



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto
„Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų
plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios
technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 321. BIOCHEMIJA

Laboratorinis darbas

Mitochondrijų funkcinį parametrų įvertinimas. Kvėpavimo greičio nustatymas.

Aerobai pradinėse substratų oksidacijos etapuose panaudoja tas pačias fermentų sistemas, kaip ir anaerobai (glikolizę ir kt.), tačiau tolesni oksidacijos etapai (TCA ir oksidacinis fosforilinimas) būdingi tik aerobams. Eukariotuose galutiniai aerobinės oksidacijos etapai vyksta mitochondrijose. Jų metu redukuoti substratai pilnai oksiduojami iki CO₂ ir H₂O, todėl galimas didesnis energijos kiekio atpalaidavimas ir sukaupimas ATP forma. Anaerobinės oksidacijos metu iš vieno molio gliukozės gaunami du moliai ATP, o pilnos aerobinės oksidacijos procese - net 38 moliai ATP.

Galima išskirti tris stadijas, kuriomis vyksta medžiagų oksidacija visuose organizmuose:

1. Pirmoje stadijoje įvairūs substratai oksiduojami iki **acetil-KoA**. Čia išlaisvinama nedaug energijos.

2. Antroje stadijoje dviangliai fragmentai (acetil-KoA pavidale) mitochondrijų matrikse oksiduojami TKC. Ši stadija yra susijusi su palyginti didelių energijos kiekių išlaisvinimu redukuotų kofermentų NADH ir FADH₂ pavidale.

3. Trečiojoje stadijoje redukuoti nikotinamidų ir flavino kofermentai oksiduojami mitochondrijų kvėpavimo grandinėje. Oksidacijos metu susidaro H₂O ir išlaisvinama

daugiausiai energijos. Elektronų pernaša mitochondrijose yra **membraninis procesas**. Jo metu energija transformuojama į specifinę membraninėms struktūroms formą - elektrocheminį protonų gradientą. Ši energijos forma panaudojama ATP sintezei. Tokiu būdu elektronų pernaša mitochondrijų kvėpavimo grandine (oksidacija) susijusi su ADP fosforiliniu, todėl procesas bendrai vadinamas **oksidaciniu fosforiliniu**.

Nikotinamidadeninukleotidas (NAD^+) yra dehidrogenazių (atimančių vandenilio atomus iš oksiduojamo substrato - etanolio, pieno rūgšties ir pan. molekulių) kofermentas. Citoplazmoje susidaro nedaug NADH. Glikolizės metu, veikiant fermentui gliceraldehido 3-fosfatdehidrogenazei susidaro mažas NADH kiekis, kuris esant deguoniui bus reoksiduojamas mitochondrijose. Mitochondrijų matrikse daugiausiai NADH susidaro, veikiant piruvato dehidrogenazei (PDH), glutamato dehidrogenazei, β -oksidacijos ciklui ir Krebso ciklo dehidrogenazėms.

Oksidoreduktazės, kurių kofermentas yra NAD^+ , vadinamos **NAD-priklausomomis dehidrogenazėmis**. Jų kofermentas NAD nėra kovalentiškai sujungtas su apofermentu. Susidaręs NADH oksiduojamas kvėpavimo grandinėje. Citoplazmos NADH negali būti tiesiogiai oksiduojamas kvėpavimo grandinėje. Jis patenka į mitochondrijas savotiškos pernašos, vadinamųjų malat-aspartato arba gliceraldehid-3-fosfato šuntų pagalba.

