

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ

©2013 г. В. Г. ГРИВЕННИКОВА, А. Д. ВИНОГРАДОВ

Кафедра биохимии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Кислород как окислитель. III. Митохондрии сердца и их дыхательная цепь. IV. Объекты и измерение активностей митохондриальных ферментов-генераторов АФК. V. Митохондриальные ферменты – источники АФК. VI. О физиологическом и патофизиологическом значении митохондриальной продукции АФК. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Взрослый человек в состоянии полного покоя потребляет около 10 ммоль кислорода в минуту и выдыхает почти эквивалентное (зависящее от физиологического состояния) количество углекислого газа [1]. Эти величины десятикратно возрастают при умеренной физической нагрузке, такой, например, как быстрая ходьба по траве со скоростью ~10 км/час. Об интенсивности окислительного обмена веществ даёт представление следующая оценка: если принять, что окисление глюкозы до углекислого газа и воды прочно сопряжено с окислительным фосфорилированием и кислород восстанавливается только цитохромоксидазой митохондрий, то дыхание человека в состоянии покоя сопровождается оборотом (распадом и ресинтезом) примерно 40 кг АТФ за сутки! Более 90% потребляемого млекопитающими кислорода восстанавливается мито-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДЛДГ – дигидролипоамиддегидрогеназа; ДОДГ – дигидрооротатдегидрогеназа; α -КГДГК – α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; МАО – моноаминооксидаза; мГФДГ – митохондриальная α -глицерофосфатдегидрогеназа; ПДГК – пируватдегидрогеназный комплекс; СМЧ – субмитохондриальные частицы; СОД – супероксиддисмутаза; ЭПФ – электронпереносящий флавопротеин; Amplex Red – 10-ацетил-3,7-дигидрофеноксазин; NOX – NAD(P)H-оксидаза; $O_2^{\cdot -}$ и $O_2^{\cdot -}H$ – супероксид-анион и его протонированная форма; $\cdot OH$ – гидроксил-радикал; $\Delta\mu$ – разность электрохимических потенциалов ионов водорода.

Адрес для корреспонденции: vgrivennikova@mail.ru (В.Г.Гривенникова)

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 11-04-00916 и № 12-04-00602 и гранта фонда Фогарти Национального института здоровья США #R03TW007825.

хондриальной цитохромоксидазой до воды. Очень небольшая часть превращается в частично восстановленные продукты (супероксид, перекись водорода, гидроксил-радикал), получившие обобщенное название активных форм кислорода (АФК, в англоязычной литературе – ROS, **R**eactive **O**xxygen **S**pecies). С конца пятидесятих годов прошлого века участию этих продуктов в физиологии и биохимии клеток уделяют все больше внимания. Уместно отметить главные вехи на пути изучения биохимии АФК в хронологической последовательности (табл. 1). Данные, касающиеся митохондриальных источников АФК, их зависимости от функционального состояния митохондрий и, тем более, количественные оценки, хотя и многочисленны, но часто противоречивы. В качестве иллюстрации можно привести несколько цитат из публикаций в этой области. «The mitochondrial electron-transport chain is the main source of ROS during normal metabolism»¹ [16]. «The mitochondrial respiratory chain constitutes the main intracellular source of ROS in most tissues»² [17]. «Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species?»³ [18]. «There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells»⁴ [19]. Следует также иметь в виду, что митохондрии различных тканей сильно различаются по относительным и абсолютным активностям участвующих в метаболизме АФК ферментов, а также по локальным концентрациям кислорода (печень, почки, эндотелий сосудов, лёгкие).

Мы сосредоточим внимание, главным образом, на продукции АФК митохондриями сердца. Это обусловлено, во-первых, собственным опытом работы, а, во-вторых, тем, что митохондрии сердца можно изучать как в «интактном» состоянии, так и получать из них очищенные ферменты, пригодные для анализа.

¹ «Электрон-транспортная цепь митохондрий – основной источник АФК при нормальном метаболизме» (перевод с англ.).

² «Дыхательная цепь митохондрий является главным источником АФК в большинстве тканей» (перевод с англ.).

³ «Являются ли митохондрии постоянным источником активных форм кислорода?» (перевод с англ.).

⁴ «Нет доказательств того, что митохондрии – главный источник активных форм кислорода в клетках млекопитающих» (перевод с англ.).

Таблица 1.
**Историческая сводка работ, положивших основание
 развитию биохимии АФК¹**

Авторы и год публикации	Краткое содержание работы	Ссылка
R. Gershman <i>et al.</i> , 1954	Формулировка концепции, согласно которой токсичность кислорода и повреждающее действие ионизирующей радиации обусловлены общей причиной – возникновением АФК.	[2]
D. Harman, 1956	Предложена свободно-радикальная теория старения.	[3]
P.K. Jensen, 1966	Показано, что потребление кислорода компонентами дыхательной цепи митохондрий, блокированной антимицином А, сопровождается образованием перекиси водорода.	[4]
J.M. McCord and I. Fridovich, 1969	Открытие и описание свойств Zn, Cu-содержащей супероксиддисмутазы.	[5]
B.V. Keele <i>et al.</i> , 1970	Обнаружение Mn-содержащей супероксиддисмутазы в <i>E. coli</i> .	[6]
G. Loschen <i>et al.</i> , 1971	Демонстрация зависимости образования перекиси водорода интактными митохондриями от их функционального состояния.	[7]
D. Harman, 1972	Обоснование специфической роли митохондрий в опосредованном АФК старении.	[8]
A. Boveris, 1972	Количественная оценка вклада различных компонентов в суммарное образование перекиси водорода клетками печени.	[9]
V.M. Babior, 1973	Описание «всплеска» дыхания при активации лейкоцитов: обнаружение NAD(P)H-оксидазы, генерирующей супероксид.	[10]
A.A. White <i>et al.</i> , 1976	Обнаружение сигнальной роли АФК: активация гуанилатциклазы перекисью водорода.	[11]

¹ Мы ограничились кратким описанием содержания работ, опубликованных до 1976 г. включительно. В последующие годы количество публикаций, посвященных АФК, продолжало и продолжает возрастать лавинообразно. Все они, по нашему мнению, пока не содержат «открытий», или принципиально новых концепций, а только расширяют и углубляют идеи, предложенные исследователями – пионерами этой области. Читателю, интересующемуся сигнальными «функциями» АФК [12, 13], их немитохондриальными источниками [14] и современным состоянием энзимологии супероксиддисмутаз [15], следует обратиться к соответствующим обзорам.

В начале обзора будут описаны некоторые химические свойства кислорода в качестве окислителя. Далее мы дадим краткое описание сведений, касающихся главного потребителя кислорода – дыхательной цепи митохондрий. Кроме основных компонентов дыхательной цепи митохондрии содержат несколько оксидоредуктаз, способных восстанавливать кислород до АФК. Краткому описанию этих ферментов будет посвящена следующая часть обзора. В заключительной части мы обсудим ряд положений, касающихся физиологического и патофизиологического значения АФК.

II. КИСЛОРОД КАК ОКИСЛИТЕЛЬ

Кислород – сильный окислитель. В связи с предметом настоящего обзора уместно кратко остановиться на самом понятии «сильный окислитель» и некоторых химических свойствах кислорода. Аэробная энергетика всех живых существ обеспечивается свободной энергией окислительно-восстановительной реакции между восстановителем (внутриклеточная среда, усредненный редокс потенциал которой составляет примерно –320 мВ) и окислителем – кислородом, редокс-потенциал которого в реакции образования воды при нейтральных значениях рН равен примерно +800 мВ. Кислород – «сильный» окислитель в том смысле, что реакция образования воды:



при восстановлении кислорода электронами, поставляемыми восстановительными эквивалентами клетки (главным образом NADH), *термодинамически* необратима. С другой стороны, кислород – «плохой» окислитель. Электронная структура его молекулы (два неспаренных электрона с одинаковыми спиновыми числами на разных π -орбиталях) такова, что кислород не может принять *одновременно* два электрона от подавляющего числа органических молекул – доноров пары электронов с антипараллельными спинами. *Кинетическая* инертность кислорода обеспечивает устойчивость многочисленных органических молекул в окружающей нас среде, содержащей 21% газообразного кислорода. Спиновый запрет реакций окисления органических соединений кислородом в сочетании с термодинамической необратимостью таких реакций и послужил физико-химической основой того, что кислород выбран эволюцией в качестве окислителя (fitness of oxygen [20]). Эволюция решила проблему кинетической инертности кислорода, создав ферменты-оксидазы, катализирующие восстановление кислорода до воды

(цитохромоксидазы, реакция 1), или до перекиси водорода (другие оксидазы, реакция 2):



Проблема спинового запрета решается этими ферментами так, что восстановление кислорода в суммарных реакциях (1) или (2) происходит ступенчато с помощью одноэлектронных доноров-кофакторов: ионов металлов переменной валентности (железо, марганец, молибден, медь) и (или) органических молекул, способных существовать в свободнорадикальном состоянии (флавины, хиноны). В отличие от кинетически инертного молекулярного кислорода промежуточные продукты его восстановления (АФК) реакционноспособны, и некоторые из них, например, гидроксил-радикал, могут неферментативно окислять белки, липиды, нуклеиновые кислоты и низкомолекулярные метаболиты. Замечательное свойство большинства ферментов-оксидаз состоит в том, что они катализируют ступенчатое восстановление кислорода до воды или перекиси водорода, не освобождая в окружающую среду промежуточно восстановленных реакционноспособных и тем самым потенциально опасных для клеток форм кислорода (см., например, работу [21] и приведенный в ней список литературы). Только очень небольшая часть потребляемого кислорода восстанавливается до перекиси водорода (реакция 2), которая, в свою очередь, сама служит субстратом-окислителем для так называемых пероксидаз:



или восстановителем и окислителем в реакции её дисмутации (каталаза):



Существование каталитически активных ионов металлов переменной валентности и (или) органических соединений, способных к одноэлектронным реакциям, в составе оксидоредуктаз или белках-переносчиках кислорода (миоглобин, гемоглобин) приводит к потенциальной возможности одноэлектронного восстановления кислорода до супероксид-радикала – аниона при физиологических значениях рН (pK_a супероксида равен 4,7):



Прямые доказательства образования супероксид-радикала в качестве продукта ферментативной реакции были получены в 1969 г. (ксан-

тиноксидазная активность модифицированной ксантиндегидрогеназы, МКФ 1.17.3.2) [22], и с тех пор «ксантиноксидаза» чаще всего используется в качестве источника супероксид-радикала при исследовании биологических объектов.

Супероксид в водных растворах при $\text{pH} > 5$ (см. pK_a в уравнении 5) нестабилен и достаточно быстро неферментативно дисмутирует:

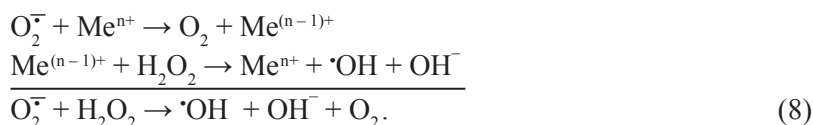


в реакции второго порядка с константой скорости $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [23]. В 1969 г. МакКорд и Фридович показали, что белок эритроцитов, ранее известный как эритрокупреин, катализирует реакцию (6) с параметрами (число оборотов, сродство к субстрату), вполне соизмеримыми с таковыми для других оксидоредуктаз [5]. Фермент содержит медь и цинк в качестве кофакторов. Позднее в прокариотах [6] был обнаружен изофермент супероксиддисмутазы, содержащий марганец.

Одноэлектронное восстановление перекиси водорода (третий электрон на пути ступенчатого четырех-электронного восстановления молекулярного кислорода до воды) приводит к возникновению крайне реакционноспособного (термодинамически и кинетически) гидроксил-радикала:



Донором для одноэлектронного восстановления перекиси водорода может служить супероксид-радикал в реакции, катализируемой металлами переменной валентности (Fe, Cu):



Отметим, что перекись водорода в смеси с ионами металлов переменной валентности издавна используют в химии в качестве окислителя (реактив Фентона). Суммируя сказанное, следует подчеркнуть, что по-настоящему «активной» формой кислорода является только гидроксил-радикал, но, так как его образование связано с возникновением супероксида и перекиси водорода (реакции 5–8), все три промежуточно восстановленные формы кислорода принято относить к «активным». Основные ферментативные реакции с участием кислорода с указанием стандартных окислительно-восстановительных потенциалов пар их участников показаны на рис. 1.

Некоторые оксидоредуктазы, для которых кислород не является ни «истинным» субстратом, ни продуктом, в аэробных условиях *in*

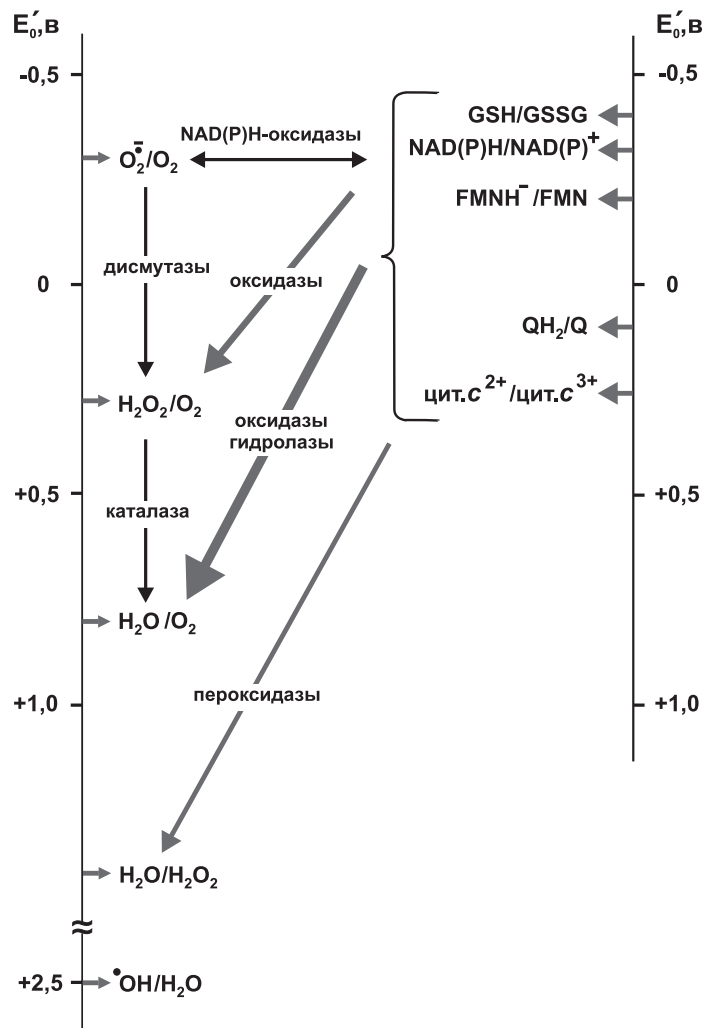


Рис. 1. Диаграмма основных реакций с участием кислорода.

Правая и левая вертикальные линии – шкалы стандартных окислительно-восстановительных потенциалов относительно потенциала водородного электрода при рН = 7,0. На левой шкале стрелками помечены потенциалы «кислородных» участников реакций, а на правой – основных субстратов-доноров электронов. Для простоты в составе последних не помечены потенциалы других субстратов-доноров оксидазных реакций: моно- и диаминооксидаз, оксидаз аминокислот, гексозооксидаз, многочисленных субстратов гидроксилаз. Читатель может найти описание их свойств в классическом труде Кларка [24]. Для левой шкалы использованы данные из обзоров [20, 24–26].

