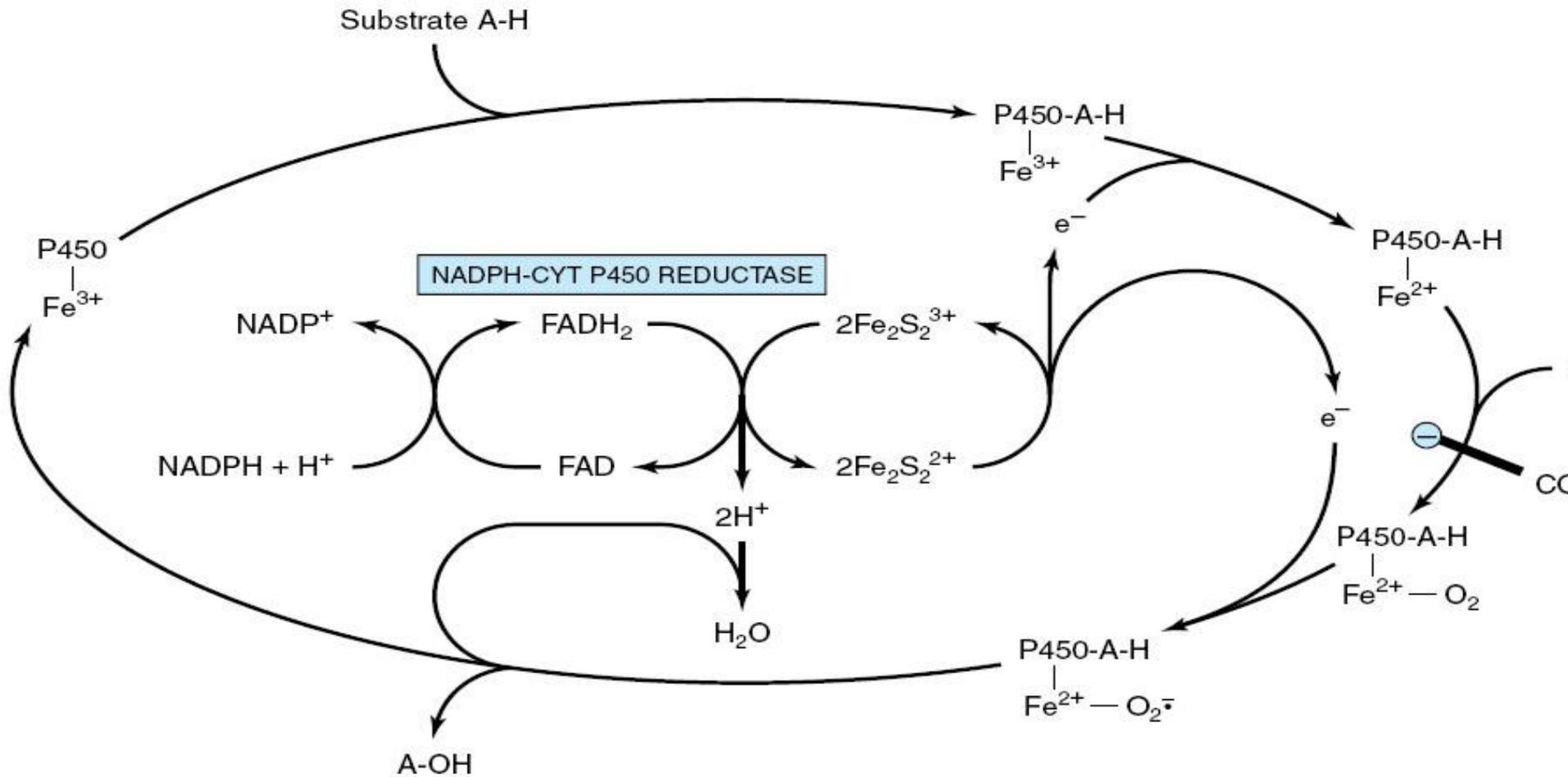
# Monooxygenase System (Microsomal Oxidation)

- The substrate can be oxidized by incorporation of one atom of  $O_2$ .
- The enzymes are **monooxygenases** or **cytochrome  $P_{450}$**  - also **mixed function oxidase**.
- The enzymes are associated with the smooth endoplasmic reticulum, prepared as *microsomes*.
- $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R-OH + H_2O + NADP^+$

