

Received: 2005.02.10
 Accepted: 2005.04.21
 Published: 2005.06.07

Mitochondria jako źródło reaktywnych form tlenu

Mitochondria as an source of reactive oxygen species

**Elżbieta Potargowicz, Ewa Szerszenowicz, Magdalena Staniszevska,
 Dariusz Nowak**

Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Metabolizm tlenowy zachodzący w mitochondriach prowadzi do redukcji cząsteczki tlenu do wody za pośrednictwem czterech reakcji przeniesienia elektronów. W wyniku tych reakcji powstają różne produkty, tj.: rodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), tlen singletowy ($^1O_2^{\cdot}$), określane mianem reaktywnych form tlenu (RFT).

W warunkach fizjologicznych RFT są szybko unieczynniane i nie powodują zakłóceń w funkcjonowaniu komórki. Nieprawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego spowodowane niedoborem, mutacją lub zablokowaniem jednego z ogniw tego łańcucha prowadzi do nadmiernego wytwarzania RFT. W następstwie zwiększenia wytwarzania RFT zmniejsza się sprawność komórek, tkanek lub całych narządów.

Najczęstszym miejscem tworzenia RFT jest kompleks I i III, ale miejsce tworzenia RFT zależy od warunków w jakich znajdują się komórki.

Nadmierne wytwarzanie RFT jest podłożem wielu chorób i odpowiada za proces starzenia się organizmu.

Słowa kluczowe:

RTF – reaktywne formy tlenu • łańcuch oddechowy • dysmutaza nadadtlenkowa • anionorodnik nadadtlenkowy • nadtlenek wodoru • rodnik wodorotlenowy

Summary

Atmospheric oxygen molecules are reduced to water through four consecutive electron transfer reactions in mitochondria. As a consequence of these processes, various by-products (called reactive oxygen species, ROS), including superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen are released.

Under physiological conditions, ROS are rapidly inactivated and do not induce disruption of cell function. Abnormal function of the respiratory chain, resulting from deficiency, mutation, or inhibition of its elements, leads to elevated ROS production.

Complexes I and III of the mitochondrial chain are the most important sites of ROS formation; however, this can be affected by extracellular conditions.

Excessive ROS generation leads to decreased efficiency of cells, tissues, and whole organs and is responsible for acceleration of aging and the development of various diseases.

Key words:

ROS – reactive oxygen species • respiratory chain • superoxide dismutase • superoxide radical • hydrogen peroxide • hydroxyl radical

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7546.pdf

Word count: 3576

Tables: –

Figures: –

References: 64

Adres autorki: dr n. med. Elżbieta Potargowicz, Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej UM, ul. Mazowiecka 6/8, 92-216 Łódź; e-mail: ela@potargowicz.one.pl

Wykaz skrótów: **ATP** – adenosynotryfosforan; **O₂^{-•}** – anionorodnik nadadtlenkowy; **OH** – rodnik hydroksylowy; **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (postać zredukowana); **SOD** – dysmutaza nadadtlenkowa; **CAT** – katalaza; **CoQ** – koenzym Q; **GS** – glutation; **FAD** – dwunukleotyd flawinoadeninowy; **FADH₂** – postać zredukowana; **FMN** – nukleotyd flawinowy

WSTĘP

Tlen jest niezbędnym pierwiastkiem w metabolizmie organizmów tlenowych, ale w trakcie jego przemian tworzą się cząsteczki szkodliwe dla organizmu. Paradoksalnie zatem tlen, który jest nieodzownym warunkiem życia jest jednocześnie czynnikiem toksycznym.

Prawie cała energia organizmu pochodzi z fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach. Powstaje adenosynotryfosforan (ATP), a w tym samym czasie tlen (O₂) jest redukowany do wody (H₂O). Jako produkt uboczny tego procesu mogą powstawać bardzo reaktywne cząsteczki określane jako wolne rodniki tlenowe (WRT) lub szerzej jako reaktywne formy tlenu (RFT) lub „aktywne postacie tlenu”. Związki te uszkadzają wiele rozmaitych cząsteczek biologicznych, włączając w to lipidy, białka i DNA, powodując nieodwracalne zmiany w ich molekularnej strukturze, co prowadzi do zaburzeń ich funkcji biologicznej [19,63,64].

Mitochondria przyczyniają się również do programowanej śmierci komórki. Pod wpływem RFT wytwarzanych przez mitochondria może dochodzić do uwalniania proapoptotycznych białek wywołujących apoptozę lub nekrozę [14,24,32,60]. Nadmierne wytwarzanie RFT, prawdopodobnie stanowi podłoże apoptozy, towarzyszącej wielu chorobom i procesowi starzenia się: apoptozy neuronów istoty czarnej [12], apoptozy neuronów w następstwie urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego [29,59], degeneracji neuronów w chorobie Alzheimera i w stwardnieniu zanikowym bocznym [11].

Głównym źródłem RFT w organizmach jest mitochondrialny łańcuch oddechowy i dlatego same mitochondria są najbardziej narażone na oksydacyjne uszkodzenia, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia transportu elektronów i zwiększenia wytwarzania RFT, a więc tworzy się tzw. „błędne koło”. Z upływem czasu w mitochondriach powstaje coraz więcej uszkodzeń powodujących spadek wytwarzania ATP, a jednocześnie pociągającą za sobą wzmożone wytwarzanie RFT, tym samym wpływając destrukcyjnie na funkcje komórek [13,31,44,45]. Stwierdzono, że RFT mogą być przyczyną pewnych stanów chorobowych, zwłaszcza w warunkach osłabionej ochrony antyoksydacyjnej, a także procesów starzenia [9,17,21,36,46,56,59,61].

