

## **Лекция 6.**

**Цикл трикарбоновых кислот.**

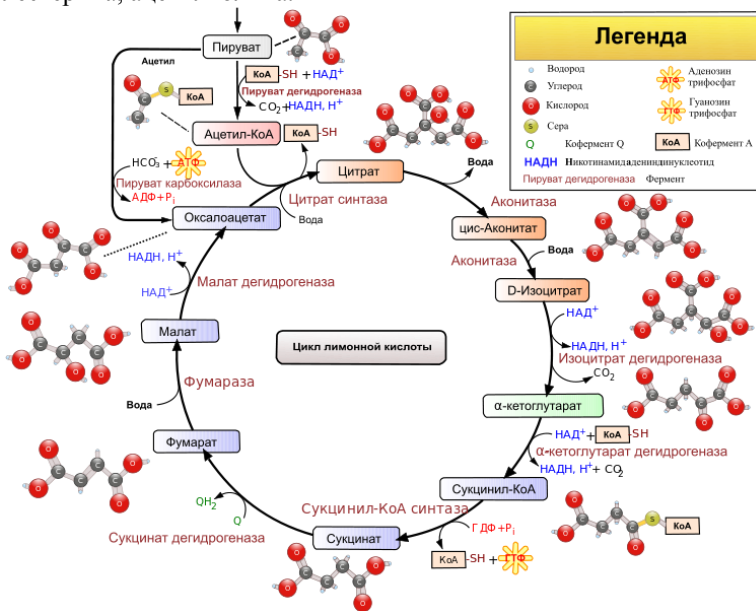
**Пировиноградная кислота и пути ее превращения.**

**Образования НАД, НАДН, АТФ.**

## Сущность ЦТК

Цикл трикарбоновых кислот впервые был открыт английским биохимиком Г. Кребсом. Он первым постулировал значение данного цикла для полного сгорания пирувата, главным источником которого является гликолитическое превращение углеводов. В дальнейшем было показано, что цикл трикарбоновых кислот является тем центром, в котором сходятся практически все метаболические пути. Таким образом, цикл Кребса – общий конечный путь окисления ацетильных групп (в виде ацетил-КоА), в которые превращается в процессе катаболизма большая часть органических молекул, играющих роль «клеточного топлива»: углеводов, жирных кислот и аминокислот.

Цикл трикарбоновых кислот - один из важнейших катаболических процессов аэробных организмов. Вместе с тем в ЦТК образуется много промежуточных продуктов обмена, которые могут использоваться организмом для биосинтеза органических веществ. Так, ацетил-КоА используется не только в энергетическом обмене, но и для синтеза ЖК, холестерина, ацетилхолина.



Пировиноградная кислота, ЩУК и кетоглутаровая кислота в процессах переаминирования служат для образования Ала, Асп, Глу, Асн. В свою очередь, кетокислоты образуются в процессах дезаминирования и переаминирования приведенных аминокислот. Таким образом, из 1 молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ (2 – анаэроб. окис., 6 – окис. НАД и 30 – за счет ЦТК).

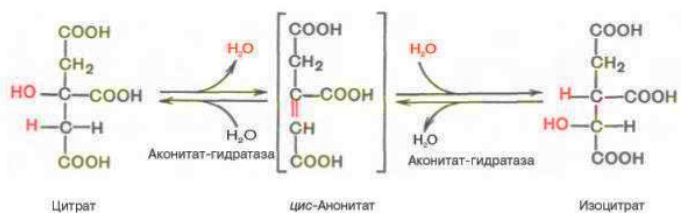
Образовавшийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата в митохондриях ацетил-КоА вступает в цикл Кребса. Данный цикл происходит в матриксе митохондрий и состоит из восьми последовательных реакций. Начинается цикл с присоединения ацетил-КоА к оксалоацетату и образования лимонной кислоты (цитрата). Затем лимонная кислота (шестиуглеродное соединение) путем ряда дегидрирований (отнятие водорода) и двух декарбоксилирований (отщепление  $\text{CO}_2$ ) теряет два углеродных атома и снова в цикле Кребса превращается в оксалоацетат (четыреуглеродное соединение), т.е. в результате полного оборота цикла одна молекула ацетил-КоА сгорает до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , а молекула оксалоацетата регенерируется. Рассмотрим все восемь последовательных реакций (этапов) цикла Кребса.

Первая реакция катализируется ферментом цитрат-синтазой, при этом ацетильная группа ацетил-КоА конденсируется с оксалоацетатом, в результате чего образуется лимонная кислота:



В данной реакции в качестве промежуточного продукта образуется связанный с ферментом цитрил-КоА. Затем последний самопроизвольно и необратимо гидролизуется с образованием цитрата и HS-КоА.