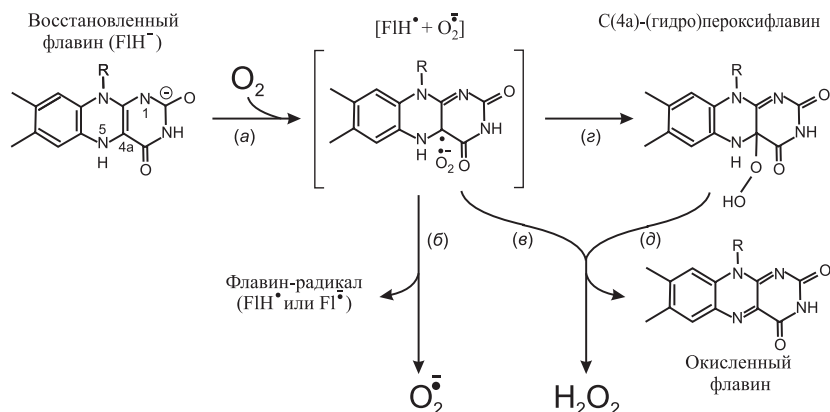


Рис. 2. Образование супероксид-радикала и перекиси водорода при участии восстановленного флавина (адаптировано по [27]). Пояснения в тексте.

in vitro побочно образуют или утилизируют АФК. Подавляющее их большинство – флавопротеины, и участие флавинового кофактора в качестве катализатора при образовании АФК мы рассмотрим в качестве примера. Флавины (FMN и FAD) способны восстанавливаться и окисляться одноэлектронно с образованием радикальных форм. У многих ферментов это свойство флавинов используется при переносе двух электронов от субстратов-доноров на редокс-компоненты, способные принимать только один электрон (железо-серные центры, гемы цитохромов). Восстановленные флавины как в свободном состоянии, так и в составе белков, могут взаимодействовать с молекулярным кислородом и, в зависимости от белкового окружения, продуктами такой реакции оказываются либо $O_2^{\bullet-}$, либо H_2O_2 , либо и то, и другое. На рис. 2 в упрощённом виде приведена общепринятая схема окисления восстановленного флавина кислородом [27]. Восстановленный флавин (Fln⁻) отдает один электрон молекуле кислорода, в результате чего образуется радикальная пара (Fln[•]·O₂^{•-}) (стадия *a*). Гомолитический распад пары приводит к образованию супероксид-радикала и радикала флавина (реакция *b*), а гетеролитический – к образованию перекиси водорода и окисленного флавина, либо непосредственно (реакция *c*), либо через образование C(4a)-(гидро)пероксифлавина, реакции *d* и *e*).

Другая возможность образования АФК реализуется при взаимодействии одноэлектронных редокс-компонентов оксидоредуктаз (молибден, железо-серные центры, гемы цитохромов, прочно связанные убисемихиноны) с молекулярным кислородом. В таких реакциях образуется супероксид.

III. МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА И ИХ ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

Сердце – непрерывно сокращающийся орган, требующий значительных энергетических затрат. Для сердечной мышцы характерен аэробный обмен и основным источником АТФ служит процесс окислительного фосфорилирования, протекающий в митохондриях. Митохондрии, составляющие 25–30% от массы миокарда, локализованы в непосредственной близости к миофибриллам и соединены между собой хорошо развитой системой межмитохондриальных контактов [28, 29]. Основным «топливом» для работы сердца служат жирные кислоты, глюкоза, лактат и, в меньшей степени, пируват и кетоновые тела, поступающие из кровотока [30, 31]. Митохондрии сердца устроены так же, как в других тканях, и состоят из двух замкнутых мембран: внешней и внутренней, последняя образует развитую систему крист так, что объём, ограниченный внутренней мембраной (матрикс) невелик. Внешняя мембрана отделяет митохондрии от цитоплазмы. Во внешней мембране и на её поверхностях располагаются некоторые ферменты, а также специализированные белки-порины, обеспечивающие осмотически неактивный перенос метаболитов и соединений различной природы с молекулярной массой до ~ 5 кДа в межмембранное пространство. Во внутренней мембране находится основной энергопреобразующий аппарат клетки, представленный пятью основными компонентами: дыхательными комплексами I (NADH:убихинон-редуктаза), II (сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза), III (убихинол:цитохром *c*-оксидоредуктаза) и IV (цитохром *c*:кислород-оксидоредуктаза, цитохромоксидаза). Четыре дыхательных комплекса и «мобильные» переносчики электронов – убихинон и цитохром *c*, образуют то, что принято считать канонической дыхательной цепью. Пятый компонент – АТФ-синтетаза ($F_0 \cdot F_1$ -АТРаза). В результате сопряженной работы этих ферментов происходит перенос электронов от NADH и сукцината на молекулярный кислород с образованием воды, а энергия окисления запасается в виде фосфорильного потенциала АТФ. Во внутренней мембране митохондрий находятся белки-транслоказы, обеспечивающие высокоизбирательный транспорт ионов и органических соединений во внутреннее пространство митохондрий (матрикс). Митохондрии содержат и другие оксидоредуктазы, субстратом-окислителем которых служит митохондриальный убихинон. Митохондриальный матрикс содержит «растворимые» ферменты, обеспечивающие образование NADH – главного поставщика восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь (цикл ди-, трикарбоновых кислот, β -окисление жирных кислот и др.).

IV. ОБЪЕКТЫ И ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ-ГЕНЕРАТОРОВ АФК

ПРЕПАРАТЫ

Для изучения генерации АФК митохондриями используют несколько экспериментальных систем: интактные и пермеабилizованные митохондрии, препараты субмитохондриальных частиц (СМЧ), а также изолированные очищенные препараты оксидоредуктаз. Каждая из этих систем имеет свои преимущества и недостатки.

Интактные митохондрии

При использовании интактных митохондрий образование АФК мембранными белками и белками матрикса происходит в «естественном» окружении ферментов-генераторов. Хорошо сопряженные митохондрии позволяют моделировать различные метаболические состояния: покоя – в присутствии избытка субстратов окисления (нет добавленной ADP, медленное дыхание, состояние 4 по Чансу [32]), или активной работы (добавлен ADP, быстрое дыхание, состояние 3 [32]). Следует, однако, иметь в виду, что для реакций, протекающих в матриксе, необходим транспорт субстратов через внутреннюю мембрану. Рассмотрим гипотетическую реакцию, в которой при окислении NADH в матриксе митохондрий образуется супероксид-радикал или перекись водорода. Для измерения этой активности к митохондриям обычно добавляют субстраты NAD⁺-зависимых дегидрогеназ, например, малат, окисление которого в матриксе приводит к появлению NADH – субстрата дыхательной цепи. Равновесие малатдегидрогеназной реакции сильно смещено в сторону *образования* малата и окисленного NAD⁺, поэтому в среду кроме малата обычно добавляют либо глутамат (для переаминирования образующегося оксалоацетата и сдвига равновесия), либо пируват, продукт окисления которого (ацетил-коА) в реакции конденсации с оксалоацетатом образует цитрат. Таким образом, суммарная регистрируемая скорость образования, например, перекиси водорода в среде будет определяться: 1) активностью транслоказ малата, глутамата и аспартата (в первом случае) и малата, пирувата и цитрата (во втором случае); 2) активностями малатдегидрогеназы и трансаминазы (в первом случае) и пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГК) и цитратсинтазы (во втором); 3) активностями ферментов, образующих перекись водорода; 4) активностями внутримитохондриальных ферментов, разрушающих АФК (так

называемая система «антиоксидантной» защиты), к которым относятся глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, каталаза, пероксиредоксины, глутаредоксины и две СОД (матриксная и межмембранная); и, наконец, 5) скоростью транспорта образующейся перекиси водорода во внешнюю среду. Очевидно, что в такой системе достаточно трудно установить, на какой этап суммарного процесса влияет то или иное соединение, претендующее на роль эффектора образования перекиси.

Внутренняя мембрана митохондрий не проницаема для супероксида [33, 34]. Почти общепризнано, что внутренняя мембрана свободна проницаема для H_2O_2 . Однако недавно мы показали, что это не так: образование кислорода внутримитохондриальной каталазой из добавленной к интактным митохондриям перекиси сильно стимулировалось при их пермеабиллизации каналобразующим антибиотиком аламетицином [35].

Применение этого антибиотика частично решает проблему транспорта субстратов и продуктов в интактных митохондриях. В определенных условиях аламетицин обеспечивает беспрепятственный перенос низкомолекулярных веществ через модифицированную им внутреннюю мембрану, при сохранении белкового состава матрикса [36, 37]. С другой стороны, пермеабиллизация приводит к полному исчезновению протондвижущей силы (Δp) – решающего физиологически значимого параметра всего метаболизма митохондрий

Изолированные ферменты

Изолированные очищенные препараты оксидоредуктаз не содержат примесей других ферментов, что делает удобным их использование для изучения механизма генерации АФК. Однако, по крайней мере, для мембраносвязанных ферментов, нельзя исключать их возможную модификацию при выделении, так как многие процедуры очистки включают в себя стадии обработки детергентами и ультразвуком. Кроме того, в очищенных системах невозможно изучать влияние мембранного потенциала.

Субмитохондриальные частицы

Компромиссное решение проблемы – использование СМЧ. На наш взгляд, это наиболее подходящий объект для изучения генерации АФК, а также ряда других реакций, катализируемых ферментами внутренней мембраны митохондрий. Этот препарат (вывернутые (inside-out) замкнутые везикулы, образованные внутренними мембранами митохондрий) катализирует окисление NADH и сукцината с

величинами дыхательного контроля (отношение скоростей поглощения кислорода в состоянии 3 и 4) около 8 и 3, соответственно [38]. Активные центры мембраносвязанных оксидоредуктаз, которые в интактных митохондриях экспонированы в матрикс, в СМЧ доступны для добавленных веществ. Кроме того, СМЧ почти лишены всех растворимых белков матрикса, в том числе и компонентов «антиоксидантной» защиты. При окислении субстратов дыхательных ферментов или при гидролизе АТФ на мембране СМЧ образуется Δp , что позволяет имитировать различные физиологические состояния митохондрий (состояние 3 или 4, и их переходы).

СПОСОБЫ РЕГИСТРАЦИИ АФК

Определение супероксид-радикала

Регистрация супероксида представляет собой непростую задачу даже при изучении очищенных ферментов. Молекула супероксид-радикала нестабильна, поэтому для ее определения обычно используют различные редокс-соединения, быстрое и по возможности специфическое восстановление или окисление которых супероксидом регистрируют либо оптическими методами, либо ЭПР. Часто для этого используют восстановление цитохрома *c*, окисление адреналина, восстановление тетразолиевых красителей, окисление дигидроэтидина, а также реакции с использованием спиновых ловушек [39]. К сожалению, ни один из этих приёмов не обладает абсолютной специфичностью к супероксид-радикалу. Трудности обусловлены еще и тем, что многие оксидоредуктазы непосредственно восстанавливают или окисляют указанные реагенты. Поэтому приходится рассчитывать скорость генерации супероксид-радикала как СОД-чувствительную составляющую продукта реакции. Для избежания ошибок и достоверного определения «фоновая» (СОД-нечувствительная) активность должна составлять малую долю от суммарного изменения концентрации реагента. Существуют и косвенные методы определения. Так, железо-серный центр аконитазы, катализирующей превращение цитрата в изоцитрат, крайне чувствителен к окислению, и фермент быстро теряет свою каталитическую активность в присутствии супероксид-радикала. Соотношение между активной и неактивной формой фермента иногда используют для оценки генерации супероксида в матриксе митохондрий [39, 40]. Другой подход к определению генерации супероксид-радикала – измерение перекиси водорода, которая образуется из него в присутствии избытка СОД [39, 41].

Определение перекиси водорода

Для измерения перекиси водорода используют приём, основанный на том, что гем-содержащие пероксидазы с высоким сродством связывают H_2O_2 с образованием спектрально различимого комплекса (Соединение I) [41]. На том же принципе основаны и другие способы определения перекиси с использованием пероксидазы и различных флуоресцирующих или поглощающих свет субстратов-доноров, таких как скополетин, диацетилдихлорфлуоресцеин, *para*-гидрокси-фенилуксусная кислота, гомованилиновая кислота, или в последнее время чаще всего применяемый Amplex Red [39, 42]. Эти субстраты восстанавливают соединение I, перекись водорода превращается в воду, а продукты окисления детектируются. Методы определения перекиси водорода осложнены непосредственным взаимодействием реагентов и редокс-компонентов ферментов и требуют проведения многочисленных контрольных измерений.

V. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – ИСТОЧНИКИ АФК

Митохондрии, выделенные из различных тканей, образуют перекись водорода при аэробном окислении различных субстратов [7, 41, 43]. Наблюдаемая скорость образования перекиси сильно зависит от ткани-источника митохондрий, применяемых субстратов-доноров, ионного состава и pH среды измерения, а также использованного метода определения АФК [44–46]. Метаболическое состояние митохондрий прямо связано с их способностью к генерации перекиси водорода: так при контролируемом окислении сукцината в отсутствие ADP (состояние 4) продукция H_2O_2 максимальна, тогда как в присутствии разобщителей или при добавлении ADP (состояние 3) скорость генерации резко снижена [7, 9, 47, 48]. По оценкам Бовериса и соавт. [9] образование перекиси водорода в печени происходит со скоростью около 90 нмоль/мин на 1 г ткани, и на долю митохондрий в общей продукции перекиси приходится около 15%. К сожалению, эта работа, опубликованная ещё в 1972 году, остаётся единственной, в которой была сделана попытка с рядом неизбежных допущений оценить относительный вклад различных клеточных органелл в суммарную продукцию перекиси. Аналогичные данные для сердца отсутствуют, но можно предполагать, что относительный вклад для сердечной мышцы, более богатой митохондриями по сравнению с печенью, окажется значительно выше. На образование перекиси водорода расходуется до 3% от

общего количества кислорода, поглощаемого митохондриями [44, 48]. Участие ферментов дыхательной цепи в этом процессе впервые было показано в работе П. Йенсена (см. таблицу 1), в которой было обнаружено антимицин-нечувствительное⁵ поглощение кислорода препаратами митохондриальных мембран, окислявшими NADH или сукцинат, сопровождающееся образованием H₂O₂ [4]. В дальнейшем, были выявлены специфические компоненты дыхательной цепи – источники АФК: комплекс I [49–52] и комплекс III [16, 53, 54], а также целый ряд других оксидоредуктаз, продуцирующих перекись водорода и/или супероксид-радикал [55].

В таблице 2 перечислены митохондриальные ферменты, для которых экспериментально показана их способность образовывать АФК. Содержание этих ферментов в митохондриях разных тканей сильно различается. Так, например, ферменты 1–4 и 7 высокоактивны в митохондриях всех изученных тканей, тогда как активность фермента 8 особенно велика в митохондриях бурого жира и тканей насекомых. Данные об относительной активности ферментов 5, 6 и 9 в различных тканях ограничены и/или противоречивы. В связи с этим мы сосредоточим внимание, главным образом, на ферментах 1–4 и 7, имеющих относительно высокую удельную активность в митохондриях сердца, и только кратко в начале этого раздела опишем свойства ферментов 5, 6, 8 и 9.

ДИГИДРООРОТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Дигидрооротатдегидрогеназа (ДОДГ, дигидрооротат:убихинон-оксидоредуктаза, МКФ 1.3.99.11) – флаavin-содержащий фермент, катализирующий единственную окислительно-восстановительную реакцию в биосинтезе пиримидинов *de novo*. У млекопитающих ДОДГ локализована во внутренней мембране митохондрий (класс II дигидрооротатдегидрогеназ) [65–69]. FMN-содержащий активный центр фермента находится в гидрофильной части белка, экспонированной в межмембранное пространство, тогда как в малом домене, связанном с поверхностью мембраны, расположен гидрофобный канал, обеспечивающий возможность убихинону принимать восстановительные эквиваленты непосредственно от молекулы FMN [64, 70]. N-концевая последовательность ДОДГ важна для взаимодействия с убихиноном и для связывания фермента с мембраной митохондрий [71]. ДОДГ обнаружена во многих

⁵ Антимицин – специфический ингибитор переноса электронов между убихинолом и цитохромом *c*.

