Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра химии

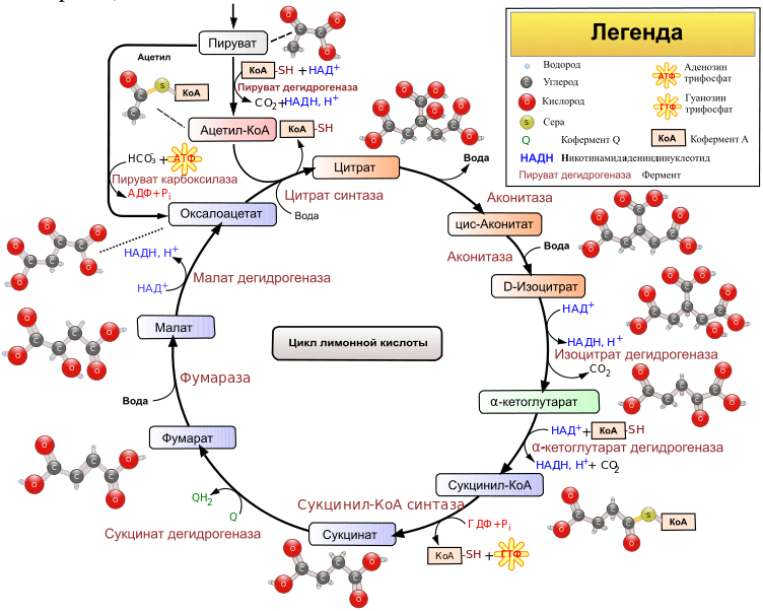
ХИМИЯ

Теоретический раздел
Лекция
Цикл трикарбоновых кислот и его значение.

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.



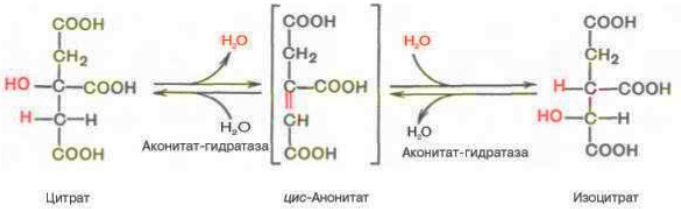
Пировиноградная кислота, ЩУК и кетоглутаровая кислота в процссах переминирования служат для образования Ала, Асп, Глу, Асн. В свою очередь, кетокислоты образуются в процессах дезаминирования и переминирования приведенных аминокислот. Таким образом, из 1 молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ (2 – анаэр. 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 CO_2) теряет два углеродных атома и снова в цикле Кребса превращается в оксалоацетат (четырехуглеродное соединение), т.е. в результате полного оборота цикла одна молекула ацетил-КоА сгорает до CO_2 и H_2O, а молекула окса-лоацетата 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-KoA.

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:

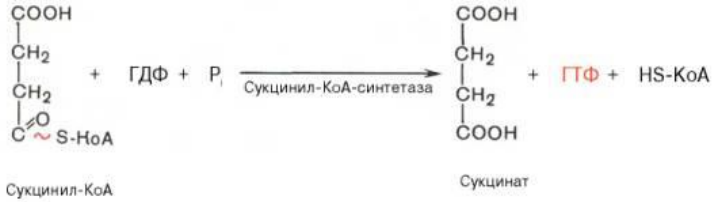


Третья реакция, по-видимому, лимитирует скорость цикла Кребса. Изолимонная кислота дегидрируется в присутствии НАД-зависимой изо-цитратдегидрогеназы.

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^{2+} или Mn^{2+}.

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+.

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 высокоэргической фосфатной связи ГТФ за счет высокоэргической тиоэфирной связи сукцинил-КоА:



Сукцинил-КоА Сукцинат

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:

Сукцинат Фумарат

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:

Фумарат L-малат

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 ($НАД^+$ 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 $ФАДН_2$ прочно связан с СДГ, поэтому он передает атомы водорода через KoQ. 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-$ФАДН_2$ попадает в систему транспорта электронов через KoQ, 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 CO_2 и H_2O, 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 CO_2 и H_2O 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 $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ 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.).

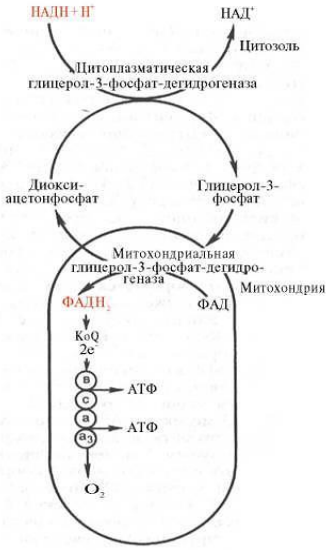


Рис. Глицеролфосфатный челночный механизм.

