

## НЕФОСФОРИЛИРУЮЩЕЕ ОКИСЛЕНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ И СОПРЯЖЕННЫЕ С НИМ ПРОЦЕССЫ

### Обзор

© 2020 Д.Б. Зоров<sup>1,2\*</sup>, Н.В. Андрианова<sup>1</sup>, В.А. Бабенко<sup>1,2</sup>, Л.Е. Бакеева<sup>1</sup>,  
С.Д. Зоров<sup>3</sup>, Л.Д. Зорова<sup>1,2</sup>, И.Б. Певзнер<sup>1,2</sup>, В.А. Попков<sup>1,2</sup>,  
Е.Ю. Плотников<sup>1,2,4</sup>, Д.Н. Силачев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: zorov@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени акад. В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.07.2020

После доработки 17.09.2020

Принята к публикации 17.09.2020

Механизмы окислительного фосфорилирования и его регуляции остаются одними из основных проблем биоэнергетики. Эффективность энергизации митохондрий определяется взаимоотношением скорости генерации электрохимического потенциала ионов водорода и скоростями его расходования на синтез АТФ и использования АТФ в эндергонических реакциях. Разобщение (частичное или полное), возникающее в процессе неконтролируемой и контролируемой утечки ионов через внутреннюю митохондриальную мембрану, с одной стороны, приводит к уменьшению относительного синтеза АТФ, а с другой, подчиняясь закону сохранения энергии, приводит к образованию тепла, генерация которого является насущной функцией организма. Кроме повышенного термогенеза, увеличение нефосфорилирующего окисления различных субстратов сопровождается уменьшением трансмембранного потенциала и продукции активных форм кислорода и активацией потребления кислорода, продукции воды и двуокси углерода, повышением уровня внутриклеточного АДФ и закислением цитозоля. В этом анализе каждый из этих факторов будет рассмотрен в отдельности на предмет его роли в регуляции метаболизма.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, вода, термогенез, набухание, биоэнергетика, разобщение.

DOI: 10.31857/S032097252012009X

### ВВЕДЕНИЕ

Окислительное фосфорилирование в современной трактовке означает сопряжение окисления субстратов, сопровождающееся генерацией электрохимического потенциала ионов водорода, с его использованием АТФ синтазой. Это понятие сопряжения априори предполагает, что химическая энергия, содержащаяся в субстратах окисления, сначала трансформируется в электрохимическую, а потом снова в химическую, содержащуюся в макроэргической связи АТФ. Степень сопряжения между этими процессами определяет коэффициент полезного действия интегрального процесса, то есть насколько эффективно энергия окисления превращается в хими-

ческую энергию макроэргической связи в молекуле АТФ. Это означает, что при высокой степени сопряжения окисления с фосфорилированием (то есть при максимально возможном превращении энергии, освобождаемой при переносе электронов по дыхательной цепи митохондрий, в энергию, запасенную в АТФ) образуется много АТФ (максимально — три молекулы при окислении одной молекулы NADH), а при низкой — меньше трех молекул. Практика показывает, что в любом случае, по крайней мере, ~1/3 энергии окисления не сопряжено с синтезом АТФ, а освобождается в виде тепла [1]. При буквальном рассмотрении в результате метаболизма субстратов окисления образуется АТФ, вода, CO<sub>2</sub> и выделяется тепло. Мы кратко рассмотрим в отдельности все эти компоненты и некоторые способы их регуляции, учитывая сопряженные элементы.

\* Адресат для корреспонденции.

## ТЕРМОГЕНЕЗ

Считать тепло, освобождаемое в результате митохондриального окисления, ненужной и бессмысленной потерей неправильно, так как это выделяемое тепло является основным способом поддержания температуры прежде всего у гомойотермных животных, к которым принадлежит и человек. Более того, выделение тепла в результате митохондриального окисления надо рассматривать не как императивную паразитную утечку, а как тонко регулируемый физиологически необходимый процесс, который затрагивает механизм сопряжения окислительного фосфорилирования.

Эта лишь внешне тривиальная мысль была впервые высказана В.П. Скулачевым в 1960 г. на основании измерений коэффициента Р/О митохондрий скелетных мышц голубя, подвергнутого охлаждению [2], и данные были представлены на 5-ом Международном конгрессе биохимиков в Москве [3]. В частности, было показано, что при окислении пирувата с малатом коэффициент Р/О в митохондриях контрольных птиц был 2,07, а у птиц, подверженных охлаждению, 1,0. Надо отметить, что эти изменения сопровождались активацией дыхания, т.е. скорость окисления субстратов возрастала. Конечно же, возник вопрос о механизме такой регуляции. Немного позже первым кандидатом на роль такого регулятора, с полным правом претендующего называться природным разобщителем окислительного фосфорилирования, стали свободные жирные кислоты [4], и именно они на долгие годы стали предметом исследований команды Скулачева.