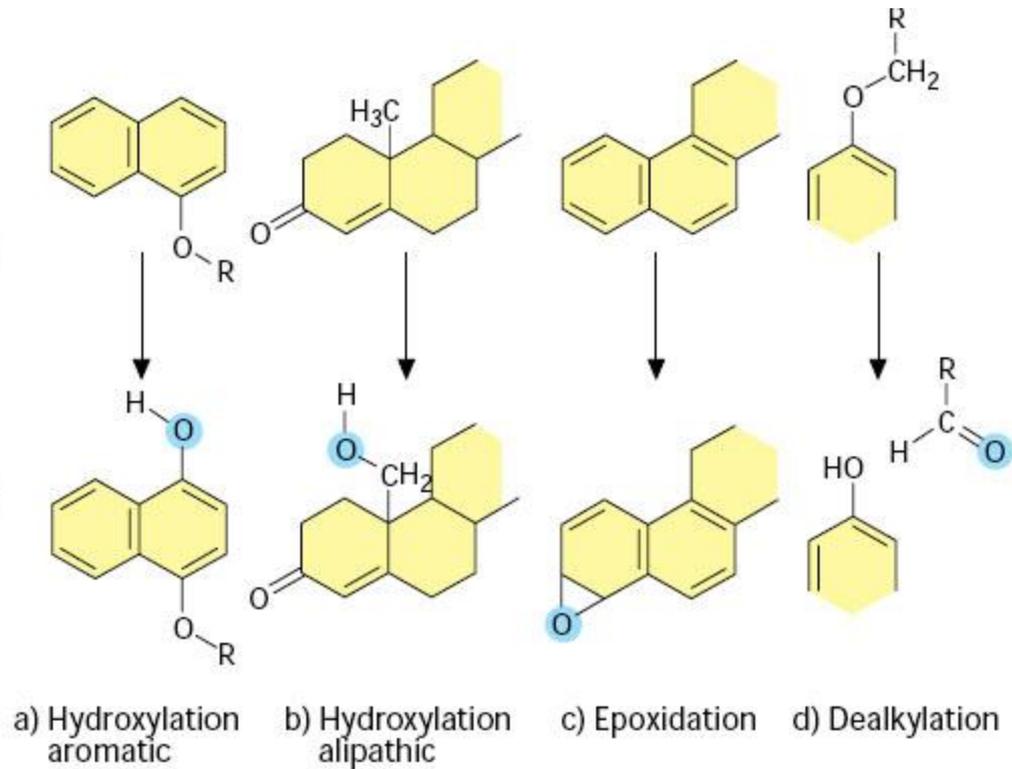
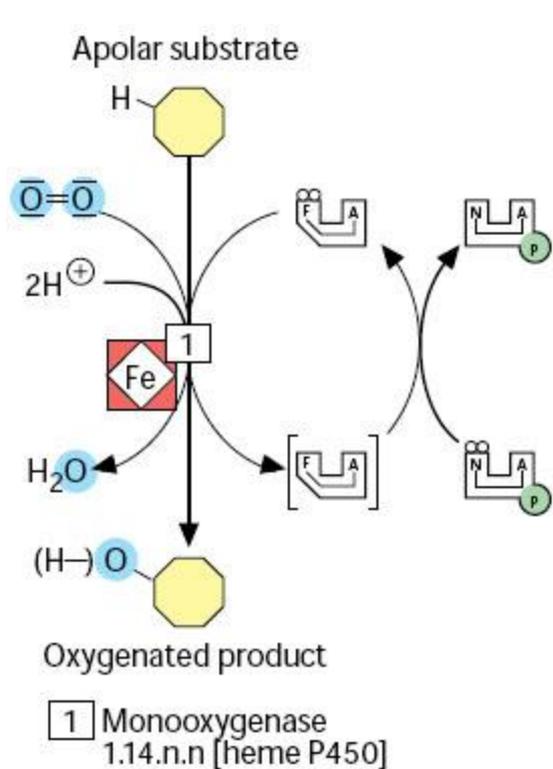
# Функционирование микросомальной ДЦ