Таблица 2.
Ферменты, катализирующие продукцию супероксид-радикала и перекиси водорода в митохондриях

Фермент	Основная реакция	Редокс-кофакторы	Локализация	Ссылка
1. Комплекс I	$NADH + Q + H^+ + 4H^+_{in} \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{out}$	FMN, 8 железо-серных центров, связанный убихинон	Внутренняя мембрана митохондрий	[56]
2. Комплекс II	Сукцинат + Q \rightarrow Фумарат + QH ₂	FAD, 3 железо-серных центра, гем <i>b</i>	Внутренняя мембрана митохондрий	[57]
3. Комплекс III	$QH_2 + 2 \text{цит. } c^{3+} + 2H^+_{in} \rightarrow Q + 2 \text{цит. } c^{2+} + 2H^+ + 2H^+_{out}$	2 гема <i>b</i> , железо-серный центр, гем цит. <i>c</i> ₁	Внутренняя мембрана митохондрий	[58]
4. Дигидролипоамид-дегидрогеназа	Дигидролипоамид + NAD ⁺ \rightarrow Липоамид + NADH + H ⁺	FAD, редокс активный дисульфид	Магрикс	[59]
5. NAD(P)H оксидаза (NOX4)	$NAD(P)H + O_2 + H^+ \rightarrow NAD(P)^+ + H_2O_2$	FAD, 2 гема <i>b</i>	Внешняя мембрана	[60]
6. Моноаминоксидаза	Амин + O ₂ + H ₂ O + H ⁺ \rightarrow Альдегид + H ₂ O ₂ + NH ₄ ⁺	FAD	Внешняя мембрана	[61]
7. Ацил-CoA-дегидрогеназа, электропереносящий флавопротеин и его дегидрогеназа	Ацил-CoA + Q \rightarrow Еноил-CoA + QH ₂	FAD, железо-серный центр	Магрикс, внутренняя сторона внутренней мембраны	[62]
8. α -глицерофосфатдегидрогеназа	α -глицерофосфат + Q \rightarrow фосфодиоксиацетон + QH ₂	FAD	Внешняя сторона внутренней мембраны	[63]
9. Дигидрооротатдегидрогеназа	Дигидрооротат + Q \rightarrow Оротат + QH ₂	FMN	Внешняя сторона внутренней мембраны	[64]

клетках и тканях, но её активность особенно велика в тканях с высоким уровнем пролиферации (опухолевые клетки, клетки слизистой кишечника, корковое вещество почек) [66, 68, 69]. В сердце ДОДГ нельзя отнести к основным компонентам дыхательной цепи, так как ее активность составляет всего около 1/15 от активности сукцинатдегидрогеназы (этот фермент наиболее активен в митохондриях сердца и печени) [69]. Данные о способности ДОДГ продуцировать АФК в митохондриях противоречивы. Впервые образование супероксида при аэробном окислении дигидрооротовой кислоты в присутствии цианида было продемонстрировано в опытах с митохондриями печени [72], а затем подтверждено при использовании митохондрий мозга и ДОДГ, солюбилизированной из митохондрий печени и освобожденной от цитохрома *b* [73]. Авторы предположили, что источником генерации супероксида служит флавин. Однако при гистохимическом окрашивании митохондрий сердца и коркового вещества почек оказалось, что при окислении дигидрооротога перекись водорода обнаруживается в матриксе митохондрий и в областях, непосредственно прилегающих к внутренней стороне крист, а не в межмембранном пространстве, как это следовало ожидать, если бы перекись образовывалась при участии флавина. Окрашивание сильно ослаблялось в присутствии специфического ингибитора фермента бреквинара [68]. Следует отметить, что ингибитор дыхания (KCN), использованный в этих опытах, значительно повышает уровень восстановленности как ДОДГ, так и других ферментов дыхательной цепи, что может приводить к завышенным скоростям продукции супероксида (или перекиси водорода как продукта его дисмутации), а, с другой стороны, создает условия для образования АФК не только на уровне самой дегидрогеназы, но и в других участках дыхательной цепи. Поэтому вопрос о том, может ли ДОДГ эффективно генерировать АФК в отсутствие ингибиторов, остается открытым [70]. Тем не менее, в последнее время было обнаружено, что некоторые фармакологические препараты, действие которых направлено на гидрофобный канал фермента и которые препятствуют взаимодействию FMN с убихиноном, значительно снижают генерацию АФК в культурах опухолевых клеток [74]. Эти данные косвенно указывают на способность ДОДГ образовывать АФК, по крайней мере, в опухолевых клетках.

МГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Митохондриальная α -глицерофосфатдегидрогеназа (мГФДГ, ГФДГ 2 типа, α -глицерол-3-фосфат:убихинон-оксидоредуктаза, МКФ 1.1.99.5) локализована на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий [75]. Это FAD-содержащий белок, катализирующий окисление цитоплазматического глицерол-3-фосфата убихиноном. Вместе с цитоплазматической ГФДГ 1 типа мГФДГ участвует в так называемом глицерофосфатном челночном пути, обеспечивающим перенос восстановительных эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии. Митохондриальный фермент широко распространен, но количество фермента и его активности в разных тканях сильно различаются. К тканям, обладающим высокой активностью мГФДГ, прежде всего, относят бурый жир, плаценту, островки Лангерганса поджелудочной железы, семенники, скелетные мышцы II типа и мозг. В митохондриях сердца, печени и почек активность фермента невелика [76, 77]. Так, например, соотношение активностей мГФДГ и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердца составляет всего 1/15 [76]. В тканях с невысоким содержанием мГФДГ количество фермента резко повышается под действием тиреоидных гормонов [78]. Атомная структура мГФДГ неизвестна, однако сравнение κ ДНК ферментов бактерий, дрожжей и высших эукариот показывает высокую гомологичность их первичных последовательностей [79]. Трехмерная структура, установленная для ГФДГ 2 типа из *E. coli* [80], представлена димером, в котором два мономера связаны между собой, образуя так называемый «кэп», ориентированный в цитоплазму бактерии. Предполагают, что «кэп» изолирует активные центры фермента, в которых происходит дегидрирование субстрата и восстановление молекулы FAD, от окружающей водной среды. Каждый из мономеров представлен двумя доменами: гидрофильным (участвующим в образовании «кэпа», C-концевая часть белка) и N-концевым FAD-связывающим доменом. В «основании» белка на месте границы фермента и мембраны находится область, сформированная положительно-заряженными аминокислотными остатками. Считают, что наличие такой области в ферменте обеспечивает его связь с отрицательно-заряженными головками фосфолипидов плазматической мембраны бактерий. В структуре фермента не обнаружены участки, способные формировать трансмембранные спирали, поэтому считают, что мГФДГ связывается поверхностью фосфолипидного бислоя [80]. В последовательности мГФДГ обнаружен EF-мотив [79], и это находится в полном соответствии с тем, что активность фермента стимулируется ионами Ca^{2+}

(снижение величины K_m для α -глицерофосфата) [75]. Митохондрии сердца образуют АФК при сопряженном (состояние 4) окислении α -глицерофосфата со скоростью всего лишь 3 пмоль/мин на мг белка митохондрий (для сравнения: скорость генерации при окислении сукцината в этих же условиях составляет около 260 пмоль/мин на мг) [76]. Повышение скорости генерации происходит только в специальных условиях *in vitro*, вряд ли реализующихся *in vivo*, например, при добавлении в среду измерения ингибиторов комплекса III антимицина А или миксотиазола. При окислении митохондриями α -глицерофосфата в присутствии антимицина А перекись водорода (регистрируемая в этих экспериментах форма АФК) может быть образована в нескольких участках дыхательной цепи: при участии самой дегидрогеназы, а также комплексов II и III, которые восстанавливаются образующимся QH_2 [76, 77], а на долю самой мГФДГ приходится не более 6% [77]. Редокс-компонент мГФДГ, генерирующий супероксид, предшественник перекиси водорода в митохондриях, неизвестен. Предполагается, что источник генерации – восстановленный убихинон или связанный с ферментом убисемихинон [40, 77]. На участие убисемихинона в образовании супероксида косвенно указывает и то, что одноэлектронный акцептор феррицианид сильно активирует способность мГФДГ к генерации АФК [81].

NAD(P)H-ОКСИДАЗА (NOX4)

NAD(P)H-оксидазы семейства NOX (МКФ 1.6.3-) – пожалуй единственная группа ферментов, для которых продукция АФК – главная функция. Это мембраносвязанные ферменты, которые переносят электроны от NAD(P)H на молекулярный кислород с образованием супероксида. Наиболее хорошо изучена NAD(P)H-оксидаза фагоцитов (NOX2), ответственная за так называемый «дыхательный взрыв» [60]. Атомная структура ни для одного представителя семейства NOX в настоящее время неизвестна. Секвенирование, анализ профиля гидрофобности и иммунологический анализ свидетельствуют о том, что все NAD(P)H-оксидазы семейства NOX имеют сходную структуру. Это интегральные белки мембран, содержащие 6 трансмембранных спиралей и 5 петель, локализованных в водной фазе (три петли с одной стороны мембраны и две – с другой стороны) [60]. В С-концевом участке находятся NAD(P)H- и FAD-связывающие центры. Трансмембранные спирали связывают молекулы гема *b*. Внутримолекулярный перенос двух электронов протекает в следующей последовательности: $NAD(P)H \rightarrow FAD \rightarrow \text{гем } b \rightarrow \text{гем } b \rightarrow \text{молекула } O_2$. В результате

происходит трансмембранный перенос электронов, и образуются две молекулы супероксид-радикала. Следует отметить, что супероксид-радикал – истинный, а не побочный (как в случае множества других оксидоредуктаз) продукт реакции, катализируемой NOX. Митохондрии содержат изофермент NOX4, для активности которого необходим лишь один дополнительный мембранный белок p22, с которым NOX4 образует комплекс, тогда как для других типов NOX кроме того требуются и цитоплазматические белки [60, 82]. Другое отличие состоит в том, что NOX4 – единственный представитель этого семейства, который образует не супероксид-радикал, а перекись водорода, несмотря на то, что молекула кислорода восстанавливается при участии одноэлектронного переносчика (гема *b*). Это уникальное свойство NOX4 связано с присутствием остатка гистидина в E-петле фермента, которому приписывают протон-донорную функцию в реакции дисмутации супероксид-радикалов [83]. Исходно NOX4 была обнаружена в почках, а фермент получил название Renox [84]; впоследствии было показано, что NOX4 присутствует и в кардиомиоцитах, где она обнаруживается во фракции митохондрий [85, 86]. Точная локализация и ориентация NOX4 в мембранах митохондрий неизвестна [87].

Функции NOX4 в сердце мало изучены. Известно, что экспрессия этого фермента в сердце повышается при старении, а также при гипертрофии сердечной мышцы [85]. Повышение активности NOX4 коррелирует с уровнем окисления сульфгидрильных групп некоторых митохондриальных белков (например, аконитазы, цитратсинтазы и некоторых субъединиц комплекса I), что, по мнению авторов, является причиной функциональных нарушений в митохондриях, приводящих к гибели клеток [85, 86].

МОНОАМИНООКСИДАЗА

Моноаминооксидаза (МАО, МКФ 1.4.3.4) – FAD-содержащий фермент, регулирующий содержание нейротрансмиттеров и защищающий организм от повреждающего действия аминов. МАО локализована на наружных мембранах митохондрий в виде димера, образующегося при взаимодействии гидрофобных трансмембранных спиралей [61, 88–90]. Фермент представлен двумя гомологичными изоформами (МАО-А и МАО-В), которые отличаются по субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. Предпочтительные субстраты для МАО-А – норадреналин и серотонин, тогда как МАО-В наиболее активна с фенилэтиламином и бензиламином; обе изоформы с одинаковыми скоростями дезаминируют допамин, тирамин, адре-

налин и триптамин [61, 89, 90]. Также, как и для NOX4, перекись водорода – естественный продукт фермента, а не побочное образование АФК. Единственный редокс-компонент в MAO – молекула FAD, присоединенная к полипептидной цепи ковалентной связью с остатком цистеина [91]. Фермент широко распространен и обнаружен в нервной ткани, сердце, легких, печени, кишечнике, почках, кровеносных сосудах и др. [92]. В кардиомиоцитах в основном представлена изоформа MAO-A [92]. Продукты реакции (перекись водорода, альдегиды и ионы аммония) небезопасны для клетки. При повышенной экспрессии фермента или его активации развиваются различные патологии. Некоторые авторы отводят MAO ведущую роль в развитии окислительного стресса и возникновении тяжелых повреждений не только нервной системы, но и сердца. Показано, например, что изоформа MAO-A играет важную роль в повреждении миокарда, вызываемых постишемической реперфузией [93]. Во время ишемии в сердце накапливается серотонин, а при реперфузии, когда в сердце начинает поступать кислород, MAO становится мощным продуцентом перекиси водорода. В результате происходит перекисное окисление липидов, нарушается структура митохондрий и индуцируется апоптотическая гибель клеток. Ингибиторы MAO оказывают кардиопротекторное действие и не только снижают продукцию перекиси водорода, но и предотвращают ультраструктурные нарушения, включающие гиперсокращение миофибрилл, интерстициальный отёк и набухание митохондрий [94]. Обработка серотонином культуры кардиомиоцитов [94] вызывала значительное снижение уровня восстановленности глутатиона и повышение продукции перекиси водорода. Это сопровождалось значительным повышением экспрессии проапоптотических белков (BAX), уменьшением экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, нарушением структуры митохондрий и выходом цитохрома *c* в цитоплазму клеток. Ингибиторы MAO-A защищали кардиомиоциты от таких повреждений [94]. Еще одним указанием на то, что окислительный стресс миокарда связан с функционированием MAO, служит повышение экспрессии MAO-A при старении, коррелирующее с увеличением продукции перекиси водорода и чувствительное к специфическим ингибиторам фермента [95].

АЦИЛ-СОА ДЕГИДРОГЕНАЗА, ЭЛЕКТРОНПЕРЕНОСЯЩИЙ
ФЛАВОПРОТЕИН И ЕГО ДЕГИДРОГЕНАЗА

Электронпереносящий флавопротеин (ЭПФ), впервые обнаруженный Крейном и Байнертом [96], – естественный акцептор электронов от девяти различных митохондриальных FAD-содержащих ацил-СоА-дегидрогеназ [62, 97]. Это гетеродимер, содержащий одну молекулу FAD, расположенную во впадине между α - и β -субъединицами [98]. Для окисления восстановленных ацил-СоА-дегидрогеназ требуется 2 эквивалента флавопротеина, так как FAD, входящий в состав ЭПФ, в каталитическом цикле, по-видимому, принимает только один электрон [99]. Восстановленный ЭПФ, в свою очередь, передает электрон ЭПФ:убихинон-оксидоредуктазе (МКФ 1.5.5.1) [100]. Как следует из названия, этот фермент функционально связан с дыхательной цепью через убихинон. Он представлен единственной субъединицей и расположен на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий. В составе ЭПФ:убихинон-оксидоредуктазы обнаружены одна молекула FAD и железо-серный центр [4Fe-4S], которые в восстановленном ферменте принимают по одному электрону [62, 101]. При окислении пальмитоилкарнитина (проникающая форма пальмитиновой кислоты) интактными митохондриями скелетных мышц, сердца, а также бурого жира происходит образование супероксид-радикала [46, 102, 103], однако какие ферменты принимают участие в этом процессе до сих пор не выяснено. В обсуждаемых схемах источниками супероксида при окислении жирных кислот считают комплекс III, ЭПФ и ЭПФ:убихинон-оксидоредуктазу и, в меньшей степени, комплекс I [46, 102, 104]. Не исключено, что в генерации АФК могут принимать участие и сами ацил-СоА-дегидрогеназы [103], которые в восстановленной форме в отсутствие лигандов в активном центре достаточно быстро восстанавливают кислород до перекиси водорода [105].

ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС I

Митохондриальная протон-транслоцирующая NADH:убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I, первый пункт энергетического сопряжения, МКФ 1.6.99.3) и ее функциональный гомолог, NADH-дегидрогеназа 1-го типа плазматической мембраны бактерий катализируют окисление NADH убихиноном, сопряжённое с трансмембранным переносом четырех протонов при окислении одной молекулы NADH и генерацией на сопрягающей мембране митохондрий разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu$). NADH:убихинон-оксидоредуктазная реакция полностью обратима,

если убихинон восстановлен какой-либо другой дегидрогеназой дыхательной цепи (например, сукцинатдегидрогеназой или мГФДГ), а сопрягающая мембрана энергизована. Потенциал-зависимый обратный перенос электронов в комплексе I в отсутствие NAD^+ приводит к восстановлению кофакторов фермента и в аэробных условиях сопровождается генерацией АФК.

Комплекс I – чрезвычайно сложен: в митохондриях млекопитающих фермент построен, по крайней мере, из 44 различных субъединиц (мол. масса фермента составляет ~980 кДа) [106, 107], в митохондриях гриба *Yarrowia lipolytica* – из 42 субъединиц (~947 кДа) [108, 109], а бактериальный гомолог фермента содержит всего 13–15 субъединиц (~550 кДа), гомологичных набору субъединиц комплекса I эукариот, считающемуся минимальным набором субъединиц, способным катализировать NADH :убихинон-редуктазную реакцию [110, 111]. Ферменты из различных источников содержат сходные редокс-компоненты: FMN [112], 8–9 железо-серных кластеров [113–116] и прочно-связанный убихинон [117]. Функциональная роль дополнительных субъединиц фермента эукариот неизвестна.