В результате второй реакции образовавшаяся лимонная кислота подвергается дегидратированию с образованием цис-аконитовой кислоты, которая, присоединяя молекулу воды, переходит в изолимонную кислоту (изоцитрат). Катализирует эти обратимые реакции гидратации–дегидратации фермент аконитатгидратаза (аконитаза). В результате происходит взаимоперемещение Н и ОН в молекуле цитрата:

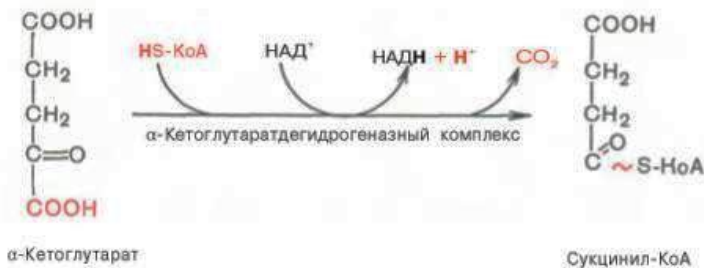


Третья реакция, по-видимому, лимитирует скорость цикла Кребса. Изолимонная кислота дегидрируется в присутствии НАД-зависимой изо-цитратдегидрогеназы.



В ходе изоцитратдегидрогеназной реакции изолимонная кислота одновременно декарбоксилируется. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа является аллостерическим ферментом, которому в качестве специфического активатора необходим АДФ. Кроме того, фермент для проявления своей активности нуждается в ионах Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup>.

Во время четвертой реакции происходит окислительное декарбоксилирование α-кетоглутаровой кислоты с образованием высокоэнергетического соединения сукцинил-КоА. Механизм этой реакции сходен с таковым реакции окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА, α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс напоминает по своей структуре пируватдегидрогеназный комплекс. Как в одном, так и в другом случае в реакции принимают участие 5 коферментов: ТПФ, амид липоевой кислоты, HS-КоА, ФАД и НАД<sup>+</sup>.



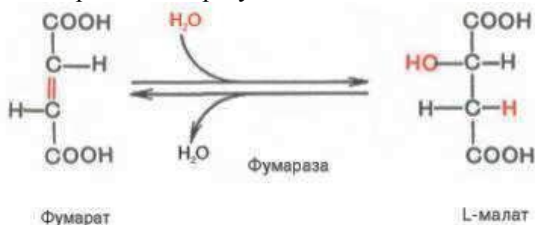
Пятая реакция катализируется ферментом сукцинил-КоА-синтетазой. В ходе этой реакции сукцинил-КоА при участии ГТФ и неорганического фосфата превращается в янтарную кислоту (сукцинат). Одновременно происходит образование высокоэнергетической фосфатной связи ГТФ за счет высокоэнергетической тиоэфирной связи сукцинил-КоА:



В результате шестой реакции сукцинат дегидрируется в фумаровую кислоту. Окисление сукцината катализируется сукцинатдегидрогеназой, в молекуле которой с белком прочно (ковалентно) связан кофермент ФАД. В свою очередь сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной:



Седьмая реакция осуществляется под влиянием фермента фумаратгидратазы (фумаразы). Образовавшаяся при этом фумаровая кислота гидратируется, продуктом реакции является яблочная кислота (малат). Следует отметить, что фумаратгидратаза обладает стереоспецифичностью – в ходе реакции образуется L-яблочная кислота:



В ходе восьмой реакции цикла трикарбоновых кислот под влиянием митохондриальной НАД-зависимой малатдегидрогеназы происходит окисление L-малата в оксалоацетат:



Как видно, за один оборот цикла, состоящего из восьми ферментативных реакций, происходит полное окисление («сгорание») одной молекулы ацетил-КоА. Для непрерывной работы цикла необходимо постоянное поступление в систему ацетил-КоА, а коферменты (НАД<sup>+</sup> и ФАД), перешедшие в восстановленное состояние, должны снова и снова окисляться. Это окисление осуществляется в системе переносчиков электронов в дыхательной цепи (в цепи дыхательных ферментов), локализованной в мембране митохондрий. Образовавшийся ФАДН<sub>2</sub> прочно связан с СДГ, поэтому он передает атомы водорода через КоQ. Освобождающаяся в результате окисления ацетил-КоА энергия в значительной мере сосредоточивается в макроэргических фосфатных связях АТФ. Из 4 пар атомов водорода 3 пары переносят НАДН на систему транспорта электронов; при этом в расчете на каждую пару в системе биологического окисления образуется 3 молекулы АТФ (в процессе сопряженного окислительного фосфорилирования), а всего, следовательно, 9 молекул АТФ.