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

Дигидроксиацетонфосфат + НАДН + H^+ ↔ Глицерол-3-фосфат + $НАД^+$.

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:

Глицерол-3-фосфат + ФАД ↔ Диоксиацетонфосфат + $ФАДН_2$.

Восстановленный флавопротеин (фермент-ФАДН2) вводит на уровне KoQ приобретенные им электроны в цепь биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, а диоксиаце-тонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму и может вновь взаимодействовать с цитоплазматическим НАДН + H^+. Таким образом, пара электронов (из одной молекулы цитоплазматического НАДН + H^+), 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 митохондриальный матрикс.

С помощью данного челночного механизма лишь в скелетных мышцах и мозге осуществляется перенос восстановленных эквивалентов от цитозольного НАДН + H^+ 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 аспартатаминотрансферазы 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 α-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 высокоэргических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы, с указанием эффективности процесса в аэробных и анаэробных условиях.

Таблица 10.1. **Образование высокоэргических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы**

Метаболический путь	Фермент	Место образования АТФ (точнее, высокоэргической связи) и сопряженный процесс	Число АТФ, образовавших-ся 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 пировиноградной кислоты	Пируватдегидрогеназа (пируватдегидрогеназный комплекс)	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
		Итого...	6
Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса)	Изоцитратдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
	α-Кетоглутаратдегидрогеназа	То же	6
	Сукцинил-КоА-синтетаза (сукцинаттиокиназа)	Фосфорилирование на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование)	2
	Сукцинатдегидрогеназа	Окисление 2 $ФАДН_2$ 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 генерацияатомов водорода для работы дыхательной цепи, а именно трех молекул НАДН и одной молекулы $ФАДН_2$,синтез одной молекулы ГТФ (эквивалентна АТФ).

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

Анаболические реакции ЦТК

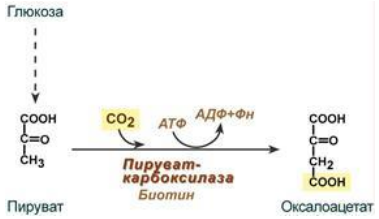
Регуляция цикла трикарбоновых кислот

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-SKoA	
Изоцитрат-дегидрогеназа	АТФ, НАДН	АМФ, АДФ
α-Кетоглутарат-дегидрогеназа	Сукцинил-SKoA, НАДН	

Регуляция доступностью оксалоацетата

Главным и основны регулятором ЦТК является оксалоацетат, а точнее его доступность. Наличие оксалоацетата вовлекает в ЦТК ацетил-SKoA и запускает процесс. Обычно в клетке имеется баланс между образованием ацетил-SKoA (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.



Синтез оксалоацетата из пирувата

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

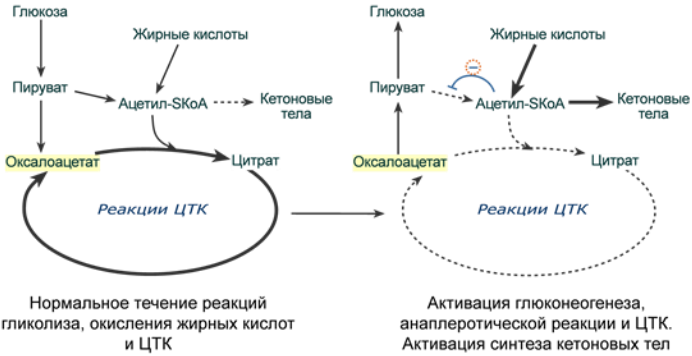
Также большинство аминокислот при своем катаболизме способны превращаться в метаболиты ЦТК, которые далее идут в оксалоацетат, чем также поддерживается активность цикла.

Пополнение пула метаболитов ЦТК из аминокислот

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

Роль оксалоацетата в метаболизме

Примером существенной роли оксалоацетата служит активация синтеза кетоновых 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-SKoA запускает резервный путь утилизации ацетильной группы – синтез кетоновых 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-SKoA, но и в оксалоацетат. Наличие оксалоацетата гарантирует включение ацетильной группы, образуемой из жирных кислот в виде ацетил-SKoA, 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-SKoA 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. Чечеткин [и др.]; под ред. проф. А. В. Чечеткина. – 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