Комплекс I из различных источников (см. рис. 3 А) имеет L-образную форму [111, 118–120]. Периферическая часть фермента (вертикальная часть L) выступает из мембраны примерно на 150 Å в матрикс митохондрий, а в случае фермента бактерий – в цитоплазму клетки. Она представлена относительно гидрофильными субъединицами. Центр связывания NADH и первичный акцептор электронов FMN локализованы в наиболее удаленной от мембраны части фермента и экспонированы в водную фазу окружающего матрикса. Все редокс-компоненты бактериального комплекса I *Thermus thermophilus* [120–122] или эукариотического комплекса I *Yarrowia lipolytica* [123] находятся вне мембраны (рис. 3 А). Железо-серные центры фермента (обозначены на рисунке буквой N с порядковым номером в соответствии с классификацией, предложенной Т. Ониши [124]) выстроены в цепочку, обеспечивающую перенос электронов от восстановленного флавина к убихинон-связывающему центру, локализованному на расстоянии около 25–30 Å от плоскости мембраны [119], в последовательности: $\text{NADH} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{N3} \rightarrow \text{N1b} \rightarrow \text{N4} \rightarrow \text{N5} \rightarrow \text{N6a} \rightarrow \text{N6b} \rightarrow \text{N2} \rightarrow \text{Q}$ [118, 120]. Центр N1a расположен в стороне от этого пути, но в непосредственной близости к флавину (около 13 Å) (рис. 3 А). В каталитическом цикле центр N1a может временно акцептировать электрон от FMN-радикала, возникающего при окислении восстановленного флавина одноэлектронным акцептором N3. После реокисления железо-серных центров убихиноном флавин передает этот электрон от N1a в цепочку железо-серных кластеров.

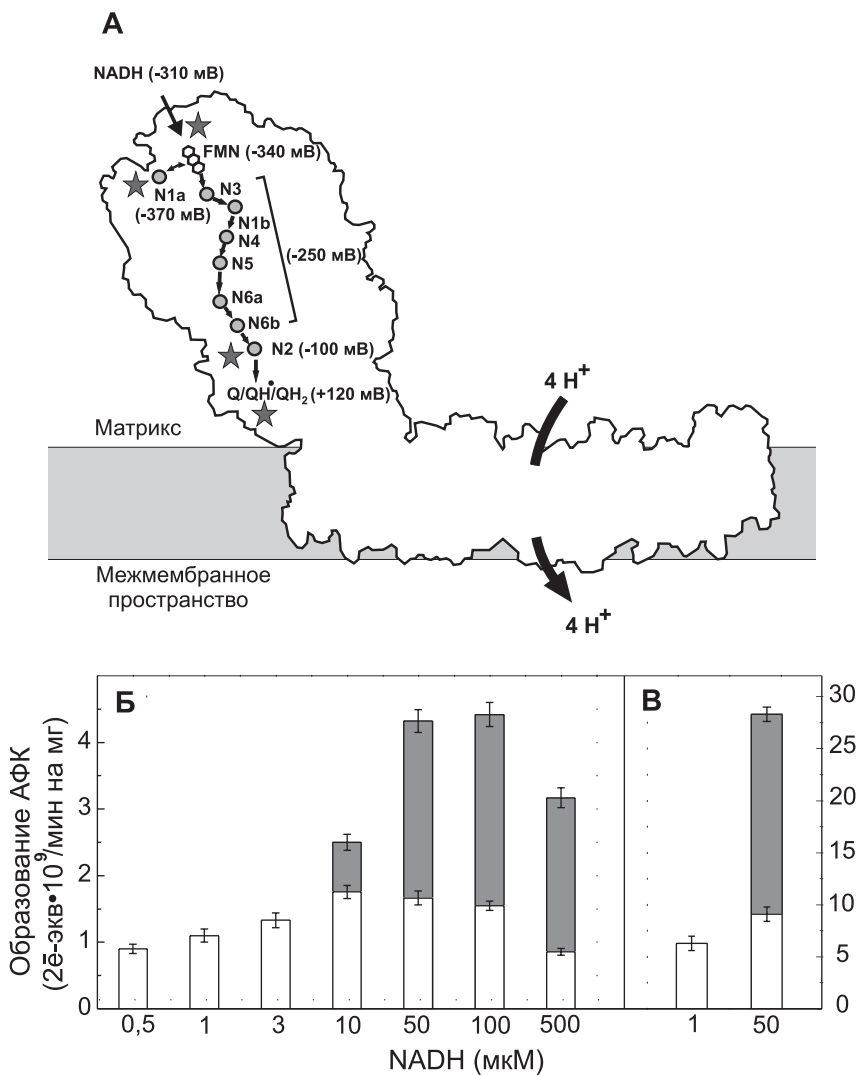


Рис. 3. Митохондриальный комплекс I.

А. Схема внутримолекулярного переноса электронов в комплексе. В скобках указаны редокс-потенциалы FMN и железо-серных кластеров, а также редокс-потенциалы пар NAD⁺/NADH и Q/QH₂ [118]. Звездочками показаны возможные участники генерации АФК.

Б и В. Соотношение супероксида (белые столбики) и перекиси водорода (серые столбики) в общей генерации АФК препаратом СМЧ (Б) и изолированным очищенным комплексом I (В).

По мнению Сазанова и соавт. [118] такой механизм препятствует образованию АФК при нормальном функционировании фермента. Считают, что мембраносвязанные субъединицы комплекса I, гомологичные Na^+/H^+ -антипортерам бактерий [125], обеспечивают трансмембранный перенос ионов водорода. Значительное удаление редокс-кофакторов фермента от мембраны позволяет предполагать конформационный механизм сопряжения окислительной реакции с векторным переносом протонов [126].

При контролируемом дыхании (состояние 4) СМЧ сердца быка, окисляя сукцинат или NADH (в оптимальной концентрации 50 мкМ), катализируют образование АФК со скоростью от 2–2,5 ($2\bar{e}$ экв· 10^9 /мин на мг белка)⁶, что составляет ~0,25% от скорости поглощения кислорода цитохромоксидазой дыхательной цепи [127]. При этом основная часть АФК (85%) производится комплексом I, а остальные 15% приходятся на долю комплексов II и III [127]. Мембраносвязанный комплекс I способен продуцировать АФК в различных условиях: 1) в реакции энерго-зависимого обратного переноса электронов; 2) в нормальной NADH-оксидазной реакции, когда восстанавливаемый комплексом I убихинол окисляется дыхательной цепью, генерируя $\Delta\mu$; и 3) при окислении NADH в присутствии ингибиторов дыхательной цепи (ротенон, пирицидин, антимицин А и др.) [7, 9, 49, 51, 52, 127–130]. Считалось, что комплекс I катализирует образование только супероксид-радикала, предшественника перекиси водорода [55]. Такое представление согласуется с недавними результатами Хирст и соавт., согласно которым при окислении NADH (очень низкие концентрации) изолированным комплексом I сердца быка ~90% электронов идет на образование супероксид-радикала и менее 10% – на образование перекиси водорода [131]. Для очищенного фермента *Escherichia coli* на долю H_2O_2 приходится 80% окисленного NADH [132]. Недавно мы показали, что комплекс I в составе СМЧ, а также в изолированном виде способен к генерации как супероксида, так и H_2O_2 (рис. 3 Б) [127, 133]. Скорость образования АФК и пропорциональный вклад супероксида и перекиси водорода в общую генерацию зависит от используемых препаратов (интактные митохондрии, СМЧ, изолированные ферменты) и условий измерения (концентрации субстратов, ионный состав и pH среды) (рис. 3 Б).

⁶ $2\bar{e}$ эквивалента соответствуют количеству NADH (двухэлектронный донор), окисленному при образовании АФК. Этот способ выражения учитывает, что при образовании перекиси водорода или супероксида происходит двух- или одноэлектронное восстановление O_2 , соответственно.

Образование АФК интактными митохондриями или сопряженными СМЧ при обратном переносе электронов зависит от степени энергизации митохондриальной мембраны, оно тормозится при добавлении ADP (переход в состояние 3) и крайне чувствительно к действию разобщителей [7, 9, 49, 51, 127–129]. Коэффициент дыхательного контроля СМЧ строго коррелирует со скоростью аэробного сукцинат-зависимого обратного переноса электронов [134]. Повышение степени сопряженности СМЧ увеличивает скорость образования АФК комплексом I, при этом доля перекиси водорода в общей генерации также повышается (35% и 60% при коэффициентах дыхательного контроля 4,5 и 8,0, соответственно) [127]. При окислении NADH скорость образования АФК и доля перекиси водорода в суммарном продукте в меньшей степени зависят от энергизации мембран [127–129]. В присутствии различных ингибиторов дыхания продукция супероксида и перекиси водорода повышается более чем в 2 раза, что указывает на решающее значение уровня восстановленности редокс-компонентов комплекса I, реагирующих с кислородом, а не энергизации мембраны [50, 51, 127, 129].

Образование супероксид-радикала и перекиси водорода по-разному зависят от концентрации NADH. При увеличении концентрации NADH генерация супероксида повышается, достигает максимума при 10–50 мкМ, а затем снижается при миллимолярных концентрациях субстрата [127, 129]. K_m^{NADH} , определенная по начальной восходящей части кривой, составляет около 0,5 мкМ [127]. Кажущаяся константа K_m для субстрата-донора в реакции, катализируемой какой-либо оксидоредуктазой, содержащей несколько редокс-компонентов, последовательно переносящих электроны к акцептору, зависит от разницы окислительно-восстановительных потенциалов между первичным акцептором электронов (в комплексе I это FMN) и компонентом, реагирующим с акцептором электронов. Чем больше эта разница, тем меньше величина K_m [135]. Чрезвычайно низкое значение K_m^{NADH} при образовании супероксида [127, 131] указывает на участие в реакции с кислородом компонента со значительно более положительным потенциалом, чем FMN. На роль такого компонента может претендовать один из железо-серных центров комплекса I, в частности, кластер N2, имеющий самый положительный потенциал полувосстановления (~ -100 мВ). Этот кластер расположен в непосредственной близости к центру связывания убихинона, который, как уже было сказано, находится в основании воронкообразной полости на расстоянии 25–30 Å от плоскости мембраны [119]. Все остальные железо-серные центры фермента хорошо «изолированы»

от окружающей среды, так как известные на сегодняшний день ингибиторы комплекса I действуют либо на «входе» фермента (это конкурентные ингибиторы NADH-связывающего центра NADH-ОН [136, 137] и ADP-рибоза [138], а также дифенилениодоний [139, 140], необратимо связывающийся с восстановленной формой FMN), либо на «выходе» (многочисленные ингибиторы Q-связывающего центра [141–143]).

Зависимость скорости образования перекиси водорода от NADH иная: в области низких концентраций (до 3 мкМ) H_2O_2 не образуется вовсе, и ее продукция увеличивается и достигает постоянного значения в широком диапазоне концентраций NADH (до 1 мМ), составляя ~60% от общего количества образующихся АФК. Полумаксимальная скорость генерации перекиси наблюдается при более высоких (в 50 раз) по сравнению с генерацией супероксида концентрациях NADH (~25 мкМ)[127]. Таким образом, соотношение продуктов, образующихся при генерации АФК, зависит от концентрации NADH (рис. 3 Б) [127].

Генерация АФК комплексом I тормозится NAD^+ в микромолярных концентрациях [129]. Так как образование АФК составляет менее одного процента от числа оборотов фермента в «основной» NADH:убихинон-редуктазной реакции, можно считать, что в отсутствие любых акцепторов электронов кроме кислорода все редокс-компоненты комплекса I находятся в равновесии между собой и с парой $NAD^+/NADH$. Таким образом, в первом приближении зависимость скорости генерации от соотношения $NAD^+/NADH$ можно использовать для оценки потенциала полувосстановления компонентов фермента, участвующих в образовании АФК. По данным разных авторов величины соотношения $(NAD^+/NADH)_{0,5}$, при которых наблюдается полумаксимальная скорость генерации, сильно разнятся и составляют от 0,01 до 7 [52, 131, 144–146] (см. также таблицу 2 в работе [146]). Причины таких различий могут объясняться использованием различных препаратов. В интактных митохондриях, например, помимо дыхательной цепи в генерации АФК принимают участие и другие ферменты, также находящиеся в равновесии с парой $NAD^+/NADH$ (Е3-компоненты α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (α -КГДГК) и ПДГК [35], см. ниже). Кроме того, уравнивание комплекса I в составе СМЧ в присутствии ротенона парой $NAD^+/NADH$ нельзя рассматривать как истинное редокс-титрование, так как величина $(NAD^+/NADH)_{0,5}$ зависит от суммарной концентрации пиридиннуклеотидов: она снижается от 0,2 до 0,05 при повышении концентрации от 50 до 500 мкМ, соответственно [146]. В интакт-

ных митохондриях можно ожидать еще более низкого значения $(\text{NAD}^+/\text{NADH})_{0,5}$, так как концентрация пиридиннуклеотидов в матриксе составляет примерно 4–7 мМ. Действительно, по данным Кушнаревой и соавт. при уравнивании пиридиннуклеотидов матрикса митохондрий сердца парой ацетоацетат/ β -оксибутират величина $(\text{NAD}^+/\text{NADH})_{0,5}$ составляет 0,01 [144]. При титровании АФК-генерирующей активности комплекса I парой NAD^+/NADH следует учитывать вклад нескольких параметров: констант связывания NADH и NAD^+ с окисленными и восстановленными формами фермента, концентрацию нуклеотидов (степень насыщения активных центров фермента), природу субстрата-донора и окислительно-восстановительные потенциалы редокс-компонентов комплекса I. Показано, например, что скорость генерации супероксида в меньшей степени определяется величиной потенциала среды E_h , но зависит от природы субстрата-донора (NADH или ацетил- NADH). Полумаксимальная скорость генерации супероксид-радикала СМЧ сердца наблюдалась при приблизительно одинаковом соотношении пар: NAD^+/NADH и ацетил- $\text{NAD}^+/\text{ацетил-}\text{NADH}$, потенциалы которых отличаются примерно на 60 мВ [52].

Образование перекиси водорода и супероксид-радикала комплексом I по-разному зависит от соотношения пары NAD^+/NADH . При низкой концентрации нуклеотидов (50 мкМ), оптимальной для генерации обоих продуктов, зависимость скорости образования H_2O_2 удовлетворительно описывается уравнением Нернста для реакции двухэлектронного процесса с потенциалом полувосстановления -350 мВ (соотношение $(\text{NAD}^+/\text{NADH})_{0,5}$ равно 0,13) [127]. Это значение близко к потенциалу FMN в комплексе I (-370 мВ при pH 8,0 [147]). Аналогичная кривая для генерации супероксида не описывается уравнением Нернста, а полумаксимальная активность наблюдается при более высоком соотношении NAD^+/NADH (0,33) [127]. Генерация супероксида сохраняется даже тогда, когда доля окисленного NAD^+ составляет ~90% (потенциал среды -290 мВ). Эта величина существенно выше потенциала пары FMN/FMNH⁻ в комплексе I, что указывает на участие в генерации супероксида высокопотенциального редокс-компонента, возможно центра N2.

Скорости образования АФК митохондриями [43, 148], СМЧ [149] и изолированным комплексом I [131] линейно зависят от концентрации кислорода. Константа скорости первого порядка одно- или двухэлектронного восстановления кислорода скорее всего определяется его диффузией к редокс-компоненту (компонентам), участвующему в образовании АФК, через «каналы», возникающие в результате динамики белка.

По мнению Кушнаревой и соавт. центром генерации супероксида в комплексе I служит железо-серный кластер N1a [144], так как генерация в их опытах происходила только при высоком уровне восстановленности митохондриальных пиридиннуклеотидов. Редокс-титрование активности интактных митохондрий показало, что потенциал полувосстановления гипотетического генератора перекиси водорода в комплексе I составляет -392 мВ, что близко к потенциалу центра N1a (-370 мВ, [111, 150]). Эти результаты согласуются с предположением Сазанова об участии центра N1a в окислении/восстановлении пары FMN^{*}/FMN в каталитическом цикле (см. выше) [118].

Куссмаул и Хирст [131] измерили зависимость скорости генерации супероксида изолированным препаратом митохондриального комплекса I сердца быка от соотношения NAD⁺/NADH и обнаружили, что максимальная генерация супероксида происходила при потенциале ниже -400 мВ, а при потенциале выше -300 мВ генерация отсутствовала. В этих условиях все железо-серные кластеры, за исключением центра N1a, были восстановлены. Полученные этой группой результаты совпадали с теоретической кривой двух-электронного редокс титрования пары FMNH/FMN с потенциалом полувосстановления -360 мВ.