Одна пара атомов от сукцинатдегидрогеназы-ФАДН<sub>2</sub> попадает в систему транспорта электронов через КоQ, в результате образуется только 2 молекулы АТФ. В ходе цикла Кребса синтезируется также одна молекула ГТФ (субстратное фосфорилирование), что равносильно одной молекуле АТФ. Итак, при окислении одной молекулы ацетил-КоА в цикле Кребса и системе окислительного фосфорилирования может образоваться 12 молекул АТФ.

Если подсчитать полный энергетический эффект гликолитического расщепления глюкозы и последующего окисления двух образовавшихся молекул пирувата до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О, то он окажется значительно большим.

Как отмечалось, одна молекула НАДН (3 молекулы АТФ) образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата в ацетил-КоА. При расщеплении одной молекулы глюкозы образуется 2 молекулы пирувата, а при окислении их до 2 молекул ацетил-КоА и последующих 2 оборотов цикла трикарбоновых кислот синтезируется 30 моле-

кул АТФ (следовательно, окисление молекулы пирувата до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  дает 15 молекул АТФ). К этому количеству надо добавить 2 молекулы АТФ, образующиеся при аэробном гликолизе, и 6 молекул АТФ, синтезирующихся за счет окисления 2 молекул внемитохондриального НАДН, которые образуются при окислении 2 молекул глицеральдегид-3-фосфата в дегидрогеназной реакции гликолиза. Следовательно, при расщеплении в тканях одной молекулы глюкозы по уравнению  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$  синтезируется 38 молекул АТФ. Несомненно, что в энергетическом отношении полное расщепление глюкозы является более эффективным процессом, чем анаэробный гликолиз.

Необходимо отметить, что образовавшиеся в процессе превращения глицеральдегид-3-фосфата 2 молекулы НАДН в дальнейшем при окислении могут давать не 6 молекул АТФ, а только 4. Дело в том, что сами молекулы внемитохондриального НАДН не способны проникать через мембрану внутрь митохондрий. Однако отдаваемые ими электроны могут включаться в митохондриальную цепь биологического окисления с помощью так называемого глицеролфосфатного челночного механизма (рис.).

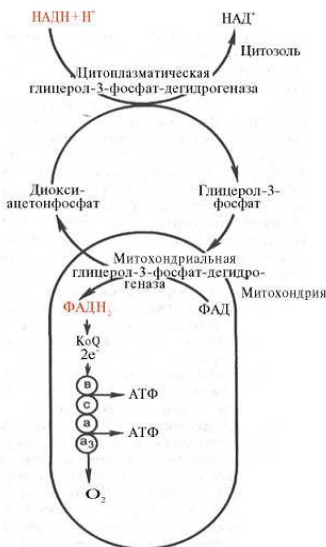
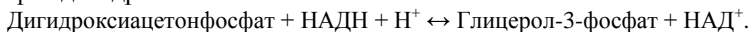
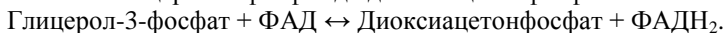


Рис. Глицеролфосфатный челночный механизм.

Цитоплазматический НАДН сначала реагирует с цитоплазматическим ди-гидроксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется НАД-зависимой цитоплазматической глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой:



Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная) глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа (флавиновый фермент) снова окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата:



Восстановленный флавопротеин (фермент-ФАДН<sub>2</sub>) вводит на уровне КоQ приобретенные им электроны в цепь биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму и может вновь взаимодействовать с цитоплазматическим НАДН + H<sup>+</sup>. Таким образом, пара электронов (из одной молекулы цитоплазматического НАДН + H<sup>+</sup>), вводимая в дыхательную цепь с помощью глицеролфосфатного челночного механизма, дает не 3, а 2 АТФ.



Рис. Малат-аспартатная челночная система для переноса восстанавливающих эквивалентов от цитозольного НАДН в митохондриальную матрикс.

С помощью данного челночного механизма лишь в скелетных мышцах и мозге осуществляется перенос восстановленных эквивалентов от цитозольного НАДН + H<sup>+</sup> в митохондрии.



В клетках печени, почек и сердца действует более сложная малат-аспартатная челночная система. Действие такого челночного механизма становится возможным благодаря присутствию малатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы как в цитозоле, так и в митохондриях.