Надо понимать, что активация дыхания клеток в пределах органа может приводить к возможному дисбалансу между доставкой и потреблением кислорода и субстратов, что теоретически может приводить к ишемизации органа, являющейся нежелательной, поэтому максимальная потеря сопряжения может нести в себе множество патогенетических событий, заключающихся не только в снижении  $pO_2$  в ткани, но и изменении в ней уровней АТФ и АДФ и внутриклеточного рН, что будет рассмотрено далее. Исходя из этого, физиологически допустимой является умеренная потеря сопряжения, что нашло отражение в применяемом сейчас термине «мягкое разобщение». Видимо, именно необходимостью предотвращения ишемизации и обусловлена высокая степень снабжения ткани сосудами (васкуляризация) ткани бурого жира, специализирующегося предпочтительно на термогенной функции за счет наличия в ткани разобщающего белка UCP1 [5], обеспечивающего термогенез, опосредованный жирными кисло-

тами. В целом, проблема соответствия доставки энергии в отделы ткани и энергетических запросов ткани является одной из крайне важных в физиологическом отношении проблем, решение которых очень значимо [6]. Возможно, аналогичное решение о необходимости высокой васкуляризации природа нашла и для щитовидной железы, производящей тиреоидные гормоны. Эти гормоны (с определенными оговорками) некоторыми исследователями признаются как природные слабые разобщители, хотя прямое разобщающее действие тиреоидных гормонов реализуется далеко не всегда, что указывает на то, что если и происходит разобщение, то у этого процесса есть посредники [7–9].

Разобщение окислительного фосфорилирования, особенно в мягком режиме, допускающим умеренный синтез АТФ митохондриями, стало предметом множества исследований и было подробно проанализировано В.П. Скулачевым [10]. Основная мысль, высказанная им и поддержанная мировым научным сообществом, заключается в том, что мягкое разобщение является механизмом уменьшения ненужного и избыточного эндогенного производства активных форм кислорода. Этот вывод был сделан на основании полученной экспоненциальной зависимости генерации активных форм кислорода (АФК), прежде всего перекиси водорода, от величин трансмембранного потенциала митохондрий, когда максимальная генерация АФК наблюдалась у гиперпотенциальных митохондрий [11]. Из этого не напрямую следует вывод, что генерация АФК митохондриями происходит не в результате некой неконтролируемой утечки электронов с компонентов дыхательной цепи, а является естественным, тонко регулируемым процессом, в ходе которого митохондрии, помимо выполнения целого ряда насущных функций [12], превращаются в систему, стабилизирующую уровень внутриклеточных АФК, тем самым превращая ее в некотором роде в АФК-стат. В этом плане митохондриальный термогенез является мощным регулятором уровня АФК в митохондрии и клетке в целом. В частности, повышение термогенеза позволит избежать нежелательную лавинную генерацию АФК [13–15], имеющую колоссальное патогенетическое значение [16].

Несколько лет назад было выяснено, что осуществляемый жирными кислотами и другими слабыми и сильными разобщителями циклический процесс транспорта через бислоиные мембраны протонированной и непротонированной форм [17] является не единственным механизмом, обеспечивающим сброс мембранного потенциала на внутренней митохондриаль-

ной мембране. Дополнительно к этому разобщение окислительного фосфорилирования достигается наличием белков – переносчиков разобщителей, среди которых не только UCP1, но и ADP/ATP антипортер [18], и дикарбоксилатный переносчик во внутренней митохондриальной мембране [19, 20]. При всем этом в предполагаемом разобщении, опосредованном жирными кислотами, остается много недоказанных предположений, но в общем виде можно говорить о возможной естественной протонофорной активности жирных кислот, наблюдаемой на бислойных моделях и опосредованной протонофорной активностью, вызванной взаимодействием жирных кислот с белками внутренней мембраны митохондрий, при этом важным фактором, участвующим в эффективности разобщения, является значение трансмембранного потенциала [21]. Примечательным стало подтверждение транспорта протона через транслокатор адениновых нуклеотидов, опосредованного жирными кислотами, очень схожего по характеру с механизмом разобщающего действия жирных кислот при взаимодействии с разобщающим белком UCP1, в результате чего подтверждается также и возможная термогенная функция ADP/ATP антипортера [22]. Есть данные, что сами митохондрии достаточно устойчивы к значительному повышению температуры [23], так что калоригенное действие митохондриальных переносчиков может не отражаться на функциональной активности митохондрий. Пока остается загадочным процесс ингибирования альфакетохолестанолом действия даже самых мощных разобщителей [24], что может предполагать участие липидов в процессе разобщения.