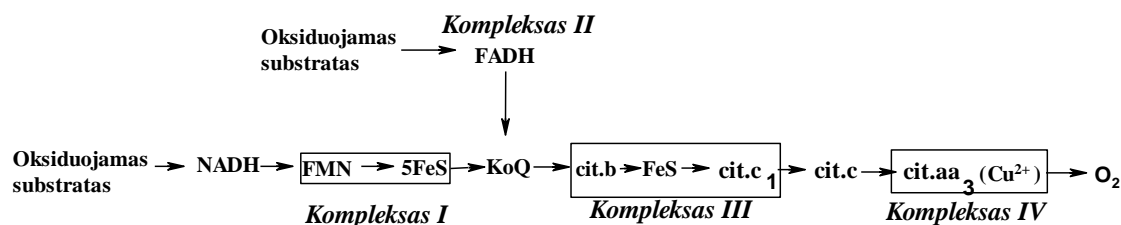
Kitų dehidrogenazių kofermentas yra flavinadeninukleotidas (FAD), jos vadinamos **FAD-priklausomomis dehidrogenazėmis**. Flavino kofermentai yra prostetinės grupės, tvirtai (kovalentiškai arba nekovalentiškai) susirišusios su fermentais, vadinamais flavino dehidrogenazėmis (K_d 10^{-8} - 10^{-11}). Šiuo bruožu flavino kofermentai skiriasi nuo nikotinamido kofermentų, kuriems nebūdingas tvirtas susirišimas su fermentais. FAD-priklausomų dehidrogenazių daugiau yra mitochondrijose. Su energijos išlaisvinimu susijusios šios FAD-priklausomos dehidrogenazės: sukcinato dehidrogenazė (TKC fermentas) ir glicerolio 3-fosfato dehidrogenazė (glicerofosfato šunto fermentas), riebalų rūgščių β -oksidacijos ciklo acil-KoA dehidrogenazė. Joms veikiant susidaręs FADH_2 yra kvėpavimo grandinės substratas.

Kvėpavimo grandinė. Kvėpavimo grandinė yra vidinėje mitochondrijų membranoje esanti sudėtinga oksidacijos-redukcijos sistema, kuri perneša elektronus deguoniui (susidarant vandeniui). Ją sudaro yra hidrofobiniai integraliniai baltymai, įterpti į vidinės membranos fosfolipidų dvisluoksnį ir du judrūs elektronų nešikliai:

citochomas c ir kofermentas Q. Hidrofilinis citochromas c yra periferinis baltymas, silpnais ryšiais prijungtas prie vidinės membranos išorinės pusės. Kofermentas Q arba ubichinonas nesusijęs su baltymu elektronų nešiklis.

Pagrindinė kvėpavimo grandinės funkcija – laipsniškai išlaisvinti energiją iš redukuotų kofermentų (NADH ir FADH₂), kurie yra kvėpavimo grandinės substratai. Kvėpavimo grandinėje elektronai perduodami nuo vieno elektronų nešiklio kitam (elektronų nešikliai paeiliui oksiduojasi ir vėl redukuojasi). Visą grandinę sudaro apie 20 tokių grįžtama redukcija/oksidacija pasižyminčių elektronų nešiklių. Jie išskiriami mitochondrijų membraną veikiant detergentais. Tuomet jie išskiriami ne po vieną, bet stambesniais kompleksais, todėl manoma, kad tokius kompleksus jie sudaro ir mitochondrijų membranoje.

Kvėpavimo grandinę sudaro keturi stambūs fermentų kompleksai, tarp kurių elektronus perneša mažesni judrūs elektronų nešikliai (KoQ ir citochromas c), kurie į kompleksų sudėtį neįeina. Kompleksai turi vieną arba kelias prostetines grupes, kurios grįžtamai prijungia elektronus. Elektronų pernaša tarp kvėpavimo grandinės kompleksų vyksta pagal schemą 1 pav.:

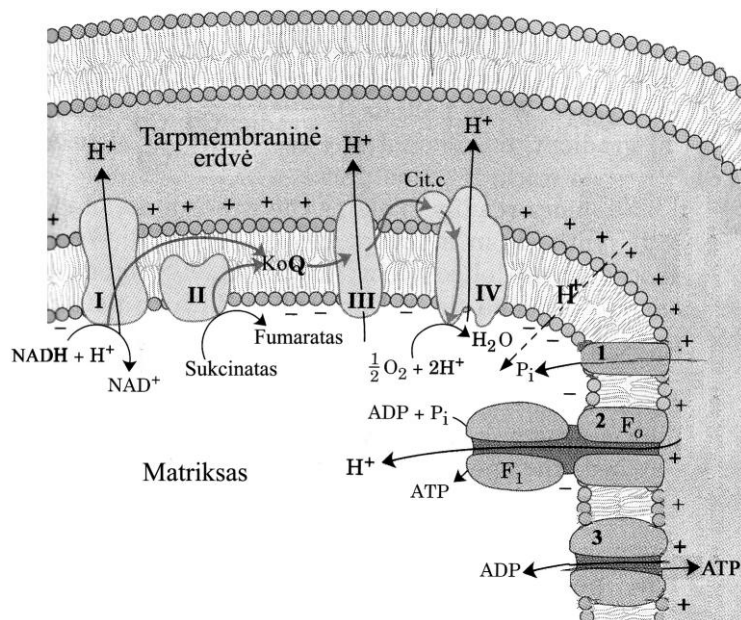


1 pav. Kvėpavimo grandinės kompleksų savitieji inhibitoriai.

Labai svarbi elektronų pernašos kvėpavimo grandinėje savybė yra tai, jog ji susijusi su protonų pernaša iš matrikso į tarpmembraninę erdvę. Kvėpavimo grandinėje protonus išmeta kompleksai I, III ir IV (2 pav.). Koks yra molekulinis protonų pernešimo mechanizmas nėra visai aišku. Manoma, kad protonus išmeta baltymai, tiksliau, tam tikri jų polipeptidinių grandinių fragmentai, kurie kerta membraną. Tokiomis savybėmis pasižymintys baltymai vadinami **protonų siurbliais arba pompomis**.

Oksidacinis fosforilimas. ADP fosforilimas nėra savaiminis, šiam procesui būtina energija. Todėl ATP sintezė gali vykti tik tuo atveju, jei būtina energija

gaunama skylant kitam makroerginiam junginiui, toks fosforilinimo būdas vadinamas *substratiniu fosforiliniu*. Jei fosforilinimui reikalingą energiją teikia membranoje veikiančioje kvėpavimo grandinėje vykstantys oksidacijos-redukcijos procesai, ATP sintezė vadinama *oksidaciniu fosforiliniu*.



2 pav. Oksidacinio fosforilinimo sistema. Kvėpavimo grandinės kompleksai pažymėti romėniškais skaitmenimis (I, II, III, IV – atitinkamai), fosforilinimo sistemos sandai – lotyniškais (1,2,3 - fosfato nešiklis, ATP sintazė, ATP/ADP nešiklis, atitinkamai).

Šiuolaikinės biochemijos požiūriu oksidacinio fosforilinimo mechanizmas yra gerai ištirtas. P.Mitčelo hipotezė (suformuluota 1961 m.), aiškinanti kaip vyksta oksidacinis fosforilinimas, vadinama **chemioosmozine hipoteze arba teorija**. Ši teorija teigia, kad *elektrocheminis protonų potencialas* sieja mitochondrijų kvėpavimą su fosforiliniu (ATP sinteze). Teorija ypatingą reikšmę teikia protonų siurblių veiklai ir vidinės mitochondrijų membranos savybėms. Vidinė mitochondrijų membrana nelaidi protonams, todėl jie negali laisvai grįžti į mitochondrijų matriksą difuzijos būdu. Todėl protonų pernaša yra elektrogeninė, t.y., kurianti įtampą, nes tarpmembraninėje erdvėje padidėja H^+ koncentracija ir teigiamų krūvių skaičius, lyginant su mitochondrijų matriksu. Taip veikiant kvėpavimo grandinės siurbliams, substratų oksidacijos metu atsipalaiduojanti laisvoji energija sukaupiama abipus

mitochondrijų vidinės membranos sukūrto **elektrocheminio protonų gradiento** pavidalu..