Jednak wolne rodniki tlenowe oraz tlenek azotu regulują krążenie, metabolizm energetyczny, reprodukcję, przekształcanie się komórek w czasie rozwoju embrionalnego, a także związki te funkcjonują jako główna obrona przed patogenami [21]. RFT odgrywają też ważną rolę w kontrolowaniu funkcji komórek oraz w przekazywaniu sygnałów w komórkach [2].

Ponieważ miejsca wytwarzania RFT w mitochondriach nie są dokładnie ustalone, ale powszechnie uważa się, iż są umiejscowione w obrębie elektronowego łańcucha transportującego elektrony, postanowiliśmy przeanalizować rolę poszczególnych enzymów łańcucha oddechowego w wytwarzaniu RFT. Należy dodać, że niektórzy autorzy wykazują tworzenie RFT również w macierzy przez obecne tam dehydrogenazy [28,53].

MITOCHONDRIALNY TRANSPORT ELEKTRONÓW I FOSFORYLACJA OKSYDACYJNA

Najbardziej istotne dla komórki jest przekształcenie energii chemicznej zawartej w zredukowanych koenzymach powstałych podczas glikolizy i w cyklu kwasu cytrynowego do postaci łatwo dostępnej w procesach komórkowych, tj. adenosynotryfosforanu (ATP). To przekształcenie energii zachodzi z udziałem systemu transportu elektronów, zwanego łańcuchem oddechowym, który znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Łańcuch ten złożony jest z kilku „ogniw”, którymi są kompleksy lipoproteino-we oznaczone numerami I, II, III i IV. Są to, w kolejności działania, enzymy: kompleks I, czyli oksydoreduktaza dinukleotydu nikotynoadeninowego-koenzym Q (NADH-CoQ), kompleks II, czyli oksydoreduktaza bursztynian-CoQ, następnie kompleks III, czyli oksydoreduktaza CoQH₂-cytochrom c i jako ostatni, kompleks IV, czyli oksydoreduktaza, zredukowany cytochrom c- tlen (O₂).

Zgodnie z aktualnymi poglądami poszczególne „ogniwa” łańcucha oddechowego nie kontaktują się ze sobą. Przekazywanie wodorów pomiędzy nimi zapewniają ruchome przekaźniki rozpuszczone w błonie i swobodnie w niej dyfundujące. Pierwszym takim przesońnikiem „spinającym” dehydrogenazy „substratowe”(kompleks I i II) z kompleksem III jest koenzym Q₁₀. Drugim jest cytochrom c „spinający” kompleks III i IV [33,54]

Do poznania roli poszczególnych ogniw łańcucha oddechowego przyczyniły się swoiste inhibitory transportu elektro-

nów, np: amytal, rotenon (bloker kompleksu I), antymycyna (bloker kompleksu III), cyjanek (bloker kompleksu IV) oraz związki, które niszczą gradient protonowy i przez to rozprzegają utlenianie od fosforylacji. Takim związkiem jest np. dinitrofenol.

WYTWARZANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU PRZEZ MITOCHONDRIA

Reaktywne formy tlenu, (rodnikowe i nierodnikowe pochodne tlenu), do których należy: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy (1O_2), ozon są aktywnymi cząsteczkami i z tego powodu są szkodliwe dla organizmów. W organizmach aerobowych RFT powstają w procesach metabolicznych podczas autooksydacji wielu związków, bądź w wyniku oddziaływań czynników zewnętrznych. Nadtlenek wodoru, który mimo że nie jest wolnym rodnikiem, odgrywa ważną rolę w procesach oksydacyjnych powstawania wolnych rodników. Nadtlenek wodoru powstaje w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego lub w wyniku dysmutacji rodnika ponadtlenkowego przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) [2]. Z kolei anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$ powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Jest produktem końcowym lub pośrednim wielu reakcji enzymatycznych. Powstaje głównie w łańcuchu oddechowym w przemianach enzymatycznych katalizowanych przez oksydoreduktazy [57]. Największe niebezpieczeństwo dla organizmu stwarza rodnik hydroksylowy, bowiem reaguje z każdą napotkaną cząsteczką organiczną. Głównym źródłem rodników hydroksylowych ($\cdot OH$) w organizmie jest reakcja Fentona $H_2O_2 + Fe^{+2} = \cdot OH + \cdot OH + Fe^{+3}$. Drugim źródłem rodników hydroksylowych jest reakcja Habera-Weissa, $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 = O_2 + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$ [2].

Czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody w łańcuchu oddechowym zachodzi wyłącznie na poziomie oksydazy cytochromowej (kompleks IV) [57]. Kompleksy łańcucha oddechowego przeprowadzają reakcje głównie „dwuelektronowo”, przenosząc parzystą ilość wodorów lub elektronów na tlen, który jest substratem kompleksu IV [57]. Jednakże niewielki procent przenoszonych przez kompleksy elektronów (około 2–5%) może opuścić łańcuch oddechowy i wejść w jednoelektronowe reakcje nieenzymatyczne z tlenem, prowadząc do wytwarzania tzw. „wolnych rodników tlenowych” (WRT), nazywanych także „reaktywnymi formami tlenu” (RFT). Tak więc, przepływ elektronów przez składowe łańcucha oddechowego nie jest szczelny: część elektronów „wycieka” redukując cząsteczkę tlenu w wyniku procesu jednoelektronowego. Przemiana ta zachodzi w następujący sposób: przyłączenie elektronu do cząsteczki tlenu przekształca tę cząsteczkę w wolny rodnik nazwany anionorodnikiem ponadtlenkowym. Przyłączenie drugiego elektronu powoduje powstanie nadtlenu wodoru (H_2O_2). Dołączenie trzeciego elektronu generuje rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Przyłączenie kolejnego elektronu umożliwia wytworzenie cząsteczki wody, związku zupełnie już obojętnego wobec składników komórki.