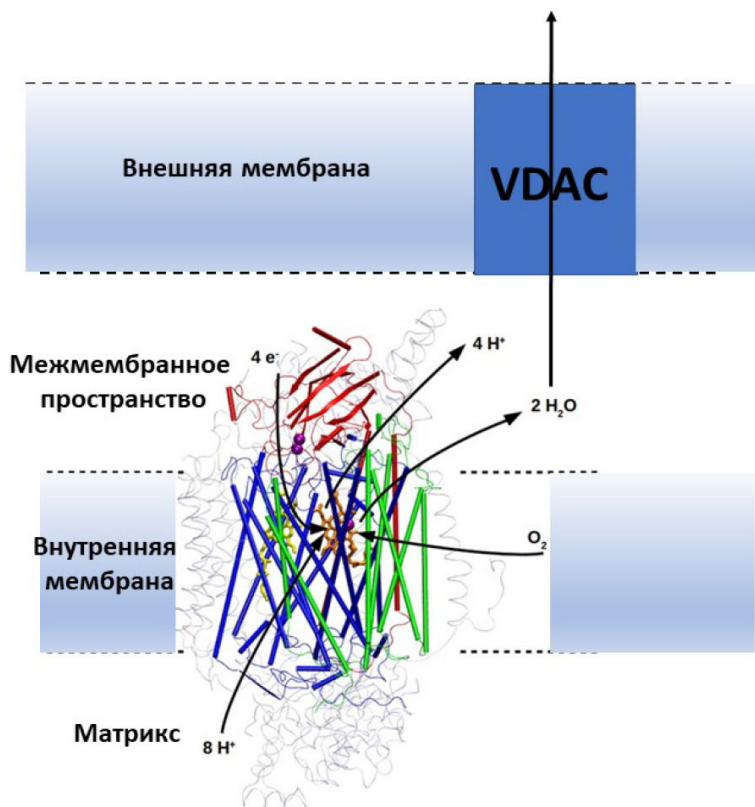
## ВОДА

Подавляющее большинство исследователей отчетливо признает кислород-потребляющую функцию митохондрий, однако результирующее образование воды в митохондриях уходит из общего внимания. Надо понимать, что на одну молекулу потребленного кислорода образуется две молекулы воды. Но при этом, если проблеме доставки кислорода в ткань и в саму митохондрию посвящено громадное число публикаций, то создается впечатление, что проблемы оттока воды от митохондрий и целой клетки не существует. При этом в патологической клетке можно наблюдать локальное или глобальное (высокоамплитудное) набухание митохондрий (т.е. на микроуровне [25–28]) или отек всей клетки или органа (т.е. на макроуровне) [29, 30]. Заметим, что именно фатальный отек мозга становится