Галкин и Брандт применили, как может показаться, прямой подход к исключению железо-серного кластера N2 из потенциально возможного центров одноэлектронного восстановления кислорода комплексом I. Они показали, что мутантная форма изолированного комплекса I *Y. lipolytica* (R141M), не содержащая ЭПР-детектируемого кластера N2, генерирует супероксид в составе протеолипосом с той же скоростью (96%), что и исходная форма [151]. Следует, однако, отметить, что при оценке генерации супероксида авторы нормировали полученные величины на содержание мутантной и исходной форм в протеолипосомах, определенное как их NADH:искусственный акцептор-редуктазные активности. Аналогичное нормирование «естественных» хинон-редуктазных активностей обеих форм показывает, что «мутант» на 60% сохраняет способность восстанавливать *n*-децил-убихинон (см. табл. III в работе [151]). Авторы не приводят данные о чувствительности хинон-редуктазы мутанта к ротенону. Если она сохраняется, то их результаты показывают, что R141M-мутант катализирует «нормальную» хинон-редуктазную реакцию, протекание которой без участия функционально активного центра N2 крайне маловероятно. Таким образом, исключение кластера N2 из потенциальных центров генерации комплексом I *Y. lipolytica* на основании работы [151] представляется нам недостаточно аргументированным.

Измерив продукцию АФК комплексом I при прямом и обратном переносе электронов в интактных митохондриях скелетных мышц, Бранд и сотр. пришли к выводу о существовании двух источников генерации: флавина и связанного убисемихинона. В прямой реакции источник – флавин, уравновешенный парой $NAD^+/NADH$, а в обратной – связанный убисемихинон, уравновешенный парой Q/QH_2 [152]. Два центра образования супероксида в комплексе I также постулированы Ониши и сотр. [153]. По их мнению, генерация может происходить либо при участии FMN, либо убисемихинона. Оба генератора находятся в динамическом равновесии, а доля их участия в продукции АФК зависит от энергизации мембраны митохондрий и степени восстановленности убихинона.

Производство АФК комплексом I в интактных прочно сопряженных митохондриях в присутствии сукцината (т.е. за счет обратного переноса электронов) существенно (в 3–4 раза) выше, чем генерация в присутствии NAD^+ -зависимых субстратов окисления, измеренная в тех же условиях. Можно было бы считать это явление тривиальным, так как генерация сильно ингибируется высокими концентрациями $NADH$ (см. выше), а степень восстановленности пары $NAD^+/NADH$ избытком NAD^+ -зависимых субстратов *ожидаемо* выше, чем при окислении сукцината. Такая интерпретация, однако, не соответствует действительности: степень восстановленности $NAD^+/NADH$ при окислении сукцината сопряженными митохондриями различных тканей (в результате обратного переноса электронов) всегда существенно выше, чем та, что регистрируется при окислении NAD^+ -зависимых субстратов. Это явление до сих пор не получило удовлетворительного объяснения. В классических работах, посвященных обращению реакций окислительного фосфорилирования, Чанс и сотр. объяснили это явление «компарментализацией» внутримитохондриальных пиридиннуклеотидов [154]. Других подтверждений такой «компарментализации» нет. В многочисленных работах, посвященных генерации АФК интактными митохондриями, именно сукцинат чаще всего используют в качестве субстрата окисления. Следует подчеркнуть, что интактные сопряженные митохондрии, окисляющие экзогенный сукцинат, нельзя считать моделью, адекватно отражающей какое-либо мыслимое физиологическое состояние. Сукцинат, интермедиат цикла ди-, трикарбоновых кислот, образуется и потребляется в матриксе митохондрий, поставляя в дыхательную цепь только пятую долю восстановительных эквивалентов при полном окислении пирувата. Каких либо количественно значимых цитоплазматических источников сукцината при аэробном метаболизме млекопитающих не сущест-

вует (здесь мы оставляем в стороне такие мало значимые для общего потребления кислорода процессы, как α -кетоглутарат-зависимые пролингидроксилазы [155, 156] и обмен полуальдегида янтарной кислоты [157]). Сказанное не означает, что обратный перенос электронов, катализируемый комплексом I, не вносит вклада в восстановление внутримитохондриальных пиридиннуклеотидов. Убихинол образуется и в других сукцинат-независимых процессах: при дегидрировании электронпереносящего флавопротеина (β -окисление жирных кислот), а также при окислении α -глицерофосфата.

В этом разделе уместно обсудить и хорошо известный «всплеск» образования АФК в клетках при переходе от анаэробных к аэробным условиям (например, при ишемии органов с последующей реперфузией), обусловленный, в том числе, и митохондриями. Механизм этого явления остаётся непонятым. Одной из составляющих такого «всплеска» может быть генерация супероксида и перекиси водорода комплексом I. Неработающий комплекс I при температуре $> 30^{\circ}\text{C}$ переходит в так называемое деактивированное состояние (Д), когда перенос электронов от железо-серного центра N2 к убихинону блокирован. Переход в такое неактивное состояние может быть вызван либо отсутствием субстрата (NADH), либо отсутствием акцептора (окисленный убихинон) (см. работы [38, 158, 159] и обзоры [160, 161]). Такой переход комплекса I из активного состояния (А) в деактивированное (Д) был прослежен в ряду: изолированный комплекс I [158, 159], препараты внутренней мембраны митохондрий (СМЧ) [38], интактные митохондрии сердца [36] и, наконец, сокращающееся перфузируемое сердце [162]. Деактивированный комплекс I феноменологически эквивалентен ферменту, блокированному ротеноном. Как ротенон, так и деактивация стимулируют образование АФК. Переход Д-формы в активное состояние – медленный (по сравнению с числами оборотов фермента) процесс, который дополнительно ингибируется свободными жирными кислотами и ионами двухвалентных металлов [163–165]. Сказанное позволяет предположить следующий сценарий событий при переходе норма – ишемия – реперфузия. В исходном состоянии (норма) комплекс I генерирует АФК с некоторой скоростью. При ишемии генерация прекращается из-за отсутствия кислорода. При реперфузии (появление кислорода в обычных концентрациях) генерация АФК возрастает существенно выше исходного уровня: деактивированный комплекс не окисляется дыхательной цепью, но окисляется кислородом. Повышенный уровень генерации АФК сохранится до тех пор, пока комплекс I не превратится в активную форму. Деактивация сопровождается специфическим демаскированием Cys39

субъединицы ND3 [166], а специфическая модификация этого остатка полностью предотвращает переход фермента в активное состояние [167, 168]. Использование препаратов, *обратимо* модифицирующих Cys39, рассматривается как возможная фармакологическая защита от всплеска АФК при реперфузии [169]. Такая защита совсем недавно была показана с использованием митохондриально адресованного нитризирующего соединения [170].

КОМПЛЕКС II

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа, сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза, МКФ 1.3.99.1) локализован во внутренней мембране митохондрий. Фермент катализирует одну из реакций цикла трикарбоновых кислот и поставляет электроны в дыхательную цепь. Трехмерные структуры комплекса II и гомологичной ему фумаратредуктазы прокариот известны. Ферменты состоят из 4 субъединиц. Гидрофильную часть комплекса II, расположенную в митохондриальном матриксе, образуют субъединица SDHA, содержащая ковалентно связанный FAD, и субъединица SDHB, в составе которой обнаружены 3 железо-серных центра. Субъединицы SDHC и SDHD гидрофобны и целиком погружены в мембрану. Они формируют центр связывания гема *b* (функция которого в катализе неизвестна) и центр связывания убихинона [57, 171]. Генерация супероксид-радикала очищенным препаратом сукцинатдегидрогеназы митохондрий сердца, а также изолированным и реконструированным препаратами сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы была показана в работе Жанг и соавт. [172]. Месснер и Имлэй [173] измерили образование супероксида и перекиси водорода двумя гомологичными ферментами *Escherichia coli*: сукцинатдегидрогеназой и фумаратредуктазой, катализирующей восстановление фумарата менахинолом. Зависимость скорости образования АФК фумаратредуктазой от концентрации сукцината колоколообразна [173]. При низких концентрациях сукцината фумаратредуктаза в основном генерирует супероксид, а при повышении концентрации сукцината – H_2O_2 . Это позволяет думать, что образование супероксида происходит тогда, когда флаavin может передать второй электрон расположенному рядом с ним железо-серному центру [2Fe–2S]. Если же этот центр уже восстановлен (при повышении концентрации субстрата-донора), то второй электрон передается на предобразованный супероксид-радикал и образуется H_2O_2 . Сукцинатдегидрогеназа *E. coli* в отличие от своего гомолога генерирует только супероксид со скоростями, в 25 раз меньшими, чем фумаратредуктаза. Причина этих различий, по-видимому, обуслов-

лена различиями потенциалов их редокс-компонентов [171]. В сукцинатдегидрогеназе железо-серный кластер [3Fe-4S] и гем *b* имеют значительно более высокие потенциалы по сравнению с теми же компонентами в молекуле фумаратредуктазы. В противоположность этому, редокс-потенциалы FAD и расположенного рядом с ним железо-серного кластера [2Fe-2S] выше в молекуле фумаратредуктазы. Это приводит к различному распределению электронов между редокс-компонентами ферментов. По расчетам в стационарном состоянии в молекуле сукцинатдегидрогеназы наиболее сильно восстановлены терминальный железо-серный кластер [3Fe-4S], гем *b* и, в меньшей степени железосерный кластер [2Fe-2S], а уровень восстановленности FAD незначителен. В фумаратредуктазе распределение электронов иное: наиболее восстановлены FAD и железосерный кластер [2Fe-2S], тогда как уровень восстановленности железо-серного кластера [3Fe-4S] незначителен [171].

Недавно было показано, что митохондриальный комплекс II скелетных мышц крысы способен с относительно высокими скоростями генерировать супероксид и/или перекись водорода. Зависимость скорости образования АФК от концентрации сукцината имела колоколообразную форму и достигала максимальных значений при физиологических (~0,4 мМ) концентрациях сукцината [174]. Комплекс II также образует АФК при восстановлении убихинона α -глицерофосфатом в реакции, катализируемой мГФДГ [174]. Генерация АФК в сукцинат-зависимой реакции чувствительна к блокаде сукцинат-связывающего центра малонатом, а в обратной реакции – к малонату и атпенину, ингибитору Q-связывающего центра комплекса II. Считают, что источником генерации в комплексе II служит флавин [174]. Недавно появились указания на то, что генерация АФК при окислении сукцината в присутствии ротенона, которую ранее приписывали комплексу III, на самом деле происходит при участии комплекса II [175].

КОМПЛЕКС III

Митохондриальная убихинол:цитохром *c*-оксидоредуктаза (комплекс III, *b-c*₁ комплекс, второй пункт энергетического сопряжения, МКФ 1.10.2.2) катализирует окисление убихинола цитохромом *c*, сопряженное с трансмембранным переносом двух ионов водорода и запасанием энергии в виде $\Delta\mu$. У прокариот эту реакцию катализирует минимальный набор из трех субъединиц, представленный цитохромом *b*, цитохромом *c*₁ и железо-серным белком Риске [176, 177]. Митохондриальный комплекс III дополнительно содержит до 8 субъединиц, которые, по-видимому, выполняют структурную роль [178–181]. В

мембране фермент существует в виде гомодимера, связывающего только одну молекулу цитохрома c [178–181]. Сердцевина каждого мономера образована гидрофобным полипептидом, несущим два гема b : низкопотенциальный (b_L) и высокопотенциальный (b_H), расположенные вблизи наружной и внутренней поверхностей мембраны, соответственно. Цитохром c_1 и железо-серный кластер $[2Fe-2S]$ (белок Риске) закреплены с помощью трансмембранных спиралей, а периферические домены этих белков локализованы в межмембранном пространстве. Белок Риске обеспечивает перекрестную связь между мономерами, так как его трансмембранная часть связана с одним мономером, а периферическая часть – с другим [58]. Кроме того, белок Риске обладает конформационной подвижностью и занимает как минимум три дискретных положения, в которых его железо-серный кластер расположен вблизи гема c_1 (c_1 -положение) или вблизи гема b_L (b_L -положение), или в промежуточном положении [179, 180, 182].

Механизм реакции, катализируемой комплексом III (протондвижущий Q-цикл), впервые был сформулирован П. Митчеллом [183, 184]. В современном виде полный Q-цикл, состоящий из двух полу-реакций, схематично представлен на рисунке 4. На первой стадии реакции происходит окисление убихинола в центре Q_o , сопровождающееся разветвлением путей переноса двух электронов: один электрон восстанавливает железо-серный кластер белка Риске (реакция 1), а другой электрон переносится на гем b_L (реакция 2). Окисление убихинола приводит к высвобождению двух протонов в межмембранное пространство. Электрон с железо-серного кластера последовательно переносится на цитохром c_1 и c (конечный акцептор) (реакции 3 и 4, соответственно), а восстановленный гем b_L передает электрон гему b_H , расположенному на противоположной стороне мембраны (электрогенная стадия катализа) вблизи второго убихинон-связывающего центра Q_i (реакция 5). В центре Q_i происходит окисление гема b_H убихиноном и образование убисемихинона (реакция 6a). Обсуждают два возможных механизма разделения путей переноса электронов в центре Q_o [185]. Реакции 1 и 2 могут протекать последовательно; в этом случае образуется свободный радикал убисемихинона в центре Q_o [186]. Альтернативный механизм – синхронное окисление убихинола белком Риске и гемом b_L без образования убисемихинона [187–191]. Во второй полуреакции в центре Q_o окисляется убихинол, и повторяются реакции 1–5. Находящийся в центре Q_i убисемихинон восстанавливается гемом b_H (реакция 6b, сопровождающаяся захватом двух протонов из митохондриального матрикса). В конечном итоге происходит окисление одной молекулы

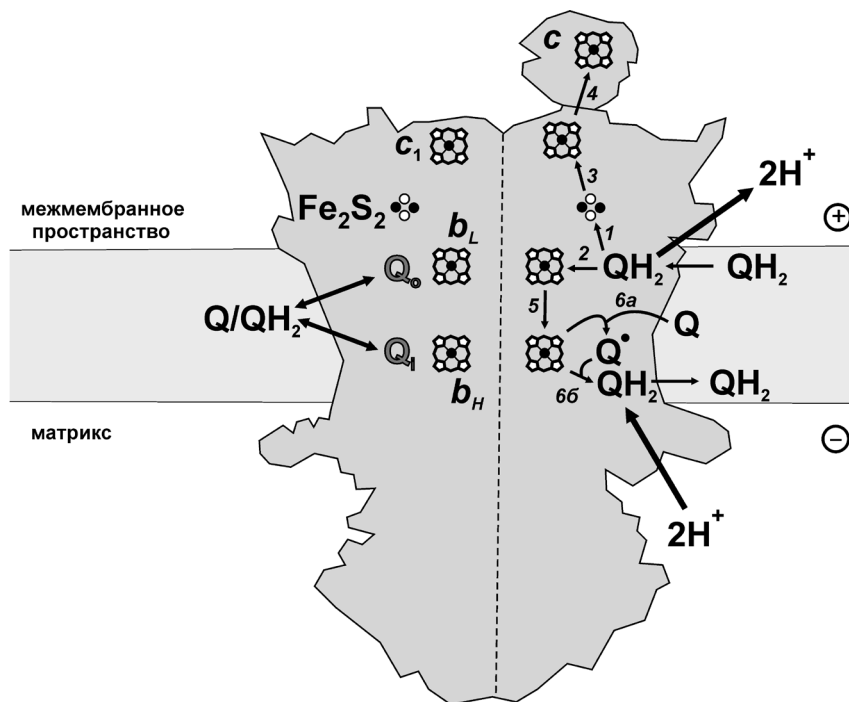


Рис. 4. Протондвижущий Q-цикл.

Гомодимер комплекса III расположен во внутренней мембране митохондрий (выделена светло-серым цветом). См. пояснения в тексте.

убихинола двумя цитохромами *c*, трансмембранный перенос двух протонов из матрикса в межмембранное пространство и выделение двух стехиометрических (скалярных) протонов, так как убихинол – донор атомов водорода, а цитохром *c* акцептирует только электроны.

Убихинол:цитохром *c*-редуктазная реакция полностью обратима [189], поэтому в комплексе III существуют специальные механизмы, предотвращающие протекание некоторых реакций Q-цикла в «нежелательном» направлении [190]. Обязательное раздвоение потоков электронов в центре Q_0 , необходимое для протон-транслоцирующей активности комплекса III, может достигаться запретом одновременного присутствия в центре Q_0 отрицательно заряженного убисемихинона и восстановленного гема b_L , а также перемещением каталитического домена железо-серного белка Риске из *b*-положения в положение c_1 [185, 192]. Другой возможный механизм, предотвращающий «утечки», – окисление убихинола в центре Q_0 .