Odpowiedzialnymi związkami za „jednoelektronowy wyciek” z łańcucha oddechowego są głównie dehydrogenaza NADH i koenzym Q. Zredukowane formy: koenzymu dehydrogenazy NAD i ubihydrochinonu za pośrednictwem jednoelektronowej reakcji z tlenem tworzą $O_2^{\cdot-}$. Całkowita

pula tlenu cząsteczkowego 99–96% ulega w mitochondriach pełnej czteroelektronowej redukcji do H_2O . Pozostała część 1–4% po częściowej redukcji stanowi „jednoelektronowy wyciek” ($O^{\cdot-}$) z układu. Występująca w macierzy mitochondrialnej dysmutaza ponadtlenkowa zależna od jonów manganu (MnSOD) transformuje do H_2O_2 około 80% „jednoelektronowego wycieku”. Pozostała część 20% wnika do cytoplazmy, gdzie napotyka dysmutazę ponadtlenkową zależną od jonów miedzi i cynku (CuZnSOD). Mimo tych zabezpieczeń RFT atakują i uszkodzają nawet mitochondria. Uszkodzeń w mitochondriach powstaje coraz więcej wraz ze starzeniem się, pociągając za sobą spadek wytwarzania ATP. Zmiany kodu DNA pod wpływem RFT idą w złym kierunku, powodując mutowanie komórek, a tym samym do powstania i rozrostu komórek nowotworowych [1,35].

RFT powstają, gdy mitochondria wykorzystując tlen i materiały energetyczne docierające do komórki wytwarzają ATP [18,23,32,]. Dobrym obiektem badań nad rolą mitochondrium w wytwarzaniu RFT są dwie postaci komórek HeLa z prawidłowym łańcuchem oddechowym (postać dzika) i uszkodzonym (postać zmutowana). Li i wsp. [31] prowadzili hodowlę komórek HeLa w różnych stężeniach O_2 . W atmosferze 80% O_2 postać dzika ginęła po 5 dniach hodowli wskutek zwiększonego wytwarzania RFT, natomiast postać zmutowana (z uszkodzonym łańcuchem oddechowym) utrzymywała się przy życiu i wykazywała istotny spadek wytwarzania RFT. Innymi doświadczeniami potwierdzającymi rolę łańcucha oddechowego w wytwarzaniu RFT są badania Hoffmanna i wsp. [18], którzy w podobnym układzie doświadczalnym sprawdzali stopień uszkodzeń jądrowego DNA przez RFT. Więcej uszkodzeń oksydacyjnych wykazywała postać dzika komórek HeLa w porównaniu z postacią zmutowaną niewytwarzającą RFT w łańcuchu oddechowym. Z kolei Lyamzaev i wsp. [32] blokowali aktywność bioenergetyczną mitochondriów komórek HeLa przez zastosowanie blokerów łańcucha oddechowego i związków rozprzegających fosforylację oksydacyjną. Krótka inkubacja (36 h) z tymi związkami obniżała wytwarzanie ATP o 70%, generowała duże ilości RFT i prowadziła do śmierci przez apoptozę, natomiast dłuższa inkubacja powodowała całkowitą degradację mitochondriów.

ROLA POTENCJAŁU TRANSBLONOWEGO W TWORZENIU RFT

Podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej wytwarza się gradient protonowy (siła protonomotoryczna). Składnikami tej siły jest potencjał transblonowy ($\Delta\Psi_m$) i gradient chemiczny (ΔpH).

Potencjał transblonowy ($\Delta\Psi_m$) ma zasadnicze znaczenie dla funkcjonowania mitochondriów. Czynniki zaburzające proces powstawania gradientu protonów i związanego z nim $\Delta\Psi_m$ np. inhibitory łańcucha oddechowego lub go neutralizujące (np. gwałtowny wzrost stężenia Ca^{+2} w macierzy mitochondrium) indukują tworzenie się RFT. Załamanie się ($\Delta\Psi_m$) w większości mitochondriów danej komórki może być pierwszym sygnałem rozpoczęcia procesu programowanej śmierci [24,30,39]. Do zaburzenia powstawania ($\Delta\Psi_m$) prowadzi otwarcie megakanałów w mitochondrium, a to powoduje zatrzymanie syntezy ATP, wpływ z macierzy glutationu (GS), NAD(P)H i jonów Ca^{+2} [4,7,25,32].

Ujemny $\Delta\Psi_m$, wewnątrz mitochondrium, napędza pobieranie Ca^{+2} przez tę organelę. Dzięki temu, zależnie od szybkości napływu tych jonów z cytoplazmy, mitochondria mogą działać jako bufor wapniowe, stacje przekaźnikowe za pośrednictwem sygnałów wapniowych lub przełączników kierują komórkę na drogę apoptozy. Z przestrzeni międzybłonowej wydostają się do cytoplazmy białka apoptogenne: cytochrom c, czynnik indukcji apoptozy (AIF) oraz prokaspazy 2, 3 i 9 [7]. Ubytek cytochromu c przerywa łańcuch oddechowy, co powoduje nadmierne wytwarzanie RFT (głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru). RFT z kolei utleniają lipidy błony wewnętrznej (głównie kardiolipinę), co przyczynia się do zwiększenia jej przepuszczalności.

