

комплекс определяется как минимальная единица ЦПЭ, сохраняющая способность переносить электрон со скоростью, сравнимой с этой скоростью в интактных митохондриях.

Изучение биологического окисления встречается с необходимостью решения ряда физических проблем, относящихся к различным уровням организации и функционирования системы.

Структура и функции молекулярных переносчиков электронов изучены еще недостаточно. В § 6.7 рассмотрены современные данные, относящиеся к строению и свойствам цитохрома *c*. Цитохром *c* исследовался очень детально, но его динамические свойства нельзя считать полностью установленными и объясненными.

Строение и функциональная организация митохондрий явились предметом интенсивного изучения. Тем не менее, многие важнейшие вопросы, сюда относящиеся, пока не имеют ответа. Специфическая мембранная структура митохондрий, присутствие в них автономной программы синтеза белков (ДНК), механохимическая активность митохондрий непосредственно связаны с их ролью «силовых станций» клетки. Дальнейшее развитие физики митохондрий требует целостного подхода.

Общая теория электронного транспорта в локализованной системе биологического окисления интенсивно развивается. Предложены содержательные кинетические модели, начаты теоретические исследования, основанные на рассмотрении электронно-конформационных взаимодействий. Эти проблемы представляют первостепенный интерес для биофизики.

Необходимо установить молекулярную природу биологического окисления, осуществляемого в результате сопряжения ферментативных, транспортных и механохимических процессов. Митохондрия есть место интегрирования широкой совокупности молекулярно-биологических явлений, целостная система, требующая всестороннего изучения — теоретической и экспериментальной разборки и сборки «черного ящика».

## § 6.2. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии фигурируют во всех аэробных клетках животных и растений, за исключением некоторых примитивных бактерий, где функции митохондрий выполняет плазматическая мембрана.

Число этих органоидов в клетке различно — от 20—24 в сперматозоидах до 500 000 в клетке гигантской амёбы *Chaos chaos*. В клетке *Escherichia coli* имеется лишь одна митохондрия. Число митохондрий характерно для клеток данного типа данного вида: по-видимому, при митозе происходит деление митохондрий и их правильное расхождение в дочерние клетки. Форма, структура

и размеры митохондрий также варьируют, но митохондрии всегда обладают развитой системой внутренних мембран, именуемых *кристами*. На рис. 6.7 [16] схематически изображена структура митохондрии из печени крысы. Длина такой митохондрии примерно 3 мкм, ширина 0,5—1 мкм, и поэтому она хорошо видна в оптическом микроскопе. Средний сухой вес митохондрии  $10^{-13}$  г. Общая площадь поверхности всех крист составляет 16 мкм<sup>2</sup>, внешней мембраны — 13 мкм<sup>2</sup>. В клетке печени содержится примерно 1000 митохондрий и, значит, полная поверхность митохондриальных мембран составляет около 29 000 мкм<sup>2</sup>,

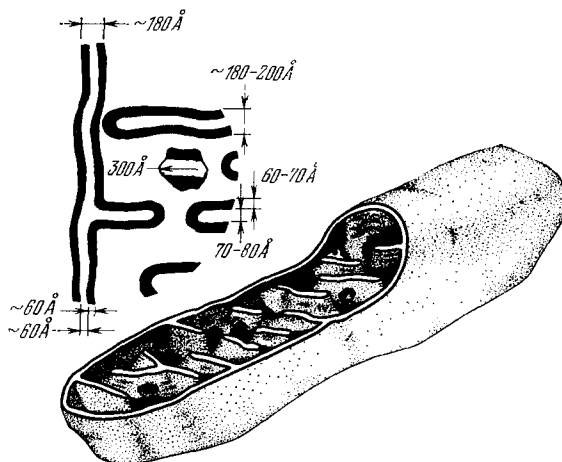


Рис. 6.7. Схематическое изображение митохондрии.

что в десятки раз превышает площадь мембраны самой клетки [16]. Внутренность митохондрии, не занятая кристами, заполнена матриксом. Митохондрии содержат так называемые *плотные гранулы*, по-видимому, возникшие в результате аккумуляции различных ионов, в частности  $\text{Ca}^{++}$ .

В митохондриях обнаружено наличие ДНК и в них происходит ДНК-зависимый синтез РНК. Более того, в митохондриях представлена вся система биосинтеза белка — в них содержатся тРНК, аминоксил — РНК-синтегазы и рибосомы (см. [17—19]).

Мембраны митохондрий тоньше большинства клеточных мембран — их толщина порядка 50 Å. Методом электронной микроскопии было установлено, что внутренние мембраны и кристы покрыты сферическими или полиэдрическими частицами диаметром 80—100 Å, прикрепленными к мембранам ножками, имеющими размеры  $20\text{—}40 \times 40\text{—}50$  Å. Эти структурные элементы весьма многочисленны: их число в одной митохондрии достигает

$10^4$ — $10^5$ , и они занимают 10—15% ее объема. В некоторых случаях удалось наблюдать еще один элемент — *подставку*, к которой прикреплена ножка размером  $40$ — $50 \times 115 \times 115 \text{ \AA}^3$ . Головка, ножка и подставка образуют так называемую элементарную частицу митохондрии [20—22]. На рис. 6.8 показано электронно-микроскопическое изображение крист в митохондрии из сердца быка, на котором видны эти элементарные частицы [21]. Не исключено, однако, что элементарные частицы являются артефактом, возникающим при негативном контрастировании.