Mitochondrijų vidinės membranos išorinė pusė įgyja teigiamą krūvį dėl čia susikaupusių protonų ($[H^+]_{\text{matrikse}} \ll [H^+]_{\text{citozolyje}}$). Matrikse susidaro H^+ stoka, t.y. greta membranos vidinės pusės atsiranda neigiamą krūvių perteklius (OH^-), todėl membranos vidinė pusė įgyja neigiamą krūvį. Taip tarp vidinės membranos išorinės ir vidinės pusių susidaro elektrinio potencialo skirtumas, žymimas $\Delta\Psi$ simboliu (skaitoma “delta psai”). Dėl protonų koncentracijos didėjimo terpė prie vidinės membranos išorinės pusės rūgštėja, o matriksas prie šios membranos vidinės pusės dėl protonų stygiaus šarmėja. Taip susidaro pH skirtumas (gradientas), žymimas ΔpH .

Apibendrinant, elektrocheminį protonų gradientą arba protonavaros jėgą Δp sudaro dvi protonų siurblių sukurtos dedamosios:

- 1) **H^+ koncentracijos gradientas** (cheminis gradientas) arba ΔpH , ir
- 2) **elektrinio potencialo gradientas**, lemiamas krūvių skirtumo tarp kompartmentų:

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2.303 RT/F \Delta pH,$$

kur R - universalioji dujų konstanta, T - absoliuti temperatūra, F - Faradėjaus konstanta ($23.062 \text{ kcal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Aktyviai kvėpuojančios žinduolių mitochondrijos generuoja maždaug 200 mV elektrocheminį potencialą, kurio 80% sudaro $\Delta\Psi$, o likusius 20% - ΔpH . Elektrocheminis protonų gradientas nėra pastovus, jis gali kisti dėl daugelio priežasčių, viena iš kurių - vidinės membranos pažeidimas ir padidėjęs jos laidumas protonams.

Taigi, elektrocheminio potencialo forma sukaupiamas tam tikras energijos kiekis. Taip kvėpavimo grandinė atlieka chemiosmotinį darbą, sukurdamą elektrocheminį protonų gradientą. Ši energijos forma panaudojama ATP sintezei mitochondrijų membranoje.

ATP sintazė. Elektrocheminio protonų potencialo panaudojimas. Elektrocheminis protonų potencialas yra energijos forma, naudojama įvairiuose procesuose (aktyviai jonų pernašai, šilumos gamybai ir kt.). Didžiausia jo dalis naudojama ADP fosforilinimui. Šią reakciją katalizuoja sudėtingas vidinės membranos fermentas **ATP-sintazė**, kartais vadinama **kompleksu V** (2 pav.).

ATP-sintazę sudaro mažiausiai 9 polipeptidai, organizuoti į tris stambesnius subvienetus.

- 1) membraną kertantį protonų kanalą, žymimą simboliu F_0 ;
- 2) jungtį - F_A , kitaip vadinama kojele ir
- 3) katalitinį subvienetą - F_1 .

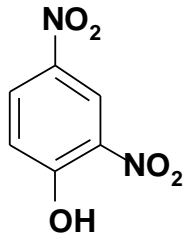
Šie subvienetai tvirtai susiję ir sudaro grybo formos integralinį baltymų kompleksą, kuris dar vadinamas F_0, F_1 -ATP-sintaze.

Chemiosmotinė teorija teigia, kad protonai grįžta į mitochondrijų matriksą per kanalą, esantį membraninėje ATP-sintazės dalyje F_0 . Šis protonų srautas aktyvina ATP-sintazę, kuri katalizuoja ADP fosforilinimą. Taigi, mitochondrijų vidinėje membranoje elektronų pernaša apjungta su ADP fosforiliniu per elektrocheminį protonų gradientą. ATP sintazę slopina antibiotikas *oligomicinas*.