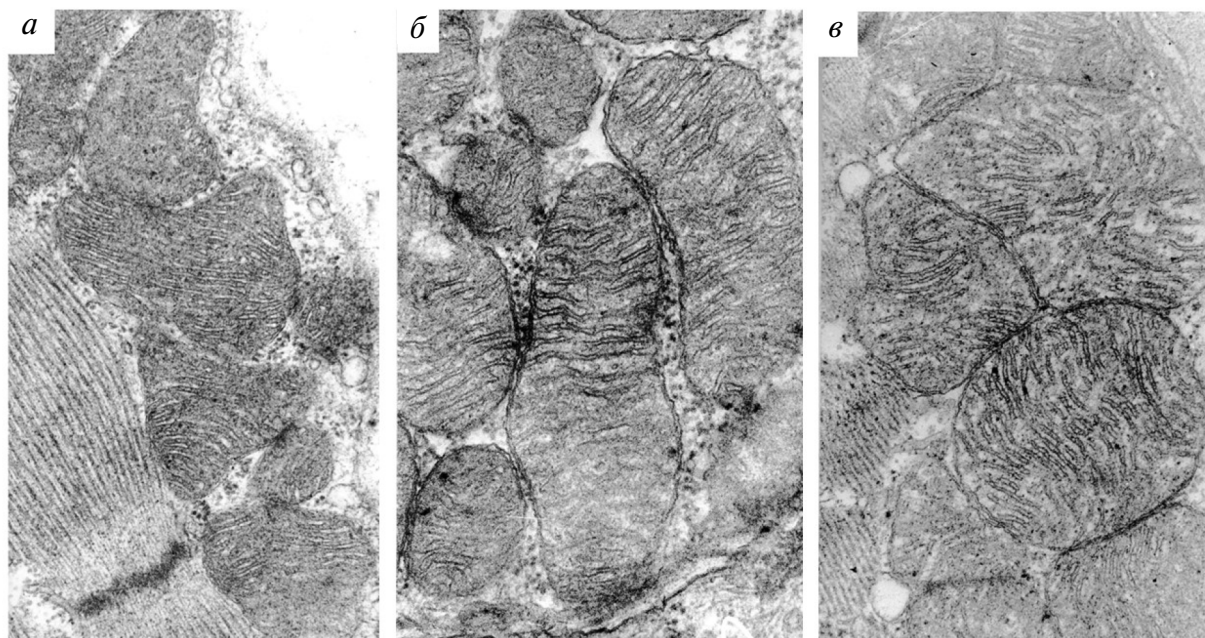
конечной причиной гибели пациентов, перенесших инсульт [31].

В митохондриях основное место образования воды локализовано на цитохромоксидазе, освобождающей молекулы воды в межмембранное пространство (рис. 1) [32]. Дальнейшая судьба воды распределяется по двум направлениям. По одному сценарию практически вся вода уходит в цитоплазму. Хотя признается, что мембраны являются неплохими проводниками для воды, наиболее легким путем выхода воды из митохондрий является ее вынос через вольт-зависимый анионный канал (VDAC или, как его еще называют, пориновый канал [33]). Что касается второй опции, то в принципе вода может поступать в матрикс митохондрий, где особенно высокое осмотическое + онкотическое давление, и в норме ортодоксальная конфигурация матрикса митохондрий есть один из показателей митохондриального гомеостаза. В этом плане наличие во внутренней митохондриальной мембране аквапоринов [34, 35] внешне выглядит нелогичным, ибо их присутствие ускоряет поступление воды в матрикс митохондрий. Хотя, справедливости ради, надо отметить, что быстрое уравнивание объема митохондрий после осмотического воздействия [36] может свидетельствовать о том, что пассивного транспорта воды и без наличия аквапоринов вполне может хватить для обеспечения осмотической регуляции, и специфическая функция аквапоринов не сводится к транспорту воды, а заключается в переносе некоторых других веществ, осуществляя, например, транспорт ионов аммония, сопряженный с транспортом воды, что предполагается для аквапорина 8 [37].

Отметим, что набухание межмембранного пространства и высокоамплитудное набухание митохондрий в целом, наблюдаемые на ультраструктурном уровне, являются признаками патогенного стрессорного воздействия. При этом небольшое набухание митохондрий является не только не патологическим, а наоборот, регуляторным, приводящим к активации митохондриального метаболизма, как адаптивный ответ на умеренный стресс. В кардиомиоцитах вызванное окислительным стрессом увеличение объема митохондрий всего на несколько процентов приводит к активации дыхания на одну треть с пропорциональным увеличением синтеза АТФ, генерации активных форм кислорода (АФК), обеспечивающих мобилизацию активных защитных сигнальных систем [38] и приводящих к соответствию энергетических поступлений и их затрат [6]. Это небольшое увеличение объема митохондрий наблюдалось при действии гормонов, в частности, глюкагона, также обеспечива-



**Рис. 1.** Функционирование цитохромоксидазы с предполагаемым транспортом воды. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)



**Рис. 2.** Ультраструктура митохондрий в диафрагме крысы. Электронная микроскопия, выполненная после стандартной фиксации и подготовки образца. Просмотр осуществляли на микроскопе Hitachi HU-12. *a* – Диафрагма контрольной крысы, содержащейся при 28°C; *б* – диафрагма крысы, подвергнутой холодовому стрессу (2°C, 15 мин); *в* препарат диафрагмы контрольной крысы после добавления 40 μМ 2,4-динитрофенола *in vitro* при 28°C