Lyamzaev i wsp. [32] wykazali, że zahamowanie aktywności bioenergetycznej mitochondriów poprzez inhibitory łańcucha oddechowego degraduje strukturę tych organeli i prowadzi do apoptozy. Z kolei Batandier i wsp. [4] na wyizolowanych mitochondriach wątroby szczura badali zależność pomiędzy stopniem otwarcia kanałów mitochondrialnych a tempem tworzenia się RFT. Mierzono wytwarzanie H_2O_2 wobec różnych stężeń NADH. Przy wysokich stężeniach NADH wytwarzanie H_2O_2 było czterokrotnie większe w porównaniu z tym, kiedy zmieniano przepuszczalność błony antybiotykiem (alametycyną) indukującym otwarcie kanałów.

Z powyższych danych wynika, że rola $\Delta\Psi_m$ w tworzeniu RFT jest bardzo istotna, choć nie wszyscy badacze podzielają ten pogląd. Sipos i wsp. [48] wykazali, że wytwarzanie RFT może być niezależne od potencjału transbłonowego. Stosowanie blokerów poszczególnych ogniw łańcucha oddechowego wywoływało większe wytwarzanie H_2O_2 w porównaniu ze związkami rozprzęgającymi fosforylację oksydacyjną.

UDZIAŁ KOMPLEKSU I ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO W WYTWARZANIU RFT I W POWSTAWANIU ZMIAN PATOLOGICZNYCH

Pierwszym ogniwem łańcucha oddechowego jest reduktaza NADH-Q (nazwana także dehydrogenazą NADH lub kompleksem I). Jest to duży enzym zbudowany z 34 łańcuchów polipeptydowych, kodowanych przez dwa genomy: jądrowy i mitochondrialny. Pierwszą reakcją jest związanie NADH i przeniesienie jego dwóch elektronów o wysokim potencjale na grupę prostetyczną kompleksu-mononukleotyd flawinowy (FMN), który przechodzi w postać zredukowaną: $NADH + H^+ + \text{koenzym Q/NAD}^+ + \text{koenzym QH}_2$ [54].

Genova i wsp. [13] wykazali, że właśnie ten kompleks jest najbardziej narażony na uszkodzenia oksydacyjne, ponieważ aż 13 podjednostek tego enzymu jest kodowane przez mitochondrialny DNA (mDNA). Do jednoelektronowej redukcji tlenu dochodzi prawdopodobnie przy przenoszeniu elektronów na centra żelazo-siarkowe reduktazy NADH-CoQ [28]. Elektrony centrów żelazo-siarkowych reduktazy NADH-CoQ są następnie przekazywane na koenzym Q, zwany również ubiquinonem.

Inhibitorami, którymi można badać czynność kompleksu I w łańcuchu oddechowym są: rotenon i amytał. Powodują one zahamowanie przepływu elektronów między NADH

i koenzymem Q, czyli hamują procesy oddechowe w obecności substratów dostarczających NADH. Jeżeli substratem oddechowym jest bursztynian, utleniany przez dehydrogenazę bursztynianową z wytworzeniem $FADH_2$, obecność rotenonu lub amytału nie wpływa na szybkość oddychania mitochondriów [54].

Wielu autorów [12,27,28,41] wykazało wzrost wytwarzania RFT po zablokowaniu transportu elektronów rotenonem, a głównym rodnikiem, który się tworzył w tych warunkach był anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- .

W chorobie Parkinsona obserwowano obniżenie aktywności kompleksu I oraz spadek potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$), a nadmierne wytwarzanie RFT wyzwalalo śmierć przez apoptozę neuronów dopaminergicznycch [12].

Zablokowanie przenoszenia elektronów w kompleksie I stwierdzono również w chorobach serca. W komórkach serc poddanych reperfuzji po niedokrwieniu wykazano zablokowanie transportu elektronów pomiędzy dehydrogenazą a ubiquinonem [59]. Kushnareva i wsp. [28] oraz Kudin i wsp. [27] po podaniu rotenonu obserwowali zwiększone wytwarzanie RFT przez izolowane mitochondria z mózgow i serc szczurów. Podanie rotenonu zwiększało wytwarzanie RFT w takim samym stopniu jak uwolnienie cytochromu c z mitochondriów.

Innym badaniem roli kompleksu I w wytwarzaniu RFT była mutacja jego genu. W zmutowanym genie kodującym kompleks I u nicienia *Caenorhabditis elegans* obserwowano spadek oddychania zależnego od NADH, kwasicy mleczanową i wzrost aktywności układu antyoksydacyjnego [15]. Mutacja genu kodującego oksydoreduktazę NADH – ubiquinon (kompleks I) wywołuje różnorodne choroby neurologiczne [15,43].

U zwierząt z ograniczonym spożyciem kalorii obserwowano mniejsze wytwarzanie RFT przez mitochondria, a spadek RFT był związany z obniżeniem redukcji w kompleksie I łańcucha oddechowego. Niewielkie wytwarzanie RFT zwiększa żywotność zwierząt [16,34]. Badano związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a procesem starzenia się u różnych gatunków kręgowców [1].

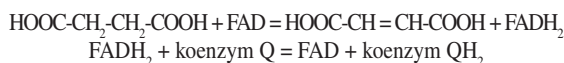
Interesujące było zastosowanie rotenonu jako leku przeciwnowotworowego. Zahamowanie tym inhibitorem łańcucha oddechowego indukowało śmierć komórek nowotworowych w procesie apoptozy [42].