Oksidacinio fosforilinimo metu į mitochondrijas turi būti nuolat tiekiami fosforilinimo substratai ADP ir fosfato jonai, o susidaręs mitochondrijų matrikse ATP turi patekti į citozolį, kuriame yra panaudojamas (susidarant ADP ir fosfatui). Nei viena iš šių medžiagų (oksidacinio fosforilinimo substratų ir produktų) be nešiklių negali pereiti pro vidinę mitochondrijų membraną. Todėl, be ATP-sintazės, fosforilinimo sistema sudaro dar du baltymai: ADP/ADP nešiklis ir fosfato nešiklis (2 pav.).

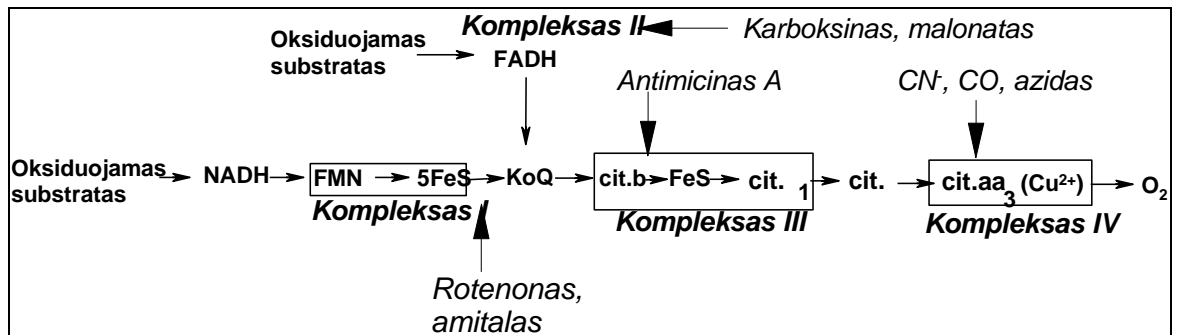
Oksidacijos ir fosforilinimo procesų atskyrimas. Skyrikliai. ATP sintezės efektyvumas priklauso nuo mitochondrijų vidinės membranos laidumo jonams. Jei vidinės membranos vientisumas pažeistas, tokia membranos laidumas jonams didėja. Jonai (H^+ , K^+ , Ca^{2+}) tiesiogiai pereina membraną ir sumažina Δp . Tai aktyvuoja kvėpavimo grandinę, todėl greitėja substratų oksidacija ir deguonies sunaudojimas. Tačiau fosforilinimo greitį Δp kritimas mažina. Jei membrana nežymiai pažeista, tai aktyviai dirbanti kvėpavimo grandinė gali palaikyti pakankamai didelį Δp ir fosforilinimas visai nesustoja. Membranos pažeidimą atspindi sumažėjęs P/O santykis, nes oksidacinių procesų aktyvumas padidėjęs, o fosforilinimo -sumažėjęs. Oksidacijos ir fosforilinimo procesų apjungimo sutrikimas vadinamas jų *atskyrimu*. Atskyrimą sukelia veiksniai, pažeidžiantys membranos vientisumą ir tam tikri cheminiai junginiai, vadinami *skyrikliais*.

Skyrikliai dažniausiai rūgščių savybių hidrofobiniai junginiai. Vidinės membranos išorinėje pusėje, kur pH yra mažas jie prijungia protonus. Hidrofobiniai skyrikliai lengvai pereina per membraną ir šarminiame matrikse disocijuoja, išlaisvindami protonus ir taip mažina elektrocheminį protonų potencialą. Tipiškas skyriklis yra *dinitrofenolis (DNP)*:



Kai skyriklių koncentracija didelė, potencialas gali visai išnykti. Tokioje būsenoje mitochondrijos nesintezuoja ATP, nors elektronų pernaša kvėpavimo grandine (deguonies panaudojimas) vyksta aktyviai. Išsiskyrusi energija negali būti panaudota ATP sintezei ir išbarstoma šilumos pavidalu.