Установлено, что от цитозольного НАДН +  $H^+$  восстановленные эквиваленты сначала при участии фермента малатдегидрогеназы переносятся на цитозольный оксалоацетат. В результате образуется малат, который с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс. Здесь малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный НАД $^+$  восстанавливается в НАДН +  $H^+$ , который может теперь передавать свои электроны в цепь дыхательных ферментов, локализованную на внутренней мембране митохондрии. В свою очередь образовавшийся оксалоацетат в присутствии глутамата и фермента АсАТ вступает в реакцию трансаминирования. Образующиеся аспарат и  $\alpha$ -кетоглутарат с помощью специальных транспортных систем способны проходить через мембрану митохондрий. Транспортирование в цитозоле регенерирует оксалоацетат, что вызывает к действию следующий цикл. В целом процесс включает легкообратимые реакции, происходит без потребления энергии, «движущей силой» его является постоянное восстановление НАД $^+$  в цитозоле глицеральдегид-3-фосфатом, образующимся при катаболизме глюкозы. Итак, если функционирует малат-аспартатный механизм, то в результате полного окисления одной молекулы глюкозы может образоваться не 36, а 38 молекул АТФ.

В таблице приведены реакции, в которых происходит образование высокоэнергетических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы, с указанием эффективности процесса в аэробных и анаэробных условиях.

Таблица 10.1. Образование высокоэнергетических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы

Метаболический путь	Фермент	Место образования АТФ (точнее, высокоэнергетической связи) и сопряженный процесс	Число АТФ, образовавшихся на 1 моль глюкозы
Гликолиз	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6*
	Фосфоглицераткиназа	Фосфорилирование на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование)	2
	Пируваткиназа	То же	2
		Итого...	10
С учетом расходования АТФ в реакциях, катализируемых гексокиназой и фосфофруктокиназой			-2
		Итого...	8
Окислительное декарбоксилирование пируватогradientной кислоты	Пируватдегидрогеназа (пируватдегидрогеназный комплекс)	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
		Итого...	6
Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса)	Изоцитратдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
	$\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназа	То же	6
	Сукцинил-КоА-синтетаза (сукцинаттиокиназа)	Фосфорилирование на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование)	2
	Сукцинатдегидрогеназа	Окисление 2 ФАДН <sub>2</sub> в дыхательной цепи	4
	Малатдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
		Итого...	24
Всего на 1 моль глюкозы в аэробных условиях...			38 АТФ

## Значение и функции ЦТК

1. Энергетическая генерация атомов водорода для работы дыхательной цепи, а именно трех молекул НАДН и одной молекулы ФАДН<sub>2</sub>, синтез одной молекулы ГТФ (эквивалентна АТФ).

2. Анаболическая. В ЦТК образуются предшественник гема – сукцинил-СКоА, кетокислоты, способные превращаться в аминокислоты –  $\alpha$ -кетоглутарат для глутаминовой кислоты, оксалоацетат для аспарагиновой, лимонная кислота, используемая для синтеза жирных кислот, оксалоацетат, используемый для синтеза глюкозы.



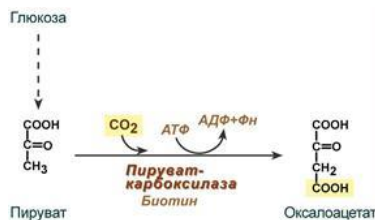
### Регуляция цикла трикарбоновых кислот

Аллостерическая регуляция. Ферменты, катализирующие 1-ю, 3-ю и 4-ю реакции ЦТК, являются чувствительными к аллостерической регуляции метаболитами:

	Ингибиторы	Активаторы
Цитратсинтаза	АТФ, цитрат, НАДН, ацил-SКоА	
Изоцитрат-дегидрогеназа	АТФ, НАДН	АМФ, АДФ
α-Кетоглутарат-дегидрогеназа	Сукцинил-SКоА, НАДН	

### Регуляция доступностью оксалоацетата

Главным и основным регулятором ЦТК является оксалоацетат, а точнее его доступность. Наличие оксалоацетата вовлекает в ЦТК ацетил-SКоА и запускает процесс. Обычно в клетке имеется баланс между образованием ацетил-SКоА (из глюкозы, жирных кислот или аминокислот) и количеством оксалоацетата. Источником оксалоацетата является пируват, (образуемый из глюкозы или аланина), получение из аспарагиновой кислоты в результате трансаминирования или цикла АМФ-ИМФ, и также поступление из фруктовых кислот самого цикла (янтарной, α-кетоглутаровой, яблочной, лимонной), которые могут образоваться при катаболизме аминокислот или поступать из других процессов.