Reasumując RFT powstają w dużym stopniu na odcinku przemian pomiędzy zredukowanym dwunukleotydem nikotynamidoadeninowym ($NADH + H^+$) a koenzymem Q_{10} (CoQ_{10}). Zdaniem wielu autorów [4,12,13,28] kompleks I jest głównym miejscem tworzenia RFT w łańcuchu oddechowym mitochondriów.

UDZIAŁ KOMPLEKSU II ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO W WYTWARZANIU RFT I POWSTAWANIU CHOROÓB

Reduktaza bursztynian-Q (kompleks II) jest integralnym białkiem błonowym z wbudowaną cząsteczką dwunukleotydu flawinoadeninowego ($FADH_2$). Jego elektrony są przenoszone na centra Fe-S, a następnie na koenzym Q, który

przekazuje je dalej na łańcuch oddechowy [6]. Kompleks II katalizuje reakcje utleniania bursztynianu do fumaranu zgodnie z równaniem:



Rosenstock i wsp. [46] wyzwalali choroby degeneracyjne u zwierząt przez podanie inhibitora kompleksu II (kwasu 3-nitropropionowego) w mitochondriach. Zmiany wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i tworzenie się RFT w mitochondriach prowadziły do apoptozy neuronów i były przyczyną procesów neurodegeneracyjnych, tj. choroby Huntingtona. Zdaniem tych autorów charakterystyczną cechą tej choroby jest zahamowanie kompleksu II w mitochondriach.

Z kolei Paddenberg i wsp. [38] wykazali, że kompleks II odgrywa istotną rolę w wytwarzaniu RFT w czasie hipoksji. Doświadczenia przeprowadzono *in vitro*, na izolowanych wycinkach ściany naczyń płucnych. W tych wrażliwych na hipoksję tkankach mierzono wytwarzanie RFT. Gdy tkanki były hodowane w prawidłowych warunkach tlenowych RFT były wytwarzane przez kompleks I i III, natomiast w czasie hipoksji głównym miejscem wytwarzania RFT był kompleks II.

Wiadomo, że oddychanie ssaków pod wysokim stężeniem tlenu wywołuje choroby płuc i oczu. Li i wsp. [31] prowadzili hodowlę komórek HeLa w różnych stężeniach O_2 . Ich doświadczenia wykazały, że przyczyną uszkodzeń przez hiperoksję jest zwiększone wytwarzanie RFT przez łańcuch oddechowy. Podobne obserwacje poczynili Freeman i wsp. [6] wykazując, że anionorodnik O_2^- i nadtlenek wodoru H_2O_2 są głównymi związkami wytwarzającymi się w czasie hiperoksji i to one są odpowiedzialne za toksyczność tlenu przy jego dużym stężeniu. Również mutacja białek kompleksu II u *Coenorhabditis elegant* spowodowała wzrost RFT i obniżyła żywotność tego nicienia [26].

Z powyższych rozważań wynika, że miejsce tworzenia RFT w łańcuchu oddechowym zależy od warunków, w których znajdują się komórki, oraz że większe stężenia tlenu nasilają wytwarzanie RFT.

ROLA KOENZYMU Q

Koenzyn Q (CoQ) uczestniczy w reakcjach kompleksu I, II i III łańcucha oddechowego i jest nie tylko głównym związkiem gromadzącym atomy wodoru dostarczone przez zredukowane koenzymy dehydrogenaz ($\text{NADH}+\text{H}^+$, FMNH_2 , FADH_2), ale także stanowi podstawowe źródło protonów i elektronów, wykorzystanych w reakcjach kompleksu III i IV [37].

Związek ten jest również odpowiedzialny za „jednoelektronowe przeciekanie” łańcucha oddechowego. Doświadczenia Suzuki i wsp. [54] z zastosowaniem blokerów poszczególnych ogniwi łańcucha wykazały, że najwięcej RFT powstaje pomiędzy kompleksem II a III, a więc dotyczy to koenzymu Q.

CoQ warunkuje wytwarzanie ATP w czasie przemian tlenowych. W łańcuchu oddechowym mitochondriów tempo wytwarzania ATP zależy od stężenia CoQ. Dodanie z ze-

wnątrz koenzymu Q10 przyspiesza transport elektronów przez łańcuch oddechowy. Tak, więc CoQ jest nie tylko „obligatoryjnym pośrednikiem” w przekazywaniu wodorów wzdłuż łańcucha oddechowego. Poza udziałem w łańcuchu oddechowym CoQ pełni w komórkach inne funkcje. Bierze udział w regeneracji α -tokoferolu oraz pełni rolę czynnika wychytującego wolne rodniki. James i wsp. [22] badali rolę koenzymu Q jako czynnika prooksydacyjnego i antyoksydacyjnego w mitochondriach. Wykazali, że koenzym Q jest zarówno ważnym nośnikiem elektronów, jak i antyoksydantem w błonie wewnętrznej mitochondriów. Postać zredukowana – ubiquinol obniża peroksydację lipidów zarówno przez bezpośrednie działania, jak i pośrednio poprzez odnowę witaminy E. Warto też podkreślić, że obniżenie zawartości CoQ we krwi towarzyszy wielu stanom chorobowym, takim jak kardiomiopatie, choroba Parkinsona, miażdżyca, a podanie CoQ prowadzi do wyraźnej poprawy zdrowia [10].

W podsumowaniu rozważań stwierdzić można, że podawanie CoQ byłoby wskazane, w celu umocnienia układu antyoksydacyjnego organizmu i przeciwdziałaniu w ten sposób ewentualnym patologiom, w których istotną rolę odgrywają mechanizmy wolnorodnikowe.