ющего активацию метаболизма [39]. В начале 1970-х гг. мы наблюдали активацию тканевого дыхания, сопровождающуюся небольшим увеличением *in situ* межмембранного пространства и просветлением матрикса митохондрии диафрагмальной ткани крыс, подвергнутых холодному стрессу (рис. 2). Таким образом, набухание митохондрий также подчиняется общей закономерности «multet poset» (много вредно), доминирующей в биологическом мире [15] и которой нужно придерживаться при использовании фармакологических препаратов. При этом небольшое набухание митохондрий является не только физиологически допустимым, но и необходимым для мобилизации метаболизма и его соответствия возросшим потребностям, в то время как дальнейшее набухание митохондрий может приводить к гибели клетки. Можно лишь предположить, что это малое изменение объема митохондрий не сопровождается разрывом их внешней мембраны, в то время как большее набухание, вплоть до т.н. высокоамплитудного, приводит к увеличивающимся разрывам внешней мембраны, которое сопровождается выходом из межмембранного пространства сигнальных белков, индуцирующих клеточную гибель. Отметим, что высокоамплитудное набухание митохондрий, наблюдаемое при открытии в митохондриях мегаканала (индукции неспецифической проницаемости), сопровождается, с одной стороны, полной деэнергизацией, а с другой стороны, неспособностью обеспечить нормальную (ортодоксальную) конформацию матрикса митохондрий, определенно указывающей на взаимосвязь этих двух процессов/состояний.

Рассматривая первый вариант судьбы воды, образованной в митохондриях, а именно ее выход через VDAC, мы позволим себе предположить, что этот огромный массив воды будет способен генерировать реактивный импульс, достаточный для обеспечения перемещения отдельных митохондрий в клетках с мало структурированной цитоплазмой (например, в фибробластах или астроглиальных клетках). Неравномерное распределение VDAC по поверхности внешней митохондриальной мембраны было продемонстрировано раньше [40], и оно теоретически может обеспечивать реактивное движение целых органелл или их частей, которое мы наблюдали. Такое реактивное движение может быть рассмотрено как еще один механизм подвижности митохондрий, дополняющий уже известный механизм перемещения митохондрий, идущий с участием адаптерных моторных белков, ассоциированных с цитоскелетом [41, 42]. Эти типы движений, различающиеся по механизмам, предусматривают, что опосредованное моторными

белками перемещение митохондрий является строго энергозависимым, требующим АТФ (возможно и/или мембранного потенциала [43]), в то время как предполагаемый water-jet механизм в нефосфорилирующих условиях (при деэнергизации митохондрий, соответствующей состоянию 3и или близкому к нему) за счет активации дыхания, сопровождающейся усиленной генерацией и выходом из митохондрий воды, будет более активным, чем в покоящемся состоянии (состояние 4 или близкое к нему). Мы предполагаем, что если такой механизм митохондриальной подвижности существует, то по определению будет прямая связь между уменьшением степени сопряжения митохондрий и повышением скорости образования  $H_2O$  цитохромоксидазой и, соответственно, созданием реактивного импульса, способного обеспечить перемещение митохондрий.

### АТФ

Мы отдаем себе отчет, что глобальное обсуждение роли АТФ в клетке просто невозможно в рамках такого обзора, поэтому позволяем себе сосредоточиться лишь на тех аспектах, которые мало обсуждаются в научном мире.

Чем выше вклад нефосфорилирующего окисления в интегральное потребление кислорода митохондриями, тем больший эффект это произведет на уровне внутриклеточного АТФ, даже при сохранении энергетических затрат, не говоря уже о физиологических ситуациях, которые сопряжены с активацией метаболизма. Но прежде всего нужно понимать, что изменения уровня АТФ неотвратимо вызовут изменения в содержании его партнеров по простой схеме гидролиза-синтеза, которая очень схематично выглядит как  $ATP = ADP + P_i + H^+$ , т.е. существует полное сопряжение освобождения и связывания в системе протона с уровнем АТФ или АДФ (здесь мы опускаем роль ионов Mg, считая хелирующие способности АТФ и АДФ близкими). В любом клеточном компартменте увеличение содержания АТФ сопутствует некоторому защелачиванию компартмента, а его уменьшение сопровождается закислением. Именно это свойство и определяет возникновение ацидоза в ткани, испытывающей проблемы с доставкой энергетических субстратов и кислорода (например, при ишемии), приводящей к падению уровня АТФ в ишемизированной области. Понятно, что внутриклеточные буферы в значительной степени гасят кислотный «пожар», однако и у этих буферов есть пределы, в результате чего в ткани возникают градиенты кислотности,

при этом в областях с низкими значениями внутриклеточных pH начинают активироваться деградиационные процессы [44–46]. Повторим, что именно АТФазная активность, необходимая для выполнения внутриклеточных функций, определяет степень ацидоза, а не результат переключения на гликолитический путь, неправильно названный «лактатным ацидозом», ибо путь превращения глюкозы в молочную кислоту не сопряжен с суммарной генерацией протона (см. подробное объяснение в [47]).