только в том случае, когда железо-серный кластер белка Рискс и гем b_L находятся в окисленном состоянии, а восстановление убихинона в обратной реакции только в состоянии, когда оба редокс-компонента восстановлены [189, 190]. Трумпауэр и сотр. отводят важную роль в предотвращении «утечек» гомодимерной структуре комплекса III, функционирующей в соответствии с полуцентровым катализом (half-of-the-site-reactivity) [193–195].

Центром генерации супероксида в комплексе III считают убисемихинон, образующийся в центре Q_o [185, 196, 197]. Скорость образования супероксида комплексом III в отсутствие ингибиторов незначительна по сравнению, например, с генерацией супероксида комплексом I. Известно, что скорость генерации АФК комплексом III зависит от «интактности» белковой молекулы: образование АФК активируется при тепловой инактивации фермента или после обработки протеиназой К [198]. Скорость генерации супероксида сильно возрастает при блокировании переноса электронов нокаутом гена, кодирующего цитохром c_1 , и падает в результате мутаций комплекса III, приводящих к ограниченной конформационной подвижности железо-серного белка Рискс [199, 200]. Значительное повышение скорости генерации супероксида наблюдается и в присутствии антимицина и других ингибиторов переноса электронов в Q_i -центре [53]. Аналогичный эффект наблюдается и в отсутствие ингибиторов, если электрический потенциал на внутренней мембране митохондрий препятствует трансмембранному переносу электронов между гемами b_L и b_H [201]. Скорость генерации супероксида комплексом III зависит от редокс-состояния митохондриального убихинона. Показано, что образование супероксида максимально, если убихинол окислен на 25–30% [202]. Предполагается, что генерация супероксида в центре Q_o происходит при связывании окисленного убихинона и его восстановлении до убисемихинона в реакции *обратного переноса электронов* от гема b_L [185, 196, 202]. Эксперименты, проведенные на различных мутантных вариантах комплекса III *Rhodobacter capsulatus*, с последующим моделированием результатов также подтверждают, что генерация супероксида контролируется обратным переносом электронов от гема b_L на убихинон [199, 200].

Еще один механизм образования супероксида в комплексе III был предложен в лаборатории Юу [198, 203]. Убихинол:цитохром c оксидоредуктазная активность комплекса III *R. sphaeroides* снижается примерно вдвое в анаэробной среде, за счет уменьшения скорости восстановления гема b_L [203]. Авторы предположили, что в центре Q_o молекула кислорода акцептирует электрон от убихинола с

образованием протонированной формы супероксида, который служит донором электронов для гема b_L . В пользу этой гипотезы свидетельствует обнаружение места связывания ксенона, расположенного между убихинол-связывающим центром и гемом b_L комплекса III [203].

Комплекс III образует супероксид по обе стороны мембраны в равных долях [46, 204], что, на первый взгляд, противоречит предположению о генерации супероксида в центре Q_o , находящемся вблизи раздела мембранной фазы и водной среды межмембранного пространства. Мюллер и соавт. предполагают, что супероксид образуется в протонированной форме, которая покидает центр Q_o через гидрофобный канал, открывающийся в середине мембраны, откуда протонированный супероксид с равной вероятностью может поступать как в матрикс, так и в межмембранное пространство [204].

ДИГИДРОЛИПОАМИДДЕГИДРОГЕНАЗА

Дигидролипоамиддегидрогеназа (ДЛДГ, липоамиддегидрогеназа, липоамидредуктаза, диафораза Штрауба, E3, МКФ 1.8.1.4) принадлежит к обширному семейству флавин-, тиол-дисульфид-зависимых оксидоредуктаз, включающему глутатион-, тиоредоксин- и ртуть-редуктазы. Некоторые из белков этого семейства, в частности глутатионредуктазу, можно отнести к числу наиболее изученных белков, имеющих в учебниках биохимии в качестве иллюстраций механизмов действия ферментов [205]. С другой стороны, ДЛДГ относится к категории белков, работающих «по совместительству» (moonlighting protein). «Совместительство» ДЛДГ состоит в необычных активностях, таких как протеазная [206], хинон-редуктазная [207], ацилтрансферазная [208] и, наконец, недавно переоткрытая нами [209] аммоний-зависимая генерация перекиси водорода (см. ниже). ДЛДГ – FAD-содержащий компонент нескольких дегидрогеназ, катализирующих конечные стадии окислительного декарбоксилирования α -кетоглутарата, пирувата, кетокислот с разветвленной цепью [210, 211] и глицина [212]. Фермент катализирует образование NADH за счет окисления дигидролипоамида, ковалентно связанного с полипептидной цепью дигидролипоамидацилтрансфераз (E2-компоненты перечисленных выше комплексов). Гомологичные ДЛДГ широко распространены [213]. В матриксе митохондрий сердца ДЛДГ обнаружена не только в составе комплексов, но и в индивидуальном состоянии [214]. Удивительно, что этот фермент найден у некоторых организмов, в которых отсутствуют NAD⁺-зависимые дегидрогеназы α -кетокислот [215, 216].

Фермент – гомодимер с мол. массой 51 кДа. Активный центр каждого мономера представлен центром связывания пиридиннуклеотидов, молекулой FAD и в непосредственной близости к ней каталитически активным дисульфидом [213, 217]. Механизм реакции, катализируемый ДЛДГ, состоит в восстановлении дигидролипоамидом дисульфидной связи с последующим восстановлением FAD, который переносит гидрид-ион на окисленный NAD^+ [218, 219]. Эта реакция полностью обратима в отличие от суммарного окислительного декарбоксилирования, сопровождающегося необратимым окислением карбоксильной группы. Изолированная и очищенная ДЛДГ катализирует как восстановление NAD^+ дигидролипоамидом, так и восстановление липоамида восстановленным нуклеотидом с соизмеримыми числами оборотов.

Генерация митохондриальных АФК была установлена в опытах с интактными или пермеабелизованными митохондриями мозга, окисляющими α -кетоглутарат [220]. Очищенные препараты α -КГДГК и ПДГК сердца генерируют супероксид [221] и/или перекись водорода [220, 222, 223]. В пользу участия ДЛДГ в образовании АФК свидетельствуют эксперименты с использованием гетерозиготных мышей с нокаутным геном ДЛДГ ($\text{ДЛДГ}^{+/-}$) [220]. Генерация АФК митохондриями таких мышей при окислении α -кетоглутарата оказалась сниженной почти в 2 раза. Следует отметить, что при практически одинаковых скоростях окисления кетокилот очищенными препаратами α -КГДГК и ПДГК в присутствии NAD^+ скорость образования АФК комплексом, окисляющим α -кетоглутарат, примерно в 2 раза выше [220]. Генерация АФК изолированным препаратом α -КГДГК контролируется соотношением NAD^+/NADH , при снижении этого соотношения уменьшается скорость основной реакции (окисление кетокилоты и восстановление NAD^+), и активируется генерация перекиси водорода [223].

При окислении NADH пермеабелизованными митохондриями сердца около 50% перекиси водорода образуется в дыхательной цепи при участии комплекса I, а оставшиеся 50% приходятся на долю ДЛДГ [35]. Таким образом, оба фермента можно отнести к основным генераторам АФК в митохондриях. Генерация перекиси водорода митохондриальной ДЛДГ более чем в 5 раз стимулируется ионами аммония в миллимолярных концентрациях, и в этих условиях доля ДЛДГ в общей NADH-зависимой продукции АФК увеличивается до 90% [35]. Очищенные препараты ДЛДГ сердца быка и свиньи, а также рекомбинантный фермент сердца человека также катализируют NADH-зависимую аммоний-стимулируемую генерацию перекиси

водорода. Основная «физиологическая» NADH:липоамид-редуктазная активность фермента от ионов аммония не зависит [224]. Неизвестно, происходит ли такая активация *in vivo*. Можно ожидать, что при функционировании митохондриальных ферментов, образующих ионы аммония (глутаминаза, глутаматдегидрогеназа, АМР-дезаминаза и др.), скорость образования АФК возрастет. Не исключено, что токсичное и до сих пор малопонятное действие аммиака у млекопитающих может быть связано с повышением уровня АФК, образующихся при активации ДЛДГ.

В литературе обсуждается роль α -КГДГК при развитии окислительного стресса (см., например, обзоры [225–227]). Будучи источником супероксида и перекиси водорода в митохондриях, α -КГДГК сама может быть мишенью для повреждающего действия АФК [221]. Необратимая инактивация ими декарбоксилазного компонента α -КГДГК (Е1) приводит к уменьшению скорости образования NADH в митохондриях.

VI. О ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ АФК

Появление в атмосфере земли кислорода, с одной стороны, позволило многократно улучшить энергетику существования и эволюционного развития жизни, а, с другой стороны – привело к необходимости защиты от нежелательных окислительных реакций. В самом общем виде можно себе представить две стратегии компромиссного решения этой проблемы. Одна могла бы состоять в индивидуальной защите редокс компонентов многочисленных оксидоредуктаз (главным образом, флавинов и железо-серных центров) от кислорода путём специфической организации белкового окружения потенциально опасного реакционного центра (например, возникновение дополнительных субъединиц, не выполняющих никаких других функций, кроме как защиты от кислорода). Другой вариант – создание общей «системы безопасности» – специализированных ферментов, превращающих неизбежно возникающие АФК в воду. Похоже, что эволюция воспользовалась этим вторым путём. Многочисленные экспериментальные данные показывают, что почти все изученные флавопротеины и железо-серные белки, включая и те, которые заведомо не функционируют в качестве оксидаз, в той или иной степени реагируют с кислородом, генерируя либо супероксид, либо перекись водорода. Другими словами, защита их реакционноспособных

центров несовершенна. Это несовершенство компенсируется повсеместным существованием СОД и пероксидаз даже в таких органеллах, как митохондрии, где образование АФК в самых оптимальных для этого искусственных условиях составляет ничтожную долю от общего потребления ими кислорода. Выполняет ли митохондриальная генерация АФК физиологически значимые функции? В последние годы в литературе появилось множество работ, результаты которых рассматриваются как существование сигнальных каскадов реакций с участием перекиси водорода (см. обзор [12]). Под *сигнальными* молекулами, в отличие от других метаболитов, принято понимать такие, которые, связываясь с определенными *рецепторами*, *не подвергаются химическому превращению* этим рецептором, а вызывают изменение его (рецептора) свойств, приводящее к активации (или ингибированию) каких-либо путей обмена веществ. К таким молекулам относятся гормоны, вторичные мессенджеры (с-АМР, ионы Ca^{2+}) и многочисленные белковые «факторы». При расширительном и, на наш взгляд, неоправданном понимании термина «сигнальная молекула» любой метаболит можно считать «сигнальным». Следует отметить, что механизм участия перекиси водорода в сигнальных каскадах формулируется как тривиальное *неферментативное* окисление депротонированных тиоловых групп цистеиновых остатков в молекулах белков-мишеней, приводящее к изменению их каталитических или сигнальных функций. Существенным, на наш взгляд, недостатком таких схем, является отсутствие в них *специфических* пероксидаз, взаимодействующих с такими модифицированными белками-мишенями. Представляется логичным, что, если регуляторный каскад существует, то *все* его стадии должны быть ферментативно катализируемыми так, как это происходит при классическом каскадном регулировании, например, синтеза/распада гликогена (координированное действие протеинкиназ и протеинфосфатаз).

Другой аспект, заслуживающий краткого обсуждения возможных физиологически значимых функций генерации АФК митохондриями – её зависимость от концентрации кислорода. В отличие от цитохромоксидазной реакции, для которой кажущаяся K_m по кислороду существенно ниже его физиологически реальных концентраций (примерно в 5 раз меньших, чем в физиологическом растворе, насыщенном воздухом при нормальном давлении [228]), оба «главных» митохондриальных генератора (комплекс I [43, 131, 148, 149] и ДЛДГ [146]) продуцируют АФК со скоростями, прямо пропорциональными концентрации кислорода. Кинетика

суммарного образования перекиси водорода интактными митохондриями также имеет первый порядок по кислороду даже в гипероксических условиях [43]. С одной стороны, если рассматривать митохондриальную продукцию АФК как функционально значимую реакцию, следовало бы ожидать гиперболической или иной, более сложной её зависимости от концентрации кислорода. С другой стороны, прямая пропорциональность между скоростью образования АФК и концентрацией кислорода указывает на возможность генераторов, в частности, и митохондриальных, служить в качестве идеального сенсора его концентрации в тканях. Млекопитающие обладают чрезвычайно сложной высокоорганизованной системой, реагирующей на гипоксию [229, 230]. При этом, главный (количественно) потребитель кислорода – митохондриальная дыхательная цепь – функционирует как система, не реагирующая на изменение концентрации кислорода вплоть до ее очень низких значений. Как уже отмечалось, активность АФК-продуцирующих ферментов линейно зависит от концентрации кислорода. Можно думать, что именно эти ферменты могут претендовать на роль первичных сенсоров кислорода. Выполняют ли именно митохондрии такую «функцию» – открытый вопрос. Следует иметь в виду, что в тканях существует специальная кислород-сенсорная система: α -кетоглутарат-зависимая пролингидроксилазная реакция, участвующая в формировании так называемого HIF (Hypoxia-Induced Factor) [231, 232].

Достаточно распространенное в литературе мнение о том, что митохондрии – «главный» источник АФК связано, по-видимому, с тем, что количественно митохондрии – действительно главный потребитель кислорода в аэробных клетках. Так, например, Д. Харман писал: «можно ожидать, что митохондрии будут особенно подвержены изменениям, вызванным свободными радикалами, так как именно они утилизируют более 90% кислорода, потребляемого млекопитающими» [8]. Нам не кажется такая логика оправданной. Как уже было сказано выше, генерация супероксида и перекиси водорода митохондриями, их дыхательной цепью и ДЛДГ – реакции первого порядка, скорости которых линейно зависят от концентрации кислорода. Потребляя кислород и образуя воду в цитохромоксидазной реакции митохондрии должны снижать, а не увеличивать его локальную концентрацию в непосредственной близости от центров его одного или двухэлектронного восстановления, что приведёт к уменьшению потенциально возможного образования АФК. К сожалению, задача достоверного измерения концентрации кислорода в клетках тканей, а, тем более, его внутриклеточного распределения, в настоящее время

не решена и представляет чрезвычайно важную для общей биохимии и физиологии проблему.

Скорости образования АФК митохондриями, измеренные в «оптимальных» условиях, составляют только малые доли процента от величин суммарной «нормальной» оксидазной реакции (~ 5 нмоль \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ белка). Следует, однако, помнить, что 1 мг митохондриального белка соответствует примерно 1 мкл матричной воды [233, 234]. Если допустить, что внутренняя мембрана митохондрий не проницаема или плохо проницаема для перекиси водорода, то такая удельная активность за 1 минуту нормального дыхания приведёт в образованию в матрике 5 мМ перекиси водорода! Конечно, в такой оценке не учтено, что матрике содержит пероксидазы, каталазу, а мембрана проницаема (но не свободно, см. стр. 255) для перекиси. Тем не менее, не следует недооценивать возможных градиентов концентрации перекиси водорода между матриком митохондрий и окружающей средой. Вообще, при количественном сравнении интактных и контролируемо пермеабелизованных препаратов митохондрий [37] создаётся впечатление, что все главные активности митохондрий (окисление субстратов цикла Кребса и сопряжённый с ним синтез АТФ) контролируются специфическими переносчиками их внутренней мембраны.