UDZIAŁ KOMPLEKSU III ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO W WYTWARZANIU RFT I CHOROBY ZWIĄZANE Z JEGO NIEDOBOREM

Reduktaza cytochromowa (określana również jako reduktaza ubiquinol-cytochrom c, kompleks cytochromów bc1 lub kompleks III), katalizuje reakcje koenzym $\text{QH}_2 + 2$ cytochrom c (Fe^{+3}) = koenzym Q + 2 cytochrom (Fe^{+2}) + 2H^+ . Grupą prostetyczną cytochromów jest hem. Podczas transportu elektronów atom Fe przechodzi ze stanu zredukowanego (+2) do stanu utlenionego (+3).

Turrens i wsp. [58] wykazali, że anionorodnik ponadtlenkowy powstaje z O_2 w reakcji związanej z redukcją składników kompleksu III w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym szczególnie w obecności antymycyny (inhibitor transportu elektronów między cytochromem b i c). Podobne obserwacje poczynili Chen i wsp. [8] w doświadczeniach na mitochondriach izolowanych z niedotlenionych miocytów serca szczura w porównaniu z mitochondriami izolowanymi z prawidłowych miocytów. Pozbawienie mięśnia sercowego tlenu zatrzymuje łańcuch oddechowy, a po wznowieniu dostawy krwi, czyli reperfuzji, następuje eksplozja wytwarzania RFT. Ich zdaniem to kompleks III jest głównym miejscem wytwarzania RFT w mitochondriach, a rotenon (bloker kompleksu I) tylko ogranicza przepływ elektronów do kompleksu III. Rotenon zwiększał wytwarzanie H_2O_2 w mitochondriach izolowanych ze zdrowych miocytów, natomiast nie zwiększał wytwarzania w mitochondriach z komórek niedotlenionych. Również Wang i wsp. [62], badając poszczególne ogniwa łańcucha oddechowego, wskazali, że kompleks III jest głównym miejscem wytwarzania RFT. W swoich doświadczeniach z zastosowaniem kadmu wykazali, że pierwiastek ten głównie hamował kompleks III, a dokładnie wiązał się pomiędzy ubisemichinonem a cytochromem b566.

Powyższe badania dostarczają dalszych dowodów, że miejsce, w którym generują się w łańcuchu oddechowym RFT zależy od czynników oddziaływujących na komórkę.

ROLA CYTOCHROMU C

Cytochrom c, przenosi elektrony z reduktazy cytochromowej (kompleks III) na oksydazę cytochromową będącą końcowym składnikiem łańcucha oddechowego (kompleks IV) [53].

Ubytek cytochromu c przerywa łańcuch oddechowy, co powoduje nadmierne wytwarzanie RFT (głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru). RFT z kolei utleniają lipidy błony wewnętrznej (głównie kardiolipinę), co przyczynia się do zwiększenia jej przepuszczalności. Uwalnianie cytochromu c jest następstwem obniżenia potencjału transbłonowego $\Delta\Psi(m)$ [24]. Uwolniony cytochrom c z mitochondriów do cytosolu aktywuje kaspazy, czyli proteiny rozkładające białka komórki. Prowadzi to – oprócz działania innych czynników – do fragmentacji i śmierci komórki przez apoptozę. Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów jest regulowane przez białka z rodziny BCL-2, które są białkami kanałowymi cząsteczek cytochromu c w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białka BCL-2 i BCL-X hamują, a białka BAX i BAK powodują uwalnianie cytochromu c z mitochondriów [3].

Chen i wsp. [7] badali rolę RFT i mitochondriów w indukcji apoptozy wywołanej promieniowaniem w komórkach czerniaka. Obserwowano dwa wyraźne szczyty generowania RFT przez promieniowanie. Było to związane z obniżeniem zredukowanej postaci glutationu i zaburzeniem powstawania mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi(m)$). Egzogenne RFT i kaspaza 3 indukowały spadek potencjału błonowego i uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. Można było zapobiec temu farmakologicznie przez inhibitory kaspaz oraz przez nadekspresję Bcl-2. Egzogenne RFT powodowały zmianę przepuszczalności błony wewnętrznej, co otwierało pory i uwalniało cytochrom c w izolowanych mitochondriach, a to z kolei mogło być hamowane przez cyklosporynę. Z kolei Starkov i wsp. [50] wykazali, że izolowane mitochondria z mózgowia pod wpływem dużego stężenia jonów Ca^{+2} , lub pod wpływem białek apoptotycznych BAX i BH3 wzmagają wytwarzanie H_2O_2 i dochodzi do uwolnienia cytochromu c.

Powyższe obserwacje wskazują na niebagatelną rolę cytochromu c w wytwarzaniu RFT, a także na jego udział w wyzwalaniu programowanej śmierci komórek.

UDZIAŁ KOMPLEKSU IV ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO W WYTWARZANIU RFT I W POWSTAWANIU ZMIAN PATOLOGICZNYCH

Oksydaza cytochromowa (kompleks IV) katalizuje przeniesienie elektronów z cytochromu c do O_2 . W kompleksie IV przebiegają reakcje utleniania cytochromu c i kolejno reakcje redukcji i utleniania cytochromów a i a_3 . Oksydaza cytochromowa, będąca składnikiem tego kompleksu, przenosi elektrony na O_2 i redukuje go do jonu O_2^- , a jon ten wchodzi w reakcje z protonami uwolnionymi w reakcjach kompleksu III, tworzy cząsteczkę wody zgodnie z równaniem $4H^+ + 2O_2^- = 2H_2O$. Przyjęcie czterech elektronów

przez O_2 powoduje jego całkowitą redukcję do H_2O . Ten kompleks składa się z 10 podjednostek, z których 3 są kodowane przez genom mitochondrialny. Oksydaza cytochromowa zawiera dwa hemy i dwa jony miedzi [53].