Кроме этого, надо понимать, что повышение концентрации ADP, сопряженное с гидролизом АТФ, может привести к смещению равновесия аденилаткиназной реакции в направлении повышения уровня АМР, имеющего очень важное значение, в частности, через регуляцию АМР-киназной активности [48].

Другой момент, хотя и мало связанный с энергетикой, состоит в том, что АТФ, при нахождении его вне клетки, может рассматриваться как индуктор нативного воспалительного процесса из-за принадлежности АТФ к группе DAMPs (damage-associated molecular patterns) [49], и его выход из клетки возможен, в частности, при массивном или локальном повреждении ткани или как результат некротической гибели одиночных клеток. Кроме АТФ, мощными внеклеточными регуляторными функциями обладает аденозин, образующийся из АМР [50]. Надо отметить возможную связь между внутри- и внеклеточными уровнями адениновых нуклеотидов, учитывая наличие в клеточной мембране паннексина [51, 52].

## ДВУОКИСЬ УГЛЕРОДА

Одним из основных pH-буферов в организме является химически равновесная система бикарбонат/двуокись углерода ( $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ) [53, 54], отсюда ясна важная роль стационарного уровня  $\text{CO}_2$  и ее продукции в кислотном гомеостазе в митохондриях, цитоплазме, внеклеточном пространстве и крови. По определению, увеличение уровня  $\text{CO}_2$  приведет к ацидозу, а его уменьшение — к алкалозу в биологическом компартменте. В митохондриях  $\text{CO}_2$  образуется в цикле трикарбоновых кислот в двух последовательных реакциях из изоцитрата (с катализом на изоцитратдегидрогеназе) и альфа-кетоглутарата (с катализом на альфа-кетоглутаратдегидрогеназе), при этом, чем более активно функционирует цикл Кребса, тем больше образуется  $\text{CO}_2$  и тем больше вероятность закисления матрикса митохондрий. Учитывая, что при активации дыхания, в частности, при уменьшении сопряжения окисли-

тельного фосфорилирования, поток через цикл Кребса пропорциональным образом увеличивается, генерация  $\text{CO}_2$  также возрастает, внося дополнительный вклад в общее закисление.

Казалось бы, умеренное закисление обладает защитными свойствами, что было показано на примере ишемии [55], в частности за счет активации связывания белкового ингибитора (IF1) с АТФ синтазным комплексом [56], что препятствует нежелательное в условиях энергетического кризиса расходование АТФ на поддержание мембранного потенциала митохондрий в условиях гипоксии/ишемии [43, 57]. Однако было обнаружено, что простым эффектом на изменение pH роль  $\text{CO}_2$  не ограничивается. Стало известным, что возрастающие уровни двуокиси углерода и сопряженного с ней бикарбоната, например в условиях реперфузии после ишемии, напрямую действуют на процесс аутофагии, ингибируя его [58] и, тем самым, препятствуют устранению нефункциональных митохондрий, что чревато дальнейшим повреждением биологической системы [59]. Но, кроме роли в pH-регуляции,  $\text{CO}_2$  и бикарбонат несут значительную сигнальную функцию, в частности, участвуя в ряде важных редокс-реакций [60–62], при этом возрастающий уровень бикарбоната провоцирует окисление белков [63]. Очень слабая проницаемость мембран для бикарбоната нивелируется наличием специфических переносчиков для него [64–66], дефект которых приводит к патологиям, включая системный ацидоз, дисфункцию мозга и почек и гипертонию (суммировано в [63]).