Активность обоих «главных» генераторов АФК митохондрий – комплекса I и ДЛДГ сильно зависит от окислительно-восстановительного потенциала матрикса – отношения $NAD^+/NADH$ [146]. Реальные концентрации свободных нуклеотидов ($NAD^+ + NADH$) в матрике митохондрий неизвестны. Общее количество нуклеотидов ($NAD^+ + NADH$) в митохондриях сердца по данным разных авторов составляет ~ 4 – 7 нмоль/мг белка, что соответствует их концентрации ~ 4 – 7 мМ [235–240]. В первом приближении можно было бы считать, что нуклеотид-связывающие центры комплекса I и ДЛДГ полностью насыщены. Следует, однако иметь в виду, что в матрике митохондрий присутствует много белков-дегидрогеназ, использующих $NAD^+/NADH$ в качестве кофакторов и имеющих различные константы связывания нуклеотидов с их активными центрами. Таким образом, истинная концентрация свободных нуклеотидов в матрике – неизвестная величина и ее определение представляет отдельную важную задачу для понимания метаболизма митохондрий нерешённую задачу. Соотношение $NAD^+/NADH$ определяется функциональным состоянием митохондрий, что особенно наглядно прослежено в серии классических работ Чанса [154] и Клингенберга [238]. Физиологическое соотношение $NAD^+/NADH$ в митохондриях печени оценено равным

примерно 8 [239]. В изолированных дышащих на 10 мМ глюкозе кардиомиоцитах [241] и перфузируемом (10 мМ глюкоза) работающем сердце [242] это соотношение близко к 1. В обоих случаях кажущийся редокс-потенциал матрикса существенно выше того, что используют при определении генерации АФК в биологических опытах (оптимально низкие концентрации NADH или NADH в присутствии регенерирующей системы). По-видимому, можно считать, что генерация АФК митохондриями *in vivo* во много раз ниже, чем та, которая наблюдается в опытах, где образование АФК измеряется в оптимальных условиях. В связи с зависимостью генерации АФК митохондриями от уровня NAD⁺/NADH уместно сделать следующее замечание. В последние годы в литературе часто используется выражение: «зависящая от мембранного потенциала генерация АФК митохондриями» (*Δp*-dependent ROS-production»), подразумевающее: увеличение *Δp* увеличивает генерацию, а уменьшение – снижает продукцию АФК. Нам представляется, что такая формулировка может быть неверно понята читателем, поверхностно знакомым с митохондриальной биоэнергетикой. Генерация АФК зависит не от *Δp*, а от количества (концентрации) реагирующих с кислородом центров и их доступности для кислорода. Стационарное соотношение NADH/NAD⁺ конечно падает при активации дыхания либо ADP (малое снижение *Δp*), либо разобщителем (исчезновение *Δp*). Аналогичное явление происходит и для пары убисемихинон/убихинон (хинон в центре *o* комплекса III наиболее вероятный генератор супероксида этим комплексом). Важно, однако ясно понимать, что снижение «потенциала» само по себе не влияет на генерацию, а только уменьшает стационарную концентрацию доноров для одно- или двухэлектронного восстановления кислорода. Прямые опыты показывают, что прямой корреляции между энегизацией мембраны и генерацией АФК не существует: ингибиторы дыхания ротенон или антимицин не снижают, а сильно стимулируют митохондриальную продукцию АФК. Может показаться, что это замечание носит семантический характер, однако анализ литературы показывает, что применение выражения «потенциал-зависимая генерация АФК» искажает смысл наблюдаемых явлений. Нам представляется более подходящим использование выражения «редокс-зависимая генерация АФК».

Образование перекиси водорода (прямое или с участием супероксиддисмутаза) различными ферментами, в частности, и митохондриальными, не вызывает сомнений. Ферменты, участвующие в утилизации супероксида и перекиси, обычно считают системой «антиоксидантной защиты», а само образование АФК, за исключением

высокоспециализированных NAD(P)H-оксидаз с физиологически явно необходимой функцией, часто рассматривается как неизбежные утечки электронов с кофакторов многочисленных оксидоредуктаз (эволюционное несовершенство). Правомерна и другая точка зрения: перекись водорода – необходимый промежуточный продукт нормального метаболизма, выполняющий важные, пока недостаточно ясные, возможно сигнальные функции. Если рассматривать образование АФК как неизбежные вредные утечки, а пероксидазы, каталазы и пероксиредоксины как систему «антиоксидантной защиты», то многочисленные экспериментально более или менее обоснованные и совсем необоснованные попытки фармакологической помощи этой защите (антиоксидантные препараты, в частности, и митохондриально адресованные [243–245]) вполне оправданы. Если же перекись водорода – нормальный и физиологически важный метаболит, то избыточная «антиоксидантная защита» может привести к вредным последствиям.

Обсуждая физиологическое и патофизиологическое значение «окислительного стресса», не следует забывать о существовании и/или возникновении такого патологического состояния как «восстановительный стресс» [246, 247]. К достаточно очевидным последствиям такого стресса можно отнести: 1) аномальную активность биосинтезов, в частности, злокачественный рост тканей; 2) повышенный синтез жирных кислот и, как следствие, нейтрального жира; 3) нарушение транспорта аминокислот (γ -глутамильный цикл с участием глутатиона [246]); 4) снижение нормального уровня инсулина за счет активации инсулин-глутатионтрансгидрогеназной реакции [247, 248]. Еще одним следствием «восстановительного стресса» может оказаться, на первый взгляд, парадоксальная активация продукции АФК: как уже было отмечено, активность всех изученных на сегодняшний день АФК генераторов определяется соотношением $NAD^+/NADH$. Избыточное, по сравнению с нормальным, восстановление потенциальных доноров ($NADH$, убихинол) должно приводить к повышенной продукции АФК.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы описали феноменологические характеристики генерации АФК митохондриями и поделились своими соображениями, касающимися физиологической значимости этого процесса. Каковы, по нашему мнению, наиболее актуальные направления дальнейших исследований в этой области?

Получение надежной количественной информации о скоростях образования, распада и стационарных концентрациях АФК даже при использовании изолированных ферментов, не говоря уже о таких сложных системах как интактные митохондрии или клетки, сильно ограничено отсутствием простых методов их измерения. Аналитическая биохимия АФК – важное направление, требующее развития.

В связи со сформулированными в предыдущем разделе соображениями о «восстановительном» стрессе представляется целесообразный поиск новых генераторов АФК (новых, специализирующихся на этой функции, или работающих «по совместительству»). Можно ожидать, что, например, «классический» участник так называемой антиоксидантной защиты – глутатионредуктаза, также как ее близкий родственник ДЛДГ окажется редокс-зависимым генератором АФК при возникновении такого стресса.

Несмотря на огромное количество опубликованных работ, в которых явно или неявно предполагаются сигнальные функции АФК, прямых доказательств таких функций, сопоставимых по достоверности с таковыми, установленными для других сигнальных молекул (сАМР, ионы Ca^{2+} , NO), пока не получено. Надежные доказательства уже предполагаемых сигнальных функций АФК и поиск новых – другое важное направление будущих исследований в этой области.

Авторы признательны Т.В. Жаровой, А.В. Кареевой, Г.В. Гладышеву и Б.В. Черняку за внимательное прочтение обзора и сделанные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Холдейн Дж.С., Пристли Дж.Г. Дыхание. 1937, Москва – Ленинград: Государственное издательство биологической и медицинской литературы, с. 40.
2. Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O. (1954) *Science*, **119**, 623–626.
3. Harman, D. (1956) *J. Gerontol.*, **11**, 298–300.
4. Jensen, P.K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 157–166.
5. McCord, J.M., Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049–6055.
6. Keele, B.B., Jr., McCord, J.M., Fridovich, I. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176–6181.
7. Loschen, G., Flohé, L., Chance, B. (1971) *FEBS Lett.*, **18**, 261–264.
8. Harman, D. (1972) *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145–147.
9. Boveris, A., Oshino, N., Chance, B. (1972) *Biochem. J.*, **128**, 617–630.
10. Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T. (1973) *J. Clin. Invest.*, **52**, 741–744.
11. White, A.A., Crawford, K.M., Patt, C.S., Lad, P.J. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7304–7312.
12. Veal, E.A., Day, A.M., Morgan, B.A. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 1–14.
13. Santos, C.X., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C., Shah, A.M. (2011) *Free Radic. Biol. Med.*, **50**, 777–793.
14. Imlay, J.A. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 395–418.
15. Miller, A.F. (2012) *FEBS Lett.*, **586**, 585–595.
16. Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36027–36031.
17. Turrens, J.F. (2003) *J. Physiol.*, **15**, 335–344.
18. Staniek, K., Nohl, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 268–275.
19. Brown, G.C., Borutaite, V. (2012) *Mitochondrion*, **12**, 1–4.
20. George, P. (1965) The fitness of oxygen/Eds. King, T.E., Mason, H.S., and Morrison, M., New York, London, Sidney: John Wiley&Sons, Inc., pp. 3–36.
21. Paulus, A., Rossi, S.G., Dijk, M., de Vries, S. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830–8888.
22. Knowles, P.F., Gibson, J.F., Pick, F.M., Bray, R.C. (1969) *Biochem. J.*, **111**, 53–58.
23. Fridovich, I. (1974) Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.*, **41**, 35–97.
24. Clark, W.M. Oxidation-reduction potential of organic systems. 1960. Baltimore: The Williams&Wilkins Co., 583 p.
25. Sawyer, D.T., Nanni, E.J., Jr. (1981) Redox chemistry of dioxygen species and their chemical reactivity, in oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology/Eds. Rodgers, A.J. and Powers, E.L. New York, London, Sydney, San Francisco: Acad. Press, pp. 15–44.
26. Wood, P.M. (1988) *Biochem. J.*, **253**, 287–289.
27. Massey, V. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 22459–22462.
28. Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Jasaitis, A.A., Skulachev, V.P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 319–332.
29. Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., Zorov, D.B. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 481–495.
30. Bing, R.J., Siegel, A., Vitale, A., Balboni, F., Sparks, E., Taeschler, M., Klapper, M., Edwards, S. (1953) *Am. J. Med.*, **15**, 284–296.
31. Bing, R.J., Siegel, A., Ungar, I., Gilbert, M. (1954) *Am. J. Med.*, **16**, 504–515.
32. Chance, B., Williams, G.R. (1955) *J. Biol. Chem.*, **217**, 409–427.

33. Takahashi, M.A., Asada, K. (1983) Arch. Biochem. Biophys., **226**, 558–566.
34. Gus'kova, R.A., Ivanov, I.I., Kol'tover, V.K., Akhobadze, V.V., Rubin, A.B. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **778**, 579–585.
35. Grivennikova, V.G., Kareyeva, A.V., Vinogradov, A.D. (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1797**, 939–944
36. Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N., Vinogradov, A.D. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 9038–9044.
37. Gostimskaya, I.S., Grivennikova, V.G., Zharova, T.V., Bakeeva, L.E., Vinogradov, A.D. (2003) Anal. Biochem., **313**, 46–52.
38. Kotlyar, A.B., Vinogradov, A.D. (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1019**, 151–158.
39. Tarpey, M.M., Fridovich, I. (2001) Circ. Res., **89**, 224–236.
40. Miwa, S., Brand, M.D. (2005) Biochim. Biophys. Acta, **1709**, 214–219.
41. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Physiol. Rev., **59**, 527–605.
42. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P. (1997) Anal. Biochem., **253**, 162–168.
43. Boveris, A., Chance, B. (1973) Biochem. J., **134**, 707–716.
44. Tahara, E.B., Navarete, F.D., Kowaltowski, A.J. (2009) Free Radic. Biol. Med., **46**, 1283–1297.
45. Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., Kunz, T.H., Buffenstein, R., Brand, M.D. (2007) Aging Cell, **6**, 607–168.
46. St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roeback, S.J., Brand, M.D. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 44784–44790.
47. Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A. (1997) FEBS Lett., **416**, 15–18.
48. Chance, B., Williams, G.R. (1956) Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem., **17**, 65–134.
49. Hinkle, P.C., Butow, R.A., Racker, E., Chance, B. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 5169–5173.
50. Takeshige, K., Minakami, S. (1979) Biochem. J., **180**, 129–135.
51. Turrens, J.F., Boveris, A. (1980) Biochem. J., **191**, 421–427.
52. Krishnamoorthy, G., Hinkle, P.C. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 17566–17575.
53. Ksenzenko, M., Konstantinov, A.A., Khomutov, G.B., Tikhonov, A.N., Ruuge, E.K. (1983) FEBS Lett., **155**, 19–24.
54. Sun, J., Trumpower, B.L. (2003) Arch. Biochem. Biophys. 2003 Nov. 15;419(2):198–206.
55. Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Flohé, L. (1974) FEBS Lett., **42**, 68–72.
56. Brandt, U. (2006) Annu. Rev. Biochem., **75**, 69–92.
57. Cecchini, G. (2003) Annu. Rev. Biochem., **72**, 77–109.
58. Hunte, C., Solmaz, S., Palsdóttir, H., Wenz, T. (2008) Results Probl. Cell Differ., **45**, 253–278.
59. Carothers, D.J., Pons, G., Patel, M.S. (1989) Arch. Biochem. Biophys., **268**, 409–425.
60. Bedard, K., Krause, K.H. (2007) Physiol. Rev., **87**, 245–313.
61. Edmondson, D.E., Binda, C., Mattevi, A. (2004) Neurotoxicology, **25**, 63–72.
62. Watmough, N.J., Frerman, F.E. (2004) Biochim. Biophys. Acta, **1797**, 1910–1916.
63. Mráček, T., Drahotka, Z., Houštěk, J. (2013) Biochim. Biophys. Acta, **1827**, 401–410.
64. Evans, D.R., Guy, H.I. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 33035–33038.
65. Miller, R.W., Kerr, C.T., Curry, J.R. (1968) Can. J. Biochem., **46**, 1099–1106.
66. Kennedy, J. (1973) Arch. Biochem. Biophys., **157**, 369–373.

67. *Chen, J.J., Jones, M.E.* (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 82–90.
68. *Angermüller, S., Löffler, M.* (1995) *Histochem. Cell. Biol.*, **103**, 287–292.
69. *Löffler, M., Becker, C., Wegerle, E., Schuster, G.* (1996) *Histochem. Cell. Biol.*, **105**, 119–128.
70. *Rawls, J., Knecht, W., Diekert, K., Lill, R., Löffler, M.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2079–2087.
71. *Nørager, S., Jensen, K.F., Björnberg, O., Larsen, S.* (2002) *Structure*, **10**, 1211–1223.
72. *Forman, H.J., Kennedy, J.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4322–4326.
73. *Forman, H.J., Kennedy, J.* (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 219–224.
74. *Hail, N. Jr., Chen, P., Kepa, J.J., Bushman, L.R., Shearn, C.* (2010) *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 109–116.
75. *Klingenberg, M.* (1970) *Eur. J. Biochem.*, **13**, 247–252.
76. *Mráček, T., Pecinová, A., Vrbacký, M., Drahotka, Z., Houstek, J.* (2009) *Arch. Biochem. Biophys.*, **481**, 30–36.
77. *Orr, A.L., Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Brand, M.D.* (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 42921–42935.
78. *Dümmler, K., Müller, S., Seitz, H.J.* (1996) *Biochem. J.*, **317**, 913–918.
79. *Brown, L.J., MacDonald, M.J., Lehn, D.A., Moran, S.M.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 14363–14366.
80. *Yeh, J.I., Chinte, U., Du, S.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3280–3285.
81. *Drahotka, Z., Chowdhury, S.K., Floryk, D., Mráček, T., Wilhelm, J., Rauchová, H., Lenaz, G., Houstek, J.* (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**, 105–113.
82. *Chen, F., Haigh, S., Barman, S., Fulton, D.J.* (2012) *Front. Physiol.*, **3**, 1–12.
83. *Takac, I., Schröder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J.D., Shah, A.M., Morel, F., Brandes, R.P.* (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 13304–13313.
84. *Geiszt, M., Kopp, J.B., Várnai, P., Leto, T.L.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8010–8014.
85. *Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M.D., Sadoshima, J.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15565–15570.
86. *Ago, T., Kuroda, J., Pain, J., Fu, C., Li, H., Sadoshima, J.* (2010) *Circ. Res.*, **106**, 1253–1264.
87. *Maejima, Y., Kuroda, J., Matsushima, S., Ago, T., Sadoshima, J.* (2011) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **50**, 408–416.
88. *Schnaitman, C., Erwin, V.G., Greenawalt, J.W.* (1967) *J. Cell. Biol.*, **32**, 719–735.
89. *Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D.E., Mattevi, A.* (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 22–26.
90. *De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D.E., Mattevi, A.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12684–12689.
91. *Edmondson, D.E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A.K., Mattevi, A.* (2009) *Biochemistry*, **48**, 4220–4230.
92. *Sivasubramaniam, S.D., Finch, C.C., Rodriguez, M.J., Mahy, N., Billett, E.E.* (2003) *Cell. Tissue Res.*, **313**, 291–300.
93. *Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., Di Lisa, F., Paolucci, N.* (2011) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1813**, 1323–1332.
94. *Bianchi, P., Kunduzova, O., Masini, E., Cambon, C., Bani, D., Raimondi, L., Seguelas, M.H., Nistri, S., Colucci, W., Leducq, N., Parini, A.* (2005) *Circulation*, **112**, 3297–3305.
95. *Maurel, A., Hernandez, C., Kunduzova, O., Bompard, G., Cambon, C., Parini, A., Francés, B.* (2003) *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **284**, H1460–H1467.
96. *Crane, F.L., Beinert, H.* (1956) *J. Biol. Chem.*, **218**, 717–731.