W chorobie Alzheimera obserwuje się obniżoną aktywność kompleksu IV (niekiedy również II i III). Istnieją podstawy, by sądzić, że amyloid odkładający się w blaszkach włókien nerwowych osób dotkniętych chorobą Alzheimera powoduje apoptozę neuronów poprzez mechanizm stresu oksydacyjnego. Cytotoksyczne fragmenty amyloidu wywołują *in vitro* apoptozę neuronów embriionów szczura indukując jednocześnie znaczne obniżenie stężenia glutationu w tych komórkach [11].

PODSUMOWANIE

W celu określenia roli poszczególnych ogniw łańcucha oddechowego w wytwarzaniu RFT przeanalizowano prace z zastosowaniem różnorodnych metod doświadczalnych, tj.:

- stosowanie swoistych blokerów łańcucha oddechowego,
- wpływ związków rozprzegających transport elektronów z syntezy ATP,
- badanie zmian potencjału transbłonowego mitochondriów,
- badanie następstw mutacji genów kodujących poszczególne ogniwa

Niezależnie od zastosowanej metodyki doświadczeń wszystkie badania dowodziły, że łańcuch oddechowy jest głównym miejscem w komórce, w którym powstają RFT, natomiast dokładne miejsce tworzenia RFT zależy od warunków w jakich znajdują się komórki. Najwięcej RFT powstaje w kompleksie I i III, ale np. podczas hipoksji głównym miejscem powstawania RFT jest kompleks II. Ponadto z przedstawionych prac wynika, że nieprawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego spowodowane niedoborem, któregoś z elementów lub zablokowaniem przepływu elektronów objawiają się zwiększonym wydzielaniem RFT z jednoczesnym niedostatecznym wytwarzaniem związków wysokoenergetycznych. Im większy stopień uszkodzenia łańcucha tym większe jest wytwarzanie RFT, a organellami komórkowymi najbardziej narażonymi na atak RFT są mitochondria.

Wiele przemawia również za tym, że upośledzenie wytwarzania energii w mitochondriach i zwiększone wytwarzanie RFT powoduje ciężkie choroby. Na ogół najbardziej dotknięte są narządy charakteryzujące się wysokim poziomem metabolizmu tlenowego: układ nerwowy, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, wątroba.

Zmiany powodowane przez RFT w metabolizmie komórkowym są następstwem pęknięć łańcucha DNA, wzrostu stężenia jonów Ca^{+2} wewnątrz komórki, uszkodzenia błonowych nośników jonów, obniżenia poziomu ATP oraz uszkodzenia błony w wyniku peroksydacji lipidów. Komórki wytworzyły wiele mechanizmów chroniących je przed działaniem RFT. W obronie uczestniczą zarówno drobnocząsteczkowe antyoksydanty, jak i białka enzymatyczne (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza).