В пределах физиологических значений pH  $\text{CO}_2$  в чистом виде почти не существует, в основном превращаясь в бикарбонат, который регулирует множество ферментов. Среди них аденилатциклаза [67], сукцинатдегидрогеназа [68], митохондриальная АТФаза [69, 70] и АТФ синтаза [71], что позволяет отнести  $\text{CO}_2$ /бикарбонатную систему к достаточно мощному фактору, регулирующему окислительное фосфорилирование. Недавняя находка сопрягающего действия бикарбоната [72] подтверждает эту точку зрения, указывая на еще одну точку управления механизмом разобщения окислительного фосфорилирования.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00173).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** В данной работе нет исследований, в которых были бы использованы в качестве объектов люди или животные.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F., and Porter, R. K. (1994) The causes and functions of mitochondrial proton leak, *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**, 132-139, doi: 10.1016/0005-2728(94)90099-x.
- Скулачев В. П., Маслов С. П. (1960) Роль окисления в терморегуляции, *Биохимия*, **25**, 1058-1064.
- Skulachev, V. P. (1961) Regulation of the coupling of oxidation and phosphorylation, *5th Internat. Cong. of Biochem. (Moscow)*, **5**, 367-373.
- Скулачев В. П., Маслов С. П., Сивкова В. Г. Калининченко Л. П., Маслова Г. М. (1963) Холодовое разобщение окисления и фосфорилирования в мышцах белых мышей, *Биохимия*, **28**, 70-79.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2018) Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector, *Handb. Clin. Neurol.*, **156**, 137-152, doi: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6.
- Yaniv, Y., Juhaszova, M., Nuss, H. B., Wang, S., Zorov, D. B., Lakatta, E. G., and Sollott, S. J. (2010) Matching ATP supply and demand in mammalian heart: *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* perspectives, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1188**, 133-142, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05093.x.
- Maley, G. F., and Lardi, H. A. (1953) Metabolic effects of thyroid hormones *in vitro*. II. Influence of thyroxine and triiodothyronine on oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **204**, 435-444, PMID: 13084614.
- Hoch, F. L., and Lipmann, F. (1954) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **40**, 909-921, doi: 10.1073/pnas.40.10.909.
- Dickens, F., and Salmony, D. (1956) Effects of thyroid hormones *in vitro* on tissue respiration, oxidative phosphorylation and the swelling of mitochondria, *Biochem. J.*, **64**, 645-651, doi: 10.1042/bj0640645.
- Skulachev, V. P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 100-124, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00091-1.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
- Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. Yu., and Zorova, L. D. (1997) Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 507-520, doi: 10.1023/a:1027304122259.
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L., and Sollott, S. J. (2000) Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *J. Exp. Med.*, **192**, 1001-1014, doi: 10.1084/jem.192.7.1001.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 509-517, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.04.029.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909-950, doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
- Зоров Д. Б., Банникова С. Ю., Белоусов В. В., Высоких М. Ю., Зорова Л. Д., Исаев Н. К., Красников Б. Ф., Плотников Е. Ю. (2005) Активные формы кислорода и азота: друзья или враги, *Биохимия*, **70**, 215-221.
- Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, doi: 10.1038/2221076a0.
- Andreyev, A. Yu., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., Tsofina, L. M., Volkov, N. I., and Vygodina, T. V. (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **182**, 585-592, doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14867.x.
- Wieckowski, M. R., and Wojtczak, L. (1997) Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**, 414-417, doi: 10.1006/bbrc.1997.6298.
- Samartsev, V. N., Smirnov, A. V., Zeldi, I. P., Markova, O. V., Mokhova, E. N., and Skulachev, V. P. (1997) Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 251-257, doi: 10.1016/s0005-2728(96)00166-1.
- Rupprecht, A., Sokolenko, E. A., Beck, V., Ninnemann, O., Jaburek, M., Trimbuch, T., Klishin, S. S., Jezek, P., Skulachev, V. P., and Pohl, E. E. (2010) Role of the transmembrane potential in the membrane protein leak, *Biophys. J.*, **98**, 1503-1511, doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4301.
- Bertholet, A. M., Chouchani, E. T., Kazak, L., Angelin, A., Fedorenko, A., et al. (2019) H<sup>+</sup> transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Nature*, **571**, 515-520, doi: 10.1038/s41586-019-1400-3.
- Chrétien, D., Bénéit, P., Ha, H. H., Keipert, S., El-Khoury, R., et al. (2018) Mitochondria are physiologically maintained at close to 50°C, *PLoS Biol.*, **16**, e2003992, doi: 10.1371/journal.pbio.2003992.
- Starkov, A. A., Dedukhova, V. I., and Skulachev, V. P. (1994) 6-Ketocholestanol abolishes the effect of the most potent uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria, *FEBS Lett.*, **355**, 305-308, doi: 10.1016/0014-5793(94)01211-3.
- Lehninger, A. L. (1962) Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation, *Physiol. Rev.*, **42**, 467-517, doi: 10.1152/physrev.1962.42.3.467.
- Solenski, N. J., diPierro, C. G., Trimmer, P. A., Kwan, A. L., and Helm, G. A. (2002) Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia, *Stroke*, **33**, 816-824, doi: 10.1161/hs0302.104541.
- Kaasik, A., Kuum, M., Joubert, F., Wilding, J., Ventura-Clapier, R., and Veksler, V. (2010) Mitochondria as a source of mechanical signals in cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.*, **87**, 83-91, doi: 10.1093/cvr/cvq039.
- Zorov, D. B., Vorobjev, I. A., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Zorova, L. D., et al. (2019) Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): a review and update, *Cells*, **8**, 175, doi: 10.3390/cells8020175.
- Ware, A. J., D'Agostino, A. N., and Combes, B. (1971) Cerebral edema: a major complication of massive hepatic necrosis, *Gastroenterology*, **61**, 877-884, PMID: 125688.
- Durward, Q. J., Del Maestro, R. F., Amacher, A. L., and Farrar, J. K. (1983) The influence of systemic arterial pressure and intracranial pressure on the development of cerebral vasogenic edema, *J. Neurosurg.*, **59**, 803-809, doi: 10.3171/jns.1983.59.5.0803.
- Preston, E., and Webster J. (2004) A two-hour window for hypothermic modulation of early events that impact delayed opening of the rat blood-brain barrier after ischemia, *Acta Neuropathol.*, **108**, 406-412, doi: 10.1007/s00401-004-0905-4.
- Schmidt, B., McCracken, J., and Ferguson-Miller, S. (2003) A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15539-15542, doi: 10.1073/pnas.2633243100.

