

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.

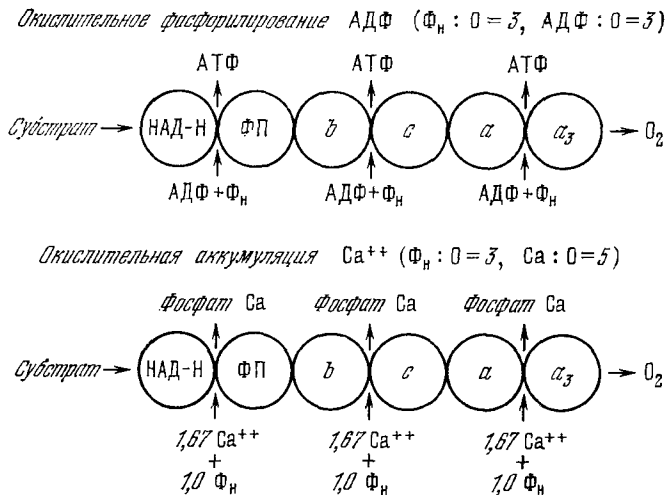


Рис. 6.10. Схемы альтернативных окислительных процессов — фосфорилирования и аккумуляции  $\text{Ca}^{++}$ .

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 —

химическая гипотеза. Она включает сопряжение с ионным транспортом, если принять, что промежуточное вещество определяет работу ионного насоса [36, 37]. С другой стороны, высказано предположение, что катионный насос неспецифичен и специфичность возникает благодаря различным барьерам проницаемости [38]. Химической гипотезе противостоит *хемиосмотическая теория* Митчелла, подробно рассматриваемая в следующем параграфе. Согласно основной идее Митчелла, система окислительно-восстановительных ферментов расположена во внутренней мембране митохондрий таким образом, что перенос электронов от водорода к кислороду сопровождается переносом заряда сквозь мембрану. В результате на мембране возникает разность потенциалов и (или) градиент рН.

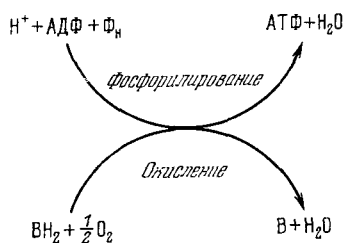


Рис. 6.11. Общая схема сопряжения окисления и фосфорилирования.

$vH_2$  — окисляемый субстрат.

соединения. Исследования разобщения посредством различных веществ дают некоторые возможности для выбора модели (см. § 6.5).

Общее термодинамическое описание процессов сопряжения не зависит от конкретной модели. При сопряжении двух линейных процессов (см. стр. 53)

$$\left. \begin{aligned} J_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2, \\ J_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2 \end{aligned} \right\} \quad (6.3)$$

степень сопряжения дается выражением

$$q = \frac{L_{12}}{\sqrt{L_{11}L_{22}}}, \quad (6.4)$$

причем в линейной области справедливо условие Онзагера  $L_{12} = L_{21}$ . В отсутствие сопряжения  $q = 0$ , при полном сопряжении  $q = 1$ . При полном сопряжении окисления и фосфорилирования между изменениями свободной энергии должно реализоваться соотношение

$$-\Delta G_o = v \Delta G_{\Phi},$$

где  $v$  — стехиометрическое соотношение. При неполном сопряжении вместо равенства имеет место неравенство и

$$|v \Delta G_{\Phi} / \Delta G_o| < 1.$$

При промежуточных значениях  $q$  отношение скоростей двух процессов является функцией отношения действующих сил. Для окислительного фосфорилирования ( $\mathcal{A}$  — сродство)

$$\left. \begin{aligned} J_o &= L_{11} \frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{12} \frac{\mathcal{A}_\phi}{T}, \\ J_\phi &= L_{12} \frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{22} \frac{\mathcal{A}_\phi}{T}, \end{aligned} \right\} \quad (6.5)$$

и отношение  $J_\phi/J_o$  есть отношение  $\Phi_n/O$ . Имеем

$$\frac{\Phi_n}{O} = \frac{J_\phi}{J_o} = \frac{q + lx}{l^{-1} + qx},$$

где  $x = \mathcal{A}_\phi/\mathcal{A}_o$ ,  $q$  определяется соотношением (6.4), а  $l = \sqrt{L_{22}/L_{11}}$ . При  $q = 1$  имеем  $\Phi_n/O = l = 3$ , независимо от отношения  $\mathcal{A}_\phi/\mathcal{A}_o$ , при  $q = 0$  имеем  $\Phi_n/O = l^2x = 9\mathcal{A}_\phi/\mathcal{A}_o$ , при  $0 < q < 1$ , т. е. при неполном сопряжении, отношение  $\Phi_n/O$  нелинейно зависит от  $x$ .