97. Kim, J.J., Miura, R. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 483–493.
98. Roberts, D.L., Frerman, F.E., Kim, J.-J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14355–14360.
99. Ramsay, R.R., Steenkamp, D.J., Husain, M. (1987) *Biochem. J.*, **241**, 883–892.
100. Ruzicka, F.J., Beinert, H. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8440–8445.
101. Zhang, J., Frerman, F.E., Kim, J.-J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16212–16217.
102. Seifert, E.L., Estey, C., Xuan, J.Y., Harper, M.E. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 5748–5758.
103. Schönfeld, P., Wojtczak, L. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 410–418.
104. Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Chen, Q., Kerner, J., Kern, T.S., Hoppel, C.L. (2012) *Diabetes*, **61**, 2074–2083.
105. Wang, R., Thorpe, C. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7895–7901.
106. Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 32724–32727.
107. Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M.O., Enríquez, J.A. (2012) *Cell Metab.*, **16**, 378–386.
108. Morgner, N., Zickermann, V., Kerscher, S., Wittig, I., Abdrakhmanova, A., Barth, H.D., Brutschy, B., Brandt, U. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1384–1391.
109. Dröse, S., Krack, S., Sokolova, L., Zwicker, K., Barth, H.D., Morgner, N., Heide, H., Steger, M., Nübel, E., Zickermann, V., Kerscher, S., Brutschy, B., Radermacher, M., Brandt, U. (2011) *PLoS Biol.*, **9**, e1001128, 1–11.
110. Walker, J.E. (1992) *Q. Rev. Biophys.*, **25**, 253–324.
111. Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. (2003) *Biochemistry*, **42**, 2266–2274.
112. Rao, N.A., Felton, S.P., Huennekens, F.M., Mackler, B. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 449–455.
113. Ohnishi, T., Sled, V.D., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D.S., Vinogradov, A.D. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 301–308.
114. Sled, V.D., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., Meinhardt, S.W., Fukumori, Y., Calhoun, M.W., Gennis, R.B., Ohnishi, T. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 347–356.
115. Ohnishi, T., Salerno, J.C. (1982) *Iron-sulfur proteins*. Vol. IV / Ed. T. Spiro. N.Y.: Wiley Publishing Co. Inc., 285–327.
116. Beinert, H., Albracht, S.P.J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 245–277.
117. Vinogradov, A.D., Sled, V.D., Burbaev, D.S., Grivennikova, V.G., Moroz, I.A., Ohnishi, T. (1995) *FEBS Lett.*, **370**, 83–87.
118. Sazanov, L.A. (2007) *Biochemistry*, **46**, 2275–2288.
119. Efremov, R.G., Baradaran, R., Sazanov, L.A. (2010) *Nature*, **465**, 441–445.
120. Clason, T., Ruiz, T., Schägger, H., Peng, G., Zickermann, V., Brandt, U., Michel, H., Radermacher, M. (2010) *J. Struct. Biol.*, **169**, 81–88.
121. Sazanov, L.A., Hinchliffe, P. (2006) *Science*, **311**, 1430–1436.
122. Efremov, R.G., Sazanov, L.A. (2011) *Nature*, **476**, 414–420.
123. Hunte, C., Zickermann, V., Brandt, U. (2010) *Science*, **329**, 448–451.
124. Ohnishi, T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 475–490.
125. Mathiesen, C., Hägerhäll, C. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 121–132.
126. Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., Sazanov, L.A. (2013) *Nature*, **494**, 443–448.

127. Grivennikova, V.G., Vinogradov, A.D. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 446–454.
128. Votyakova, T.V., Reynolds, I.J. (2001) *J. Neurochem.*, **79**, 266–277.
129. Grivennikova, V.G., Vinogradov, A.D. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 553–561.
130. Kang, D., Narabayashi, H., Sata, T., Takeshige, K. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 1301–1306.
131. Kussmaul, L., Hirst, J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7607–7612.
132. Esterházy, D., King, M.S., Yakovlev, G., Hirst, J. (2008) *Biochemistry*, **47**, 3964–71.
133. Пепелина Т.Ю., Черткова Р.В., Островецкая Т.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2009) *Биохимия*, **74**, 768–778.
134. Grivennikova, V.G., Ushakova, A.V., Cecchini, G., Vinogradov, A.D. (2003) *FEBS Lett.*, **549**, 39–42.
135. Vinogradov, A.D. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 729–734.
136. Kotlyar, A.B., Karliner, J.S., Cecchini, G. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 4861–4866.
137. Grivennikova, V.G., Kotlyar, A.B., Karliner, J.S., Cecchini, G., Vinogradov, A.D. (2007) *Biochemistry*, **46**, 10971–10978.
138. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 256–264.
139. Ragan, C.I., Bloxham, D.P. (1977) *Biochem. J.*, **163**, 605–615.
140. Majander, A., Finel, M., Wikström, M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 21037–21042.
141. Degli Esposti, M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 222–235.
142. Miyoshi, H. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 236–244.
143. Okun, J.G., Lütmen, P., Brandt, U. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 2625–2630.
144. Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A. (2002) *Biochem. J.*, **368**, 545–553.
145. Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., Kunz, W.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 4127–4135.
146. Kareyeva, A.V., Grivennikova, V.G., Vinogradov, A.D. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1879–1885.
147. Sled, V.D., Rudnitzky, N.I., Hatefi, Y., Ohnishi, T. (1994) *Biochemistry*, **33**, 10069–10075.
148. Turrens, J.F., Freeman, B.A., Levitt, J.G., Crapo, J.D. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 401–410.
149. Виноградов А.Д., Гривенникова В.Г. (2005) *Биохимия*, **70**, 150–159.
150. Ohnishi, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 186–206.
151. Galkin, A., Brandt, U. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30129–30135.
152. Treberg, J.R., Quinlan, C.L., Brand, M.D. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 27103–27110.
153. Ohnishi, S.T., Shinzawa-Itōh, K., Ohta, K., Yoshikawa, S., Ohnishi, T. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1901–1909.
154. Chance B., Hollunger, G. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1555–1561.
155. Schofield, C.J., Zhang, Z. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 722–731.
156. Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzén, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Bartsch, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2001) *Cell*, **107**, 43–54.
157. Nguyen, E., Picklo, M.J. Sr. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1637**, 107–112.
158. Маклашина Е.О., Следь В. Д., Виноградов А.Д. (1994) *Биохимия*, 1994, **59**, 946–957.

159. *Маклашина Е.О., Виноградов А.Д.* (1994) *Биохимия*, 1994, **59**, 11, 1638–1645.
160. *Vinogradov, A.D.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 169–185.
161. *Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G.* (2001) *IUBMB Life*, **52**, 129–134.
162. *Maklashina, E.O., Sher, Y., Zhou, H.-Z., Gray, M.O., Karliner, J.S., Cecchini, G.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 6–12.
163. *Loskovich, M.V., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., Vinogradov, A.D.* (2005) *Biochem. J.*, **387**, 677–683.
164. *Kotlyar, A.B., Sled, V.D., Vinogradov, A.D.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 144–150.
165. *Калашиников Д.С., Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д.* (2011) *Биохимия*, **76**, 1185–1194.
166. *Galkin, A., Meyer, B., Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., Vinogradov, A., Brandt, U.* (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 20907–20913.
167. *Gavrikova, E.V., Vinogradov, A.D.* (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 36–40.
168. *Gostimskaya, I.S., Cecchini, G., Vinogradov, A.D.* (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1155–1161.
169. *Galkin, A., Moncada, S.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 37448–37453.
170. *Chouchani, E.T., Methner, C., Natchiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cochemé, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., Partridge, L., Fearnley, I.M., Robinson, A.J., Hartley, R.C., Smith, R.A., Krieg, T., Brookes, P.S., Murphy, M.P.* (2013) *Nat. Med.*, **19**, 753–759.
171. *Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S.* (2003) *Science*, **299**, 700–704.
172. *Zhang, L., Yu, L., Yu, C.A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33972–33976.
173. *Messner, K.R., Imlay, J.A.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 42563–42571.
174. *Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D.* (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 27255–27264.
175. *Moreno-Sánchez, R., Hernández-Esquivel, L., Rivero-Segura, N.A., Marín-Hernández, A., Neuzil, J., Ralph, S.J., Rodríguez-Enriquez, S.* (2013) *FEBS J.*, **280**, 927–938.
176. *Berry, E.A., Huang, L.S., Saechao, L.K., Pon, N.G., Valkova-Valchanova, M., Daldal, F.* (2004) *Photosynth. Res.*, **81**, 251–275.
177. *Kleinschroth, T., Castellani, M., Trinh, C.H., Morgner, N., Brutschy, B., Ludwig, B., Hunte, C.* (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1606–16015.
178. *Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J.* (1997) *Science*, **277**, 60–66.
179. *Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H.* (1998) *Nature*, **392**, 677–684.
180. *Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K.* (1998) *Science*, **281**, 64–71.
181. *Lange, C., Hunte, C.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2800–2805.
182. *Hunte, C., Palsdottir, H., Trumppower, B.L.* (2003) *FEBS Lett.*, **545**, 39–46.
183. *Mitchell, P.* (1975) *FEBS Lett.*, **56**, 1–6.
184. *Mitchell, P.* (1975) *FEBS Lett.*, **59**, 137–139.
185. *Dröse, S., Brandt, U.* (2012) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **748**, 145–169.
186. *Crofts AR.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 77–92.

187. Brandt, U., Trumpower, B. (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 165–197.
188. Trumpower, B.L. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 166–173.
189. Osyczka, A., Moser, C.C., Daldal, F., Dutton, P.L. (2004) *Nature*, **427**, 607–612.
190. Osyczka, A., Moser, C.C., Dutton, P.L. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 176–182.
191. Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S.R., Yu, L., Yu, C.A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4864–4869.
192. Brandt, U. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 261–268.
193. Covian, R., Trumpower, B.L. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1044–1052.
194. Covian, R., Trumpower, B.L. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1079–1091.
195. Castellani, M., Covian, R., Kleinschroth, T., Anderka, O., Ludwig, B., Trumpower, B.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 502–510.
196. Bleier, L., Dröse, S. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>.
197. Lanciano, P., Khalfaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., Ghelli, A., Rugolo, M., Daldal, F. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.03.009>.
198. Yin, Y., Yang, S., Yu, L., Yu, C.A. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 17038–17045.
199. Borek, A., Sarewicz, M., Osyczka, A. (2008) *Biochemistry*, **47**, 12365–12370.
200. Sarewicz, M., Borek, A., Cieluch, E., Swierczek, M., Osyczka, A. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1820–1827.
201. Rottenberg, H., Covian, R., Trumpower, B.L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 19203–19210.
202. Dröse, S., Brandt, U. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 21649–21654.
203. Zhou, F., Yin, Y., Su, T., Yu, L., Yu, C.A. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2103–2109.
204. Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 49064–49073.
205. Voet, D., Voet, J.G. (1990) *Biochemistry*. N.Y.: John Wiley&Sons, pp. 382–387.
206. Babady, N.E., Pang, Y.P., Elpeleg, O., Isaya, G. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6158–6163.
207. Xia, L., Bjornstedt, M., Nordman, T., Eriksson, L.C., Olsson, J.M. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1486–1490.
208. Tyagi, T.K., Ponnann, P., Singh, P., Bansal, S., Batra, A., Collin F., Guillonneau, F., Jore, D., Patkar, S.A., Saxena, R.K., Parnar, V.S., Rastogi, R.C., Raj, H.G. (2009) *Biochimie*, **91**, 868–875.
209. Kareyeva, A.V., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., Vinogradov, A.D. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 385–389.
210. Lester, J. Reed, L.G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 38329–38336.
211. Yeaman, S.J. (1989) *Biochem. J.*, **257**, 625–632.
212. Kikuchi, G. (1973) *Mol. Cell. Biochem.*, **1**, 169–187.
213. Chandrasekhar, K., Wang, J., Arjunan, P., Sax, M., Park, Y.H., Nemeria, N.S., Kumaran, S., Song, J., Jordan, F., Furey, W. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 15402–15417.
214. Kenney, W.C., Zakim, D., Hogue, P.K., Singer, T.P. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **28**, 253–260.
215. Danson, M.J., Eisenthal, R., Hall, S., Kessell, S.R., Williams, D.L. (1984) *Biochem. J.*, **218**, 811–818.
216. Danson, M.J., Conroy, K., McQuattie, A., Stevenson, K.J. (1987) *Biochem. J.*, **243**, 661–665.
217. Brautigam, C.A., Chuang, J.L., Tomchick, D.R., Machius, M., Chuang, D.T. (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**, 543–552.

218. *Matthews, R.G., Ballou, D.P., Thorpe, C., Williams, C.H. Jr.* (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 3199–3207.
219. *Ghisla, S., Massey, V.* (1989) *Eur. J. Biochem.*, **181**, 1–17.
220. *Starkov, A.A., Fiskum, G., Chino-poulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F.* (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 7779–7788.
221. *Bunik, V.I., Sievers, C.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5004–5015.
222. *Huennekens, F.M., Basford, R.E., Gabrio, B.W.* (1955) *J. Biol. Chem.*, **213**, 951–967.
223. *Tretter, L., Adam-Vizi, V.* (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 7771–7778.
224. *Grivennikova, V.G., Cecchini, G., Vinogradov, A.D.* (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 2719–2724.
225. *Adam-Vizi, V., Tretter, L.* (2013) *Neurochem. Int.*, **62**, 757–763.
226. *Tretter, L., Adam-Vizi, V.* (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 8972–8979.
227. *Chinopoulos, C., Tretter, L., Adam-Vizi, V.* (1999) *J. Neurochem.*, **73**, 220–228.
228. *Wilson, D.F.* (2008) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H11–13.
229. *Wenger, R.H.* (2000) *J. Exp. Biol.*, **203**, 1253–1263.
230. *Kenneth, N.S., Rocha, S.* (2008) *Biochem. J.*, **414**, 19–29.
231. *Goda, N., Kanai, M.* (2012) *Int. J. Hematol.*, **95**, 457–463.
232. *Semenza, G.L.* (2012) *Cell*, **148**, 399–408.
233. *Harris, E.J., van Dam, K.* (1968) *Biochem. J.*, **106**, 759–766.
234. *Halestrap, A.P., Quinlan, P.T.* (1983) *Biochem. J.*, **214**, 387–393.
235. *Glock, G.E., McLean, P.* (1956) *Exp. Cell. Res.*, **11**, 234–236.
236. *Jacobson, K.B., Kaplan, N.O.* (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 603–613.
237. *Lester, R.L., Hatefi, Y.* (1958) *Bioc-him. Biophys. Acta*, **29**, 103–112.
238. *Klingenberg, M., Slenczka, W., Ritt, E.* (1959) *Biochem. Z.*, **332**, 47–66.
239. *Williamson, D.H., Lund, P., Krebs, H.A.* (1967) *Biochem. J.*, **103**, 514–527.
240. *Klingenberg, M.* (1968) *Biological oxidation*/ed. T.P. Singer. N.Y.: Interscience Publisher, John Wiley, 3–54.
241. *Eng, J., Lynch, R.M., Balaban, R.S.* (1989) *Biophys. J.*, **55**, 621–630.
242. *Hassinen, I.E.* (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **853**, 135–151.
243. *Skulachev, V.P.* (2011) *Aging*, **3**, 1045–1050.
244. *Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A. Jr., Zorov, D.B., Skulachev, V.P.* (2011) *Curr. Drug. Targets*, **12**, 800–826.
245. *Murphy, M.P.* (2013) *Free Radic. Biol. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.010>.
246. *Kehrer, J.P.* (2007) in *Encyclopedia of Stress* (Fink, G., ed., 2nd edition) Academic Press, Oxford Vol. 3, pp. 331–335.
247. *Zhang, H., Limphong, P., Pieper, J., Liu, Q., Rodesch, C.K., Christians, E., Benjamin, I.J.* (2012) *FASEB J.*, **26**, 1442–1451.
248. *Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 6319–6322.
249. *Chandler, M.L., Varandani, P.T.* (1975) *Biochemistry*, **14**, 2107–2115.
250. *Cordes, C.M., Bennett, R.G., Siford, G.L., Hamel, F.G.* (2011) *PLoS One*, **6**, e18138.