Kvėpavimo grandinės slopikliai. Kvėpavimo grandinės funkcijai tirti naudojami junginiai, specifiskai slopinantys kvėpavimo grandinės fermentus. Jei tam tikras kvėpavimo grandinės kompleksas yra slopinamas, elektronų srautas šioje vietoje nutrūksta. Taip, kaip užtvėnkus upę, vanduo susikaupia prieš užtvanką, taip nuslopinus kvėpavimo grandinę elektronai susikaupia prieš nuslopinimą kompleksą. Todėl prieš nuslopinimą kompleksą esantys elektronų nešikliai redukuojasi, o po komplekso – oksiduojasi. Specifiniai inhibitoriai, blokuojantys elektronų srautą kvėpavimo grandinėje, nurodyti schemoje (3 pav.).



3 pav. Kvėpavimo grandinės kompleksų savitieji inhibitoriai.

Visi šie slopikliai yra nuodai, bet jų poveikis skirtingas ir priklauso nuo slopinamo komplekso padėties grandinėje bei nuo inhibitoriaus-komplekso sąveikos patvarumo. Pavyzdžiui, komplekso I slopinimas nėra tokia pavojingas kaip komplekso IV, nes oksiduojamų substratų elektronai gali patekti į grandinę per kompleksą II. Veikiant komplekso I slopikliams, mitochondrijose kaupiasi NADH ir mažėja visų NAD-priklausomų dehidrogenazių aktyvumas. Tačiau FAD-priklausomos dehidrogenazės tebėra aktyvios, todėl elektronai pernešami kompleksu II ir kitais grandinės

kompleksais, užtikrinant deguonies redukciją. Taigi, audinių kvėpavimas gali vykti be komplekso I, šiuo atveju aktyviai oksiduojami sukcinatas ir glicerolio 3-fosfatas. Komplexo III inhibitoriai beveik visai blokuoja audinių kvėpavimą, kadangi tiek NAD-, tiek FAD-priklausomos dehidrogenazės neaktyvios trūkstant oksiduotų kofermentų NAD⁺ ir FAD formų. Patys pavojingiausi citochromoksidazės slopikliai. Netgi mažos dozės jų koncentracijos sukelia negrįžtamą komplekso IV slopinimą, dėl kurios audinių kvėpavimas visiškai sustoja. Pavyzdžiui, 50 mg *cianido* dozė yra mirtina. Kitas ypač pavojingas junginys yra smalkės CO. CO jungiasi prie visų hemoproteinų (citochromų, hemoglobino, mioglobino) hemo grupės, bet jo sąveika su citochromoksidazės hemu yra tvirčiausia, todėl toksinis CO poveikis pirmiausiai pasireiškia kaip hipoksija atsirandanti dėl elektronų transporto ir energetinių procesų blokavimo.

1. Mitochondrijų kvėpavimo greičio matavimas

Reagentai:

Inkubavimo terpė (IT)

KCl 110 mM ();

MgCl₂ 2,24 mM 512 μl 0,45M MgCl₂ tirpalo);

Tris-HCl 10 mM ();

KH₂PO₄ 5 mM ();

pH 7,2 (37°C temperatūroje).

Atsverti reagentai tirpinami maždaug 75 ml H₂O, tirpalas šildomas iki +37⁰C. Po to į jį lašinamas praskiestas HCl tirpalas tol, kol pH pasieks 7,2.

Sukcinato tirpalas 0,1 M

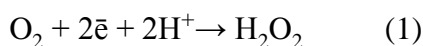
Rotenono tirpalas 1mM

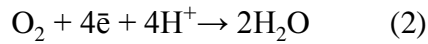
ADP tirpalas 0,1M

DNP tirpalas

Oligomicino tirpalas 0,5mg/ml spirito

Mitochondrijų kvėpavimas registruojamas poliarografiškai, naudojant uždara Klarko tipo deguonies elektrodą ir poliarografą (Rank Brothers LTD, Anglija), cirkuliacinį termostatą. Sistemą susireguliuoti padeda laborantas ar dėstytojas. Poliarografinis metodas pagrįstas vandenyje ištirpusio deguonies elektrochemine redukcija:





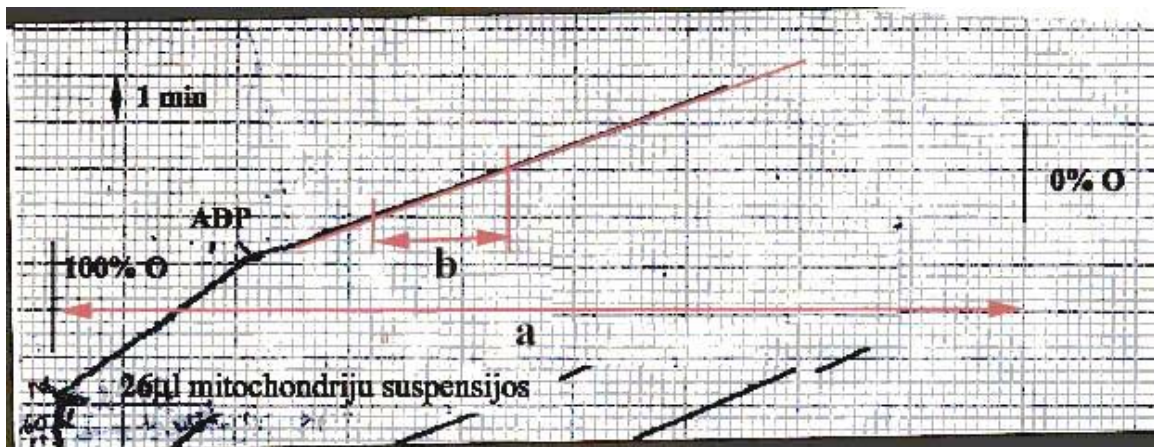
Tinkamai maišant tirpalą, kuriame vyksta (1) ir (2) elektrocheminės reakcijos, deguonies difuzijos į nemašomą tirpalo sluoksnį prie pat elektrodo paviršiaus greitis priklauso nuo ištirpusios deguonies koncentracijos.

Deguonis poliarografiškai matuojamas taip parinkus darbinio elektrodo potencialą, kad elektrocheminė reakcija ant elektrodo paviršiaus neribotų bendro proceso greičio. Šiose sąlygose pasiekama vadinamoji “soties srovė”. Todėl deguonies koncentracija nemašomame tirpalo sluoksnyje prie elektrodo paviršiaus daug kartų mažesnė už deguonies koncentraciją tirpale.

Parodymai registruojami nepertraukiamai, savirašio juostoje, juostos judėjimo greitį nustatykite 1 cm/min.

1. Į termostatuojamą kiuvetę (37 °C) kiuvetę įpilama 1 ml IT, pridedama 10 µl sukcinato tirpalo ir 1 µl rotenono tirpalo (rotenonas yra I kvėpavimo grandinės komplekso slopiklis. Jis pridedamas norint išvengti sukcinato dehidrogenazės slopinimo susidariusiu oksaloacetatu. Nuslopinus I kvėpavimo grandinės kompleksą NADH priklausomos dehidrogenazės slopinamos dėl redukuoto NADH pertekliaus ir oksalo acetatas nesusidaro. Kvėpavimo grandinės substratas šiuo atveju yra FADH₂ ir elektronai pernešami II III ir IV kvėpavimo grandinės kompleksais). Kiuvetę uždaryti kamščiu. Parodymus registruoti apie 1 min. laiko (nesant terpėje mitochondrijų deguonis neturi būti vartojamas).
2. Pridedama mitochondrijų suspensijos (apie 1 mg mitochondrijų baltymo). Stebimas nedidelis deguonies sunaudojimas. Greitis atsiranda dėl nespecifinio membranos laidumo. Kvėpavimo grandinė palaiko pakankamai Δp, tačiau fosforilinimas nevyksta nes nėra fosforilinimo substrato – ATP (II metabolinė mitochondrijų būseną). Registruojama apie 2 min.
3. Pridedama 2 µl 0,1 M ATP tirpalo. Registruojamas maksimalus mitochondrijų kvėpavimo greitis (III metabolinė mitochondrijų būseną). Pasibaigus ATP greitis sumažėja (IV mitochondrijų metabolinė būseną). Pridėjus naują kiekį ATP greitis vėl išauga. Kadangi tirpaus deguonies kiekis viename mililitre terpės yra ribotas (duotoje terpėje 420 nmolO/ml 37 °C temperatūroje) ir priedų skaičius yra ribotas.