Учитывая перенос протонов, напомним функцию диссипации (умноженную на  $T$ ) в виде

$$\sigma T = J_\phi \mathcal{A}_\phi + J_n \Delta \tilde{\mu}_n + J_o \mathcal{A}_o, \quad (6.6)$$

где  $\Delta \tilde{\mu}_n$  есть разность электрохимических потенциалов ионов водорода на входе и выходе из мембраны, т. е.

$$\begin{aligned} \Delta \tilde{\mu}_n &= \tilde{\mu}_n^{\text{вход}} - \tilde{\mu}_n^{\text{вых}} = RT \ln [H^+]^{\text{вых}}/[H^+]^{\text{вход}} + \mathcal{F} \Delta \psi = \\ &= -2,3RT \Delta pH + \mathcal{F} \Delta \psi, \end{aligned} \quad (6.7)$$

где  $\mathcal{F}$  — число Фарадея,  $\Delta \psi$  — разность потенциалов (см. стр. 107).

Рассмотрим стационарное состояние с нефиксированными градиентами электрохимических потенциалов для ионов  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  и т. д. Соответственно потоки этих ионов равны нулю.

Функция диссипации (см. (6.6)) не определена в том смысле, что не указано, о каких значениях сродства  $\mathcal{A}$  идет речь — о внешних или внутримембранных. Согласно [34], можно провести соответствующее уточнение. Рассмотрим митохондриальное окисление. Функцию диссипации для мембраны, находящейся в стационарном состоянии, можно написать в виде

$$\sigma T = - \sum_j (\dot{n}_j \tilde{\mu}_j + \dot{n}_j^e \tilde{\mu}_j^e). \quad (6.8)$$

Здесь  $\tilde{\mu}_j$  и  $n_j$  — электрохимические потенциалы и числа молей для субстрата, продукта,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ , АТФ, АДФ,  $\Phi_n$ ,  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ . Индексы  $i$  и  $e$  — внутри и вне мембраны. Для

совокупности метаболических реакций имеем

$$\sum_r \nu_{jr} J_r = \sum_r (\dot{n}_{jr}^i + \dot{n}_{jr}^e) = \dot{n}_j^i + \dot{n}_j^e, \quad (6.9)$$

где  $J_r$  — поток для  $r$ -й реакции,  $\nu_{jr}$  — стехиометрические коэффициенты. Подставляя (6.9) в (6.8) и исключая  $\dot{n}_j^e$ , получаем

$$\sigma T = - \sum_j (\dot{n}_j^i \Delta \bar{\mu}_j + \sum_r \nu_{jr} J_r \bar{\mu}_j^e). \quad (6.10)$$

И во внешней, и во внутренней областях для сродства  $\mathcal{A}$  имеем

$$\mathcal{A}_r = - \sum_j \nu_{jr} \bar{\mu}_j.$$

Следовательно,

$$\sigma T = - \sum_j \dot{n}_j^i \Delta \bar{\mu}_j + \sum_r J_r \mathcal{A}_r^e. \quad (6.11)$$

Если внутри мембраны реализовано стационарное состояние для всех компонентов, то  $\dot{n}_j^i = 0$  и

$$\sigma T = \sum_r J_r \mathcal{A}_r^e = J_\phi \mathcal{A}_\phi^e + J_o \mathcal{A}_o^e. \quad (6.12)$$

Таким образом, в стационарном состоянии достаточны измерения, проводимые только во внешнем растворе. Величины  $\mathcal{A}_\phi^e$  и  $\mathcal{A}_o^e$  фиксированы, соответственно  $J_\phi$  и  $J_o$  отличны от нуля. Напротив,  $J_H = 0$ . Если в стационарном состоянии отличны от нуля  $\Delta \bar{\mu}_H$  и  $J_H$ , то

$$\sigma T = J_\phi \mathcal{A}_\phi^e + J_H \Delta \bar{\mu}_H + J_o \mathcal{A}_o^e. \quad (6.13)$$

Соответствующие феноменологические уравнения имеют вид

$$\left. \begin{aligned} J_\phi &= L_\phi \mathcal{A}_\phi^e + L_{\phi H} \Delta \bar{\mu}_H + L_{\phi o} \mathcal{A}_o^e, \\ J_H &= L_{\phi H} \mathcal{A}_\phi^e + L_H \Delta \bar{\mu}_H + L_{oH} \mathcal{A}_o^e, \\ J_o &= L_{\phi o} \mathcal{A}_\phi^e + L_{oH} \Delta \bar{\mu}_H + L_o \mathcal{A}_o^e. \end{aligned} \right\} \quad (6.14)$$

Здесь предполагается сопряжение химических реакций окисления и фосфорилирования с векторным потоком протонов — отличие от нуля коэффициентов  $L_{\phi H}$  и  $L_{oH}$ . Прямое сопряжение может осуществляться лишь вследствие анизотропии мембраны. Косвенное сопряжение реализуется в условиях стационарности (см. стр. 68 и 72). Расчет коэффициентов  $L$  требует конкретной модели.