PIŚMIENICTWO

- [1] Barja G.: Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2004; 79: 235–251
- [2] Bartosz G.: *Obrazki z pola bitwy. W: Druga twarz tlenu.* PWN, Warszawa 1995; 201–297
- [3] Bartosz G.: Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post. Biochem.*, 1998; 44: 22–31
- [4] Batandier C., Leverve X., Fontaine E.: Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17197–17204
- [5] Bonnefoy M., Drai J., Kostka T.: Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.*, 2002; 31: 1174–1184
- [6] Cecchini G.: Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003; 72: 77–109
- [7] Chen Q., Chai Y.C., Mazumder S., Jiang C., Macklis R.M., Chisolm G.M., Almasan A.: The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ.*, 2003; 10: 323–334
- [8] Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnfsky E.J.: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 36027–36031
- [9] Dufour E., Larsson N.G.: Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1658: 122–132
- [10] Drzewoski J.: *Farmakologia kliniczna koenzymu Q10.* 2004 www.hedat.pl/drzewoski.pdf
- [11] Emerit J., Edeas M., Bricaire F.: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomem. Pharmacother.*, 2004; 58: 39–46
- [12] Fiskum G., Starkov A., Polster B.M., Chinopoulos C.: Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2003; 991: 111–119
- [13] Genova M.L., Pich M.M., Bernacchia A., Bianchi C., Biondi A., Bovina C., Falasca A.L., Formigini G., Castelli G.P., Lenaz G.: The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1011: 86–100
- [14] Gomez-Lechon M.J., Ponsoda X., O'Connor E., Donato T., Castell J.V., Jover R.: Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 2155–2167
- [15] Grad L.J., Lemire B.D.: Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; 13: 303–314
- [16] Gredilla R., Phaneuf S., Selman C., Kendaiah S., Leeuwenburgh C., Barja G.: Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1019: 333–342
- [17] Hartman P., Ponder R., Lo H.H., Ishii N.: Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. *Mech. Ageing Dev.*, 2004; 125: 417–420
- [18] Hoffmann S., Spitkovsky D., Radicella J.P., Epe B., Wiesner R.J.: Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 765–773
- [19] Huang H., Manton K.G.: The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci.*, 2004; 9: 1100–1117
- [20] Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K.: Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.*, 2003; 10: 2495–2505
- [21] Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K.: Cross talk of nitric oxide, oxygen radicals, and superoxide dismutase regulates the energy metabolism and cell death and determines the fates of aerobic life. *Antioxid. Redox Signal.*, 2003; 5: 475–484
- [22] James A.M., Smith R.A., Murphy M.P.: Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004; 423: 47–56
- [23] Jou M.J., Jou S.B., Guo M.J., Wu H.Y., Peng T.I.: Mitochondrial reactive oxygen species generation and calcium increase induced by visible light in astrocytes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1011: 45–56
- [24] Kadenbach B., Arnold S., Lee I., Huttemann M.: The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1655: 400–408
- [25] Kanno T., Sato E.E., Muranaka S., Fujita H., Fujiwara T., Utsumi T., Inoue M., Utsumi K.: Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic. Res.*, 2004; 38: 27–35
- [26] Kristal B.S., Krasnikov B.F.: Structure-(Dys)function relationships in mitochondrial electron transport chain complex II? *Sci. Aging Knowledge Environ.*, 2003; 5: PE3
- [27] Kudin A.P., Bimpong-Buta N.Y., Vielhaber S., Elger C.E., Kunz W.S.: Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 4127–4135
- [28] Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A.: Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. *Biochem. J.*, 2002; 368: 545–553
- [29] Lesnfsky E.J., Hoppel C.L.: Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003; 420: 287–297
- [30] Levraut J., Iwase H., Shao Z.H., Vanden Hoek T.L., Schumacker P.T.: Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003; 284: H549–558
- [31] Li J., Gao X., Qian M., Eaton J.W.: Mitochondrial metabolism underlies hyperoxic cell damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1460–1470
- [32] Lyamzaev K.G., Izyumov D.S., Avetisyan A.V., Yang F., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V.: Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim. Pol.*, 2004; 51: 553–562
- [33] Matthews H.R., Freedland R.A., Miesfeld R.L.: *Biochemia i biologia molekularna w zarysie.* PWN, Warszawa 2000
- [34] Merry B.J.: Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002; 34: 1340–1354
- [35] Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Ichinoe A., Ohno M., Ide Y., Hirano S., Yoshimura D., Tominaga Y., Furuichi M., Sakumi K.: Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1011: 101–111
- [36] Nicholls D.G.: Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002; 34: 1372–1381
- [37] Nohl H., Staniek K., Kozlov A.V., Gille L.: The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors*, 2003; 18: 23–31
- [38] Padenberg R., Ishaq B., Goldenberg A., Faulhammer P., Rose F., Weissmann N., Braun-Dullaeus R.C., Kummer W.: Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2003; 284: L710–L719
- [39] Panaretakis T., Shabalina I.G., Grander D., Shoshan M.C., DePierre J.W.: Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001; 173: 56–64
- [40] Pani G., Colavitti R., Bedogni B., Fusco S., Ferraro D., Borrello S., Galeotti T.: Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 1299–1308
- [41] Paradies G., Petrosillo G., Pistolesi M., Ruggiero F.M.: Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 2002; 286: 135–141
- [42] Pelicano H., Feng L., Zhou Y., Carew J.S., Hileman E.O., Plunkett W., Keating M.J., Huang P.: Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 37832–37839
- [43] Qi X., Lewin A.S., Sun L., Hauswirth W.W., Guy J.: SOD2 gene transfer protects against optic neuropathy induced by deficiency of complex I. *Ann. Neurol.*, 2004; 56: 182–191
- [44] Racheck L.I., Grishko V.I., Alexeyev M.F., Pastukh V.V., LeDoux S.P., Wilson G.L.: Endonuclease III and endonuclease VIII conditionally targeted into mitochondria enhance mitochondrial DNA repair and cell survival following oxidative stress. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 3240–3247

- [45] Rego A.C., Oliveira C.R.: Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.*, 2003; 28: 1563–1574
- [46] Rosenstock T.R., Carvalho A.C., Jurkiewicz A., Frussa-Filho R., Smaili S.S.: Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.*, 2004; 88: 1220–1228
- [47] Sipos I., Tretter L., Adam-Vizi V.: The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. *Neurochem. Res.*, 2003; 28: 1575–1581
- [48] Skulachev V.P.: Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.*, 1996; 397: 7–10
- [49] Starkov A., Fiskum G.: Generation of reactive oxygen species by brain mitochondria mediated by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2002
- [50] Starkov A.A., Chinopoulos C., Fiskum G.: Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium*, 2000; 36: 257–264
- [51] Starkov A.A., Fiskum G.: Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.*, 2003; 86:1101–1107
- [52] Starkov A.A., Polster B.M., Fiskum G.: Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J. Neurochem.*, 2002; 83: 220–228
- [53] Stryer L.: Fosforylacja oksydacyjna. W: *Biochemia*, PWN Warszawa, 2000; 564–592
- [54] Suzuki S., Higuchi M., Proske R.J., Oridate N., Hong W.K., Lotan R.: Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 1999; 18: 6380–6387
- [55] Swerdlow R.H., Khan S.M.: A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses*, 2004; 63: 8–20
- [56] Turrens J.F.: The potential of antioxidant enzymes as pharmacological agents *in vivo*. *Xenobiotica*, 1991; 21: 1033–1040
- [57] Turrens J.F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 2003; 552: 335–344
- [58] Turrens J.F., Aleksandre A., Lehninger A.L.: Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985; 237: 408–414
- [59] Turrens J.F., Beconi M., Barilla J., Chavez U.B., McCord J.M.: Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic. Res. Commun.*, 1991; 12–13: 681–689
- [60] Upadhyay D., Panduri V., Ghio A., Kamp D.W.: Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003; 29: 180–187
- [61] Wallace D.C.: Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*, 1992; 256: 628–632
- [62] Wang Y., Fang J., Leonard S.S., Rao K.M.: Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol. Med.*, 2004; 36: 1434–1443
- [63] Waśniowska M.: Współzależność funkcjonalna mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej a sygnał wapniowy. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 247–252
- [64] Wei Y.H.: Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998; 217: 53–63