4. Analogiškai užrašomi kiti bandiniai panaudojant (kartojant 1, į terpę papildomai pridėjus 1 μl oligomicino ir 2 procedūras).
5. Pridedama 2 μl 0,1 M ATP tirpalo. Greitis nedidėja. Paaiškinkite kodėl?
6. Pridedama 2 μl DNP. Pasiekiamas maksimalus kvėpavimo greitis. Paaiškinkite kodėl? Visus bandinius pakartojame 2, 3 kartus.
7. Apskaičiuokite mitochondrijų kvėpavimo. Tuo tikslu brėžiama liestinė toje kreivės dalyje, kuriuo laiko momentu yra skaičiuojamas greitis (4 pav.).



4 pav. Poliarograma.

Apskaičiuojant mitochondrijų kvėpavimo greičius, taikant formulę:

$$V = \frac{420 \text{ nmol O} / \text{ml} \times b}{a \times B}, \text{ kur}$$

- B – pridėtas mitochondrijų baltymo kiekis,
- a – skalės dydis cm, kai deguonies koncentracija keičiasi nuo 100 % iki 0 %,
- b – sunaudoto deguonies kiekis (tai yra cm kiek pasislinko savirašio plunksna per 1 min.).

naudojamas deguonies tirpumas yra 420, nanomolių deguonies 1 ml terpės 37 °C temperatūroje. Kvėpavimo greitis išreiškiamas nmolO/min. vienam mg mitochondrijų baltymo.

Išskirtų mitochondrijų kvėpavimo greitis buvo matuojamas terpėje, kurios sudėtis: 110 mM KCl, 2,24 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM glutamato + 5 mM malato arba 10 mM sukcinato + 1 μM rotenono, pH 7,2 (37°C temperatūroje). Maksimalus mitochondrijų kvėpavimo greitis buvo gaunamas į inkubacinę terpę pridedant 50 mM kreatino, 4 TV/ml kreatinfosfokinazės ir 1 mM ATP. Fosforilindama kreatiną, kreatinfosfokinazė nuolat palaiko terpėje didelę ADP koncentraciją ir taip stimuliuoja maksimalų mitochondrijų kvėpavimą. Būseną kai kvėpavimo greitis, maksimaliai aktyvuotas ADP priedu, terpėje esant substrato ir deguonies, vadinama trečia mitochondrijų metabolinė būseną [Chance, Williams, 1955, 1956]. Mūsų darbe trečiaja metaboline būseną vadiname mitochondrijų būseną, kuriai būdingas maksimalus fosforilinimo greitis (kurio reikšmė atitinka klasikiniu būdu išmatuotą), nors jis pasiekiamas 1 mM ATP priedu kreatinfosfokinazinėje ADP-regeneracinėje sistemoje (ATP/ADP apie 9 [Kholodenko, 1987]). Ši kreatinfosfokinazės ADP-regeneracinė sistema buvo pasiūlyta ir pradėta naudoti Kauno medicinos universiteto Biomedicininų tyrimų instituto Biochemijos laboratorijoje [Kholodenko, 1987]. Sistema ypatingai patogi oksidacinio fosforilinimo efektorių poveikio tyrimui, nes ji nekontroliuoja deguonies panaudojimo, todėl kvėpavimo greitis joje priklauso tik nuo mitochondrijų fermentų.