Регуляция активности фермента пируваткарбоксилазы осуществляется при участии ацетил-SКоА. Он является аллостерическим активатором фермента, и без него пируваткарбоксилаза практически неактивна. Когда ацетил-SКоА накапливается, то фермент начинает работать и образуется оксалоацетат, но, естественно, только при наличии пирувата.

Также большинство аминокислот при своем катаболизме способны превращаться в метаболиты ЦТК, которые далее идут в оксалоацетат, чем также поддерживается активность цикла.

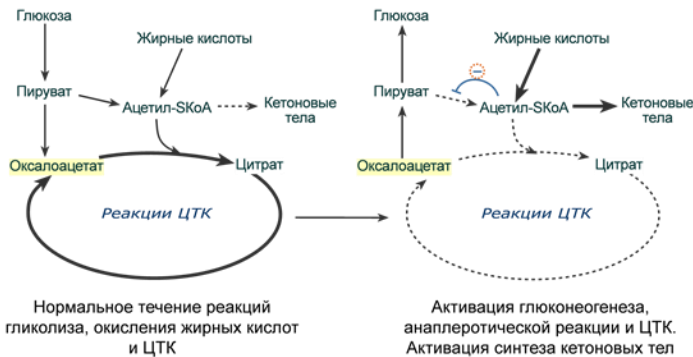


Пополнение пула метаболитов ЦТК из аминокислот

Реакции пополнения цикла новыми метаболитами (оксалоацетат, цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат и т.п) называются анаплеротическими.

Роль оксалоацетата в метаболизме

Примером существенной роли оксалоацетата служит активация синтеза кетонowych тел и кетоацидоз плазмы крови при недостаточном количестве оксалоацетата в печени. Такое состояние наблюдается при декомпенсации инсулинзависимого сахарного диабета (СД 1 типа) и при голодании. При указанных нарушениях в печени активирован процесс глюконеогенеза, т.е. образования глюкозы из оксалоацетата и других метаболитов, что влечет за собой снижение количества оксалоацетата. Одновременная активация окисления жирных кислот и накопление ацетил-SКоА запускает резервный путь утилизации ацетильной группы – синтез кетонowych тел. В организме при этом развивается закисление крови (кетоацидоз) с характерной клинической картиной: слабость, головная боль, сонливость, снижение мышечного тонуса, температуры тела и артериального давления.



Изменение скорости реакций ЦТК и причины накопления кетоновых тел при некоторых состояниях.

Описанный способ регуляции при участии оксалоацетата является иллюстрацией к красивой формулировке "Жиры сгорают в пламени углеводов". В ней подразумевается, что "пламень сгорания" глюкозы приводит к появлению пирувата, а пируват превращается не только в ацетил-SКоА, но и в оксалоацетат. Наличие оксалоацетата гарантирует включение ацетильной группы, образуемой из жирных кислот в виде ацетил-SКоА, в первую реакцию ЦТК.

В случае масштабного "сгорания" жирных кислот, которое наблюдается в мышцах при физической работе и в печени при голодании, скорость поступления ацетил-SКоА в реакции ЦТК будет напрямую зависеть от количества оксалоацетата (или окисленной глюкозы).

Если количество оксалоацетата в гепатоците недостаточно (нет глюкозы или она не окисляется до пирувата), то ацетильная группа будет уходить на синтез кетоновых тел. Такое происходит при длительном голодании и сахарном диабете 1 типа.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия: учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – Москва: Медицина, 1998. – 704 с.
2. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
3. Биохимия животных: учебник / А. В. Чететкин [и др.]; под ред. проф. А. В. Чететкина. – Москва: Высш. шк., 1982. – 511 с.
4. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных / С. Ю. Зайцев. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004. – 382 с.
5. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем; пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
6. Кононский, А. И. Биохимия животных: учебник / А. И. Кононский. – Киев: Выщ. шк., 1980. – 432 с.
7. Кудряшов, Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов / Л. С. Кудряшов. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 160 с.
8. Метревели, Т. В. Биохимия животных / Т. В. Метревели. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004. – 295 с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцепродуктов / Дж. К. Мид; под ред. Дж. К. Мида; пер. с англ. И. С. Горожанкиной. – М.: Профессия, 2009. – 384 с.
10. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебник / А. Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агентство, 2004. – 566 с.
11. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – Санкт-Петербург: Химиздат, 2001.
12. Хазипов, Н. З. Биохимия животных: учебник / Н. З. Хазипов, А. Н. Аскарова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.
13. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
14. Цыганов, А. Р. Биохимия. Практикум: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, И. В. Сучкова, И. В. Ковалёва. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
15. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск: ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

Составители

**Поддубная** Ольга Владимировна  
**Ковалева** Ирина Владимировна  
**Мохова** Елена Владимировна