Обратные феноменологические уравнения имеют вид

$$\left. \begin{aligned} \mathcal{A}_\phi^e &= R_\phi J_\phi + R_{\phi H} J_H + R_{\phi O} J_o, \\ \Delta \ddot{\mu}_H &= R_{\phi H} J_\phi + R_H J_H + R_{oH} J_o, \\ \mathcal{A}_o^e &= R_{\phi o} J_\phi + R_{oH} J_H + R_o J_o. \end{aligned} \right\} \quad (6.15)$$

Если  $J_H = 0$ , то степень сопряжения равна

$$q = -R_{\phi o} / \sqrt{R_\phi R_o} = q_{\phi o}.$$

Если  $\Delta \ddot{\mu}_H = 0$ , получаем

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_\phi^e &= R_\phi (1 - q_{\phi H}^2) J_\phi - \sqrt{R_\phi R_o} (q_{\phi o} + q_{\phi H} q_{oH}) J_o, \\ \mathcal{A}_o^e &= -\sqrt{R_\phi R_o} (q_{\phi o} + q_{\phi H} q_{oH}) J_\phi + R_o (1 - q_{oH}^2) J_o \end{aligned}$$

и

$$q = \frac{q_{\phi o} + q_{\phi H} q_{oH}}{\sqrt{(1 - q_{\phi H}^2)(1 - q_{oH}^2)}},$$

где

$$q_{ij} = -R_{ij} / \sqrt{R_{ii} R_{jj}}.$$

Степень сопряжения можно оценить экспериментально. При ограниченном поступлении АДФ происходит окисление без фосфорилирования [14], следовательно,  $\Phi_{ii}/O = 0$ . При добавлении АДФ возникает стационарное фосфорилирование. Количественное исследование дыхания состоит в том, что в митохондриальную систему *in vitro* добавляют известное количество АДФ и измеряют количество поглощаемого кислорода [34]. Определяется отношение  $\Phi_{ii}/O$ , а также потенциал фосфата и окислительный потенциал субстрата. Соответствующие опыты были проведены Истабруком [39] (см. также [34]). Из полученных значений  $\mathcal{A}_\phi^e$  и  $\mathcal{A}_o^e$  следует высокая степень сопряжения окисления и фосфорилирования ( $q = 0,96$ ). Максимальная эффективность потребления энергии, т. е. отношение выходной мощности к входной зависит только от значения  $q$  и выражается формулой [40]

$$\eta_{\max} = \frac{q^2}{(1 + \sqrt{1 - q^2})^2}.$$

При  $q = 0,96$  находим  $\eta_{\max} = 0,56$ .

Эти феноменологические оценки не дают информации о механизме процесса, они могут иметь лишь ограниченную применимость при рассмотрении событий, реализуемых *in vivo*, так как вовсе не очевидно, что условие близости к равновесию здесь действительно соблюдается. Вместе с тем, высокую степень сопряжения окисления и фосфорилирования, следующую из термоди-

намической трактовки экспериментальных данных, можно, по видимому, считать установленной. Точность определения  $q$  имеет решающее значение для оценки эффективности  $\eta$  — при  $q = 1,00$   $\eta_{\max} = 1,00$ , при  $q = 0,96$   $\eta_{\max} = 0,56$ .

#### § 6.4. ХЕМИОСМОТИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ

Механизм фосфорилирования в окислительно-восстановительной цепи до сих пор нельзя считать точно установленным. Важное значение для его исследования имеет теория хемиосмотического сопряжения, развитая Митчеллом. Эта теория была предложена впервые в 1961 г. [41]. Ее подробное изложение содержится в обзорных работах Митчелла [42—45] и в монографии Скулачева [46].

Не пользуясь непосредственно представлениями неравновесной термодинамики, Митчелл оперирует понятием сопряжения, необходимым при рассмотрении открытых систем. Очевидно, что сопряженные процессы универсальны в живой природе. В любой биохимической реакции, катализируемой ферментом, имеется

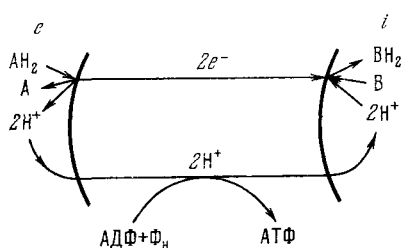


Рис. 6.12. Принцип хемиосмотического сопряжения окисления и фосфорилирования по Митчеллу.

$i$  — внутренняя,  $e$  — внешняя стороны мембраны.

сопряжение между электронными и конформационными перестройками. В системе, содержащей жидкие фазы, разделенные мембраной, возникает сопряжение между химическими реакциями и мембранным транспортом, именуемое Митчеллом *хемиосмотическим сопряжением*. Мембрана играет роль сопрягающей системы. В столь общей формулировке идея хемиосмотического сопряжения не содержит чего-либо нового по сравнению с

представлениями об активном мембранном транспорте, изложенными в гл. 2 и 3. Особенности подхода Митчелла состоят в следующем.

1. Предлагается конкретная модель сопряжения дыхания с фосфорилированием, исходящая из феноменологических соображений.

2. Рассматриваются главным образом равновесные соотношения между факторами, определяющими сопряжение.

Конкретная модель представляется схемой, показанной на рис. 6.12 [46]. Донор водорода  $\text{AH}_2$  (например, аскорбат) окисляется переносчиком электронов (например, цитохромом  $c$ ) у внешней стороны мембраны. Два электрона переносятся через