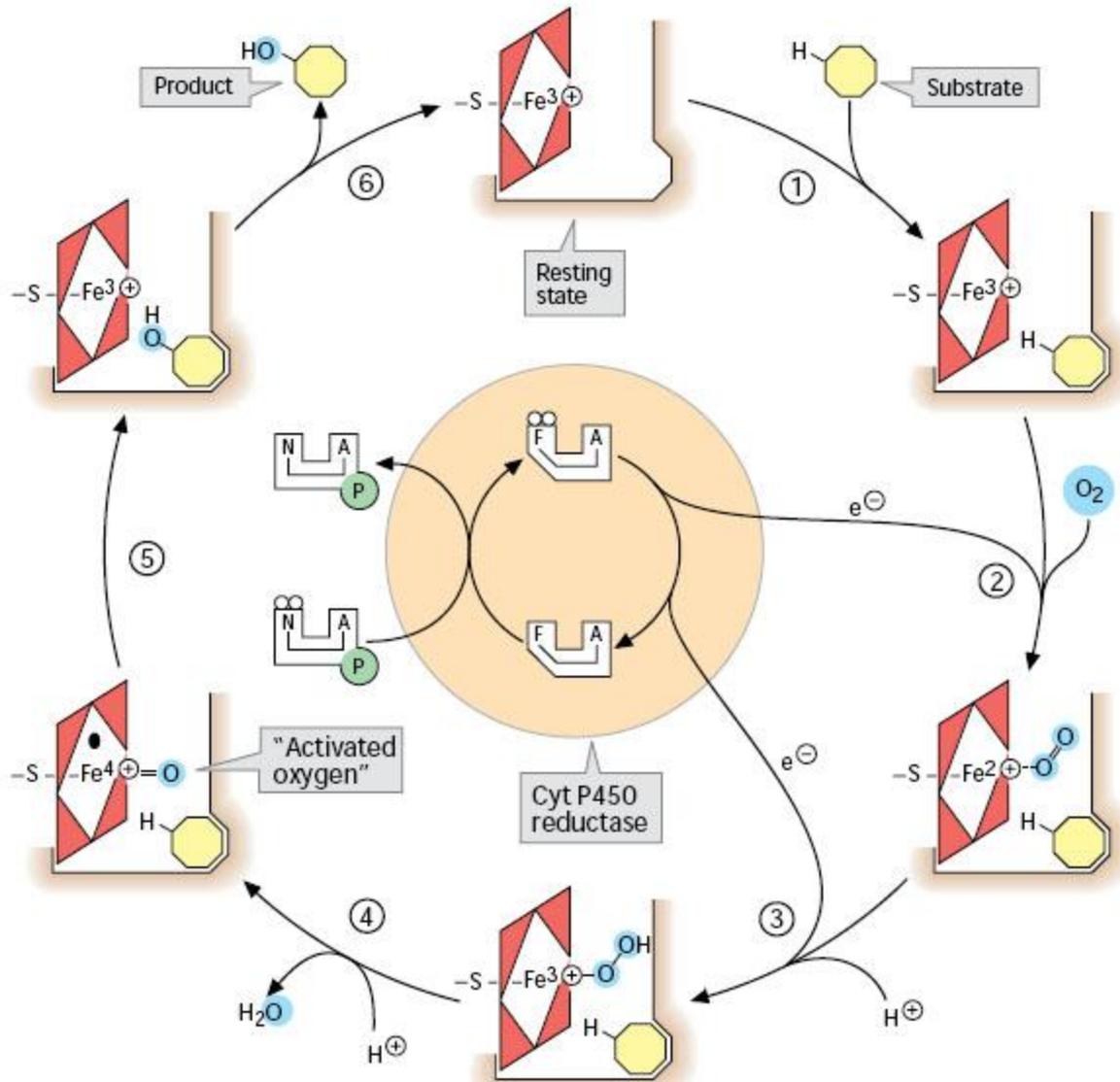
# Роль цитохрома P<sub>450</sub> в микросомальном окислении