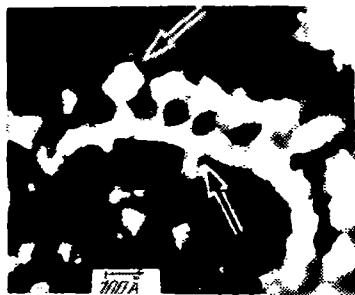


Рис. 6.8. Контрастированное изображение крист.

Верхняя стрелка указывает головку, нижняя — подставку элементарной частицы.

Возможно, что их нет в необработанных митохондриях. Все же трудно считать случайностью, что они появляются при подготовке препарата именно лишь на внутренних мембранах и кристах.

Митохондрия содержит 50—60 ферментов, катализирующих реакции электронного транспорта, окислительного фосфорилирования, окисления жирных кислот, цикла Кребса и другие. Кроме того, примерно 40% всего митохондриального белка — это структурный белок, предположительно индивидуальный, сходный с белком миелина и бактериальных мембран [23].

Липиды составляют от 15 до 50% сухого веса митохондрий. 90% липидов — фосфолипиды.

О локализации окислительных ферментов в митохондриях можно до некоторой степени судить по результатам обработки митохондрий детергентами или ультразвуком. Цитохромы и флавопротеиды дыхательной цепи обнаруживаются в нерастворимых частицах, по-видимому, принадлежавших мембранам. Напротив, ферменты цикла Кребса (дегидрогеназы и др.) содержатся в растворимой части. Отсюда можно заключить, что они локализованы вблизи крист или на них, но легко отделяются. Эти факты свидетельствуют об определенной пространственной организации окислительно-восстановительной системы. В работе Чанса и Уильямса [14] установлено наличие простых стехиометрических соотношений в содержании флавопротеидов и цитохромов в митохондриях. Также постоянны молярные соотношения различных цитохромов [24], НАД и цитохромов [25] и т. д.

Кристы образованы впячиванием внутренних мембран. Число и поверхность крист непосредственно связаны с интенсивностью

клеточного дыхания. Их формы широко варьируют для разных клеток. Митохондрии летательных мышц насекомых содержат развитую поверхность плотно упакованных крист; интенсивность дыхания этих клеток раз в 20 выше, чем клеток печени, митохондрии которых содержат относительно мало крист. У митохондрии клетки печени площадь поверхности внешней мембраны составляет около  $13 \text{ мкм}^2$ , площадь внутренней — в три раза больше. В такой митохондрии имеется примерно 17 000 дыхательных ансамблей, как это следует из содержания цитохромов. На каждый квадратный микрон поверхности внутренней мембраны приходится 650 ансамблей, каждый ансамбль занимает площадь  $400 \times 400 \text{ \AA}^2$  [16].

В работах Грина (см. [15, 26]) элементарные митохондриальные частицы рассматриваются как реальные структуры, в которых локализованы основные процессы электронного транспорта и окислительного фосфорилирования. Предполагается раздельная пространственная локализация этих процессов — электроны и протоны разделены в комплексах переноса электронов и разделены белки, участвующие в переносе электронов и протонов. Представление о разделении электронов и протонов является одним из основных в электромеханохимической модели митохондриальной структуры и функции, развиваемой Грином и Джи [26, 27] (см. стр. 315).

Фазово-контрастная микроскопия показывает, что митохондрии живых клеток испытывают изменения размеров и формы, связанные с дыханием [4, 16, 28]. Осуществляются циклы набухания и сокращения двух типов. Обратимый цикл малой амплитуды, в котором объем меняется не более чем на 1—2%, наблюдается у всех типов митохондрий *in vitro*. Набухание, сопровождаемое понижением оптической плотности, наступает в отсутствие АДФ в состоянии покоя митохондрий. При добавлении АДФ происходит сокращение и окислительное фосфорилирование АДФ. Цикл блокируется разбавителями окислительного фосфорилирования [29].

В цикле большой амплитуды объем митохондрии может меняться в несколько раз. Это наблюдается как *in vitro*, так и *in vivo*. Такие циклы различаются у митохондрий из разных клеток. Сокращение митохондрий вызывается добавлением АТФ. Процесс непосредственно связан с дыханием — с окислительным фосфорилированием. Имеется прямой параллелизм в ингибировании сокращения и окислительного фосфорилирования олигомицином. Изменения оптической плотности в циклах набухания — сокращения митохондрий показаны на рис. 6.9 [16].

Высокоамплитудные механохимические процессы в митохондриях определяются свойствами мембран. Мембраны, освобож-

денные от белка матрикса, «митохондриальные духи», способны сокращаться в присутствии АТФ.