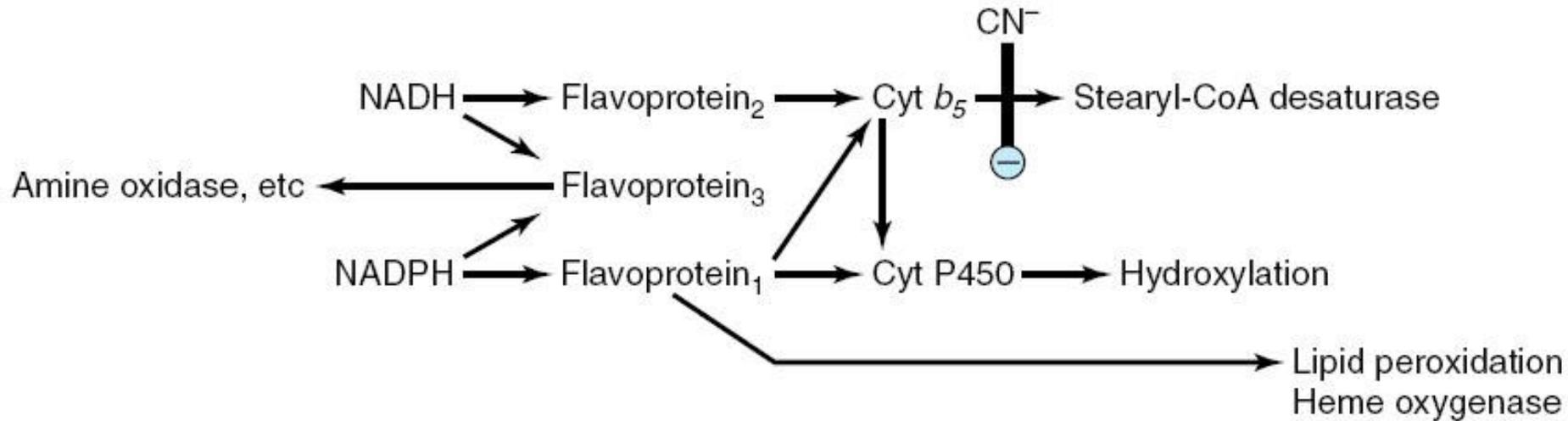
# Механизм микросомального окисления



# Цикл цитохрома P<sub>450</sub>



# Варианты строения микросомальной ДЦ

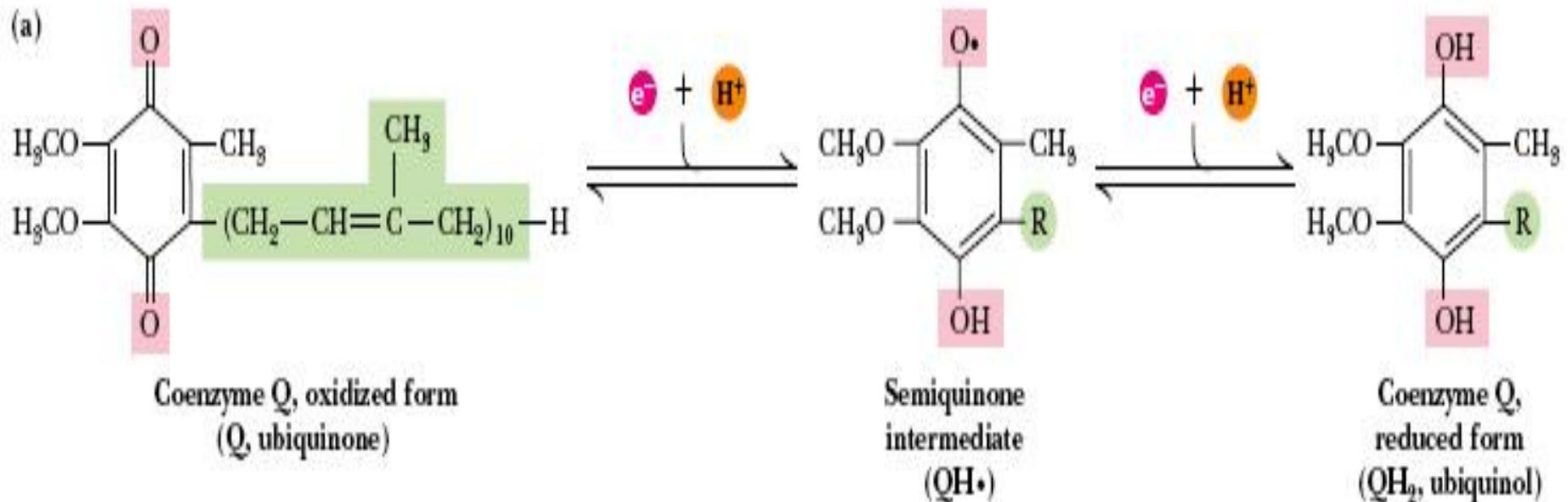


# Перекисные реакции

- Любые кислород-зависимые процессы сопровождаются образованием АФК
- В норме при Мх окислении до **5%** O<sub>2</sub> превращается в АФК, при нарушении функций МХ их продукция резко возрастает
- Микросомальное окисление сопровождается образованием АФК (одно e<sup>-</sup> восстановление O<sub>2</sub>)

# Мх - продуцент АФК

- Источником АФК при Мх дисфункции является **семихинон КоQ**



# Механизм образования АФК



- Источником  $e^-$  является  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ , ионизирующее излучение (радиолиз воды), стимуляция МС окисления



- АФК атакуют любые молекулы иницируя цепные реакции, повреждая мембраны, белки, ДНК, вызывая т.о. повреждение и гибель клеток, мутации, канцерогенез и

# → Антиоксидантная защита (АОЗ)

- **Неферментативная** – АО вещества образующие менее активные радикалы и «гасят» цепные реакции (*вит А,Е,С, GSH, гис, адреналин, КС, мочевины, билирубин, природные полифенолы, красители, флавоноиды и др.*)
- **Ферментативная** представлена ферментами (СОД, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза и др.)