Эти механохимические процессы сводятся к превращению химической энергии в механическую работу. Ленинджер подчеркивает далеко идущее сходство АТФ-азной активности митохондриальных мембран и актомиозиновой сократительной системы скелетных мышц [16]. Сходны их механохимические свойства, прежде всего сокращение под действием АТФ. В обоих случаях для сокращения необходимы двухвалентные катионы, обе системы являются мультикомпонентными. Можно указать еще ряд

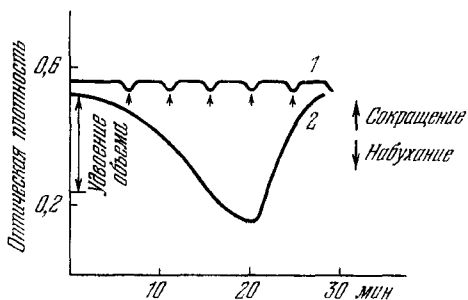


Рис. 6.9. Изменения оптической плотности при  $\lambda$  5200 Å в циклах набухания — сокращение митохондрий.

1 — цикл малой амплитуды, 2 — цикл большой амплитуды.

черт сходства. Исходя из этого, Ленинджер постулировал присутствие сократительных белков, подобных актомиозину, в мембранах митохондрий [30]. Гипотеза Ленинджера была подтверждена Ониши, действительно выделившим из митохондрий белок такого типа [31]. Показано, что сократительный белок участвует в митохондриальной механохимии, но оказалось, что здесь играет существенную роль и липид мембран — фосфатидил-

инозитол [32]. Имеются и другие факторы, участвующие в сокращении, в частности, ферментативные.

В работах школы Ленинджера было показано непосредственное участие транспорта катионов в функционировании мембран митохондрий [16]. Накопление больших количеств  $\text{Ca}^{++}$ , поступающего из окружающей среды, происходит при дыхании и блокируется его ингибиторами и разобщителями окислительного фосфорилирования. Количество поступающего  $\text{Ca}^{++}$  связано с количеством поглощаемого кислорода, фосфат также аккумулируется параллельно накоплению  $\text{Ca}^{++}$  в отношении  $\text{Ca} : \Phi_n = 5 : 3$  (соответствующем оксиапатиту). Электронная микроскопия показывает, что в митохондриях могут накапливаться гранулы фосфата кальция.

Установлено, что имеется прямое и точное соотношение между аккумулированными количествами фосфата и кальция и числом электронов, проходящих по дыхательной цепи [33]. При перемещении каждой пары электронов через каждый из трех центров накопления энергии в цепи аккумулируется 1,67 моле-

кулы  $\text{Ca}^{++}$  и 1,0 молекула фосфата. Этот процесс альтернативен окислительному фосфорилированию, что показано схематически на рис. 6.10 [16]. Тем самым  $\text{Ca}^{++}$  препятствует окислительному фосфорилированию, действует как его разобщитель.

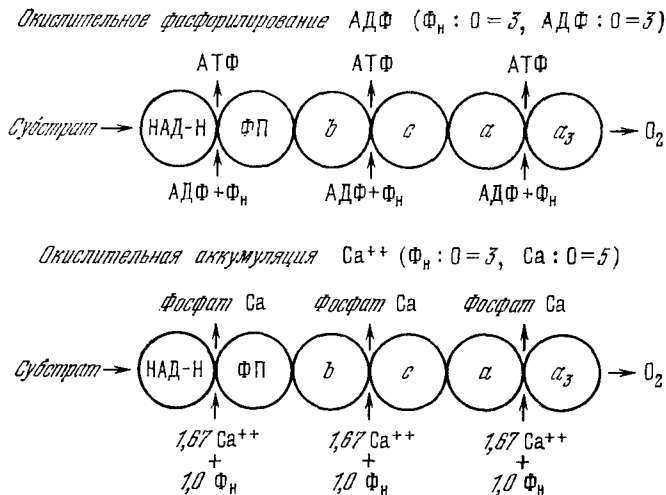


Рис. 6.10. Схемы альтернативных окислительных процессов — фосфорилирования и аккумуляции  $\text{Ca}^{++}$ .

Малые количества  $\text{Ca}^{++}$ , напротив, стимулируют дыхательный процесс. Транспорт  $\text{Ca}^{++}$  связан с транспортом катионов  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ .

### § 6.3. ТЕРМОДИНАМИКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Как уже сказано, окислительное фосфорилирование сопряжено с ионным транспортом в митохондриальных мембранах. И субстраты, и продукты окисления и фосфорилирования являются ионами, и, очевидно, их транспорт должен влиять на скорость соответствующих процессов. Вместе с тем окислительное фосфорилирование, как таковое, есть система сопряженных процессов, а не отдельная химическая реакция. Максимально упрощенная схема сопряжения фосфорилирования с окислением показана на рис. 6.11 [34].

Предложен ряд гипотез о механизме сопряжения в окислительном фосфорилировании. Согласно Слэйтеру в результате окисления возникают обладающие избытком энергии промежуточные вещества, участвующие в фосфорилировании [35]. Это —