33. Zimmerberg, J., and Parsegian, V. A. (1987) Water movement during channel opening and closing, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19**, 351-358, doi: 10.1007/BF00768538.
34. Gena, P., Fanelli, E., Brenner, C., Svelto, M., and Calamita, G. (2009) News and views on mitochondrial water transport, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **14**, 4189-4419, doi: 10.2741/3522.
35. Lee, W. K., and Thévenod, F. (2006) A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, 195-202, doi: 10.1152/ajpcell.00641.2005.
36. Calamita, G., Gena, P., Meleleo, D., Ferri, D., and Svelto, M. (2006) Water permeability of rat liver mitochondria: a biophysical study, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1018-1024, doi: 10.1016/j.bbame.2006.07.008.
37. Saparov, S. M., Liu, K., Agre, P., and Pohl, P. (2007) *In vitro* analysis and modification of aquaporin pore selectivity, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5296-5301, doi: 10.1074/jbc.M609343200.
38. Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S. H., Pepe, S., Fu, Q., et al. (2004) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore, *J. Clin. Invest.*, **113**, 1535-1549, doi: 10.1172/JCI19906.
39. Halestrap, A. P. (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria *in vivo* and *in vitro* and its role in the control of mitochondrial metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 355-382, doi: 10.1016/s0005-2728(89)80378-0.
40. Konstantinova, S. A., Mannella, C. A., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1995) Immunoelectron microscopic study of the distribution of porin on outer membranes of rat heart mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 93-99, doi: 10.1007/BF02110336.
41. Maeder, C. I., Shen, K., and Hoogenraad, C. C., (2014) Axon and dendritic trafficking, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **27**, 165-170, doi: 10.1016/j.conb.2014.03.015.
42. Melkov, A., and Abdu, U. (2018) Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 163-176, doi: 10.1007/s00018-017-2590-1.
43. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., et al. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.
44. Rizack, M. A. (1964) An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue, *J. Biol. Chem.*, **236**, 657-662, PMID: 14169136.
45. Eastman, A. (1994) Deoxyribonuclease II in apoptosis and the significance of intracellular acidification, *Cell Death Differ.*, **1**, 7-9, PMID: 17180001
46. Gottlieb, R. A., Giesing, H. A., Zhu, J. Y., Engler, R. L., and Babior, B. M. (1995) Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5965-5968, doi: 10.1073/pnas.92.13.5965.
47. Silachev, D. N., Gulyaev, M. V., Zorova, L. D., Khailova, L. S., Gubsky, L. V., et al. (2015) Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke, *Chem. Biol. Interact.*, **237**, 175-182, doi: 10.1016/j.cbi.2015.06.012.
48. Steinberg, G. R., and Kemp, B. E. (2009) AMPK in health and disease, *Physiol. Rev.*, **89**, 1025-1078, doi: 10.1152/physrev.00011.2008.
49. Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature*, **464**, 104-107, doi: 10.1038/nature08780.
50. Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., and Varani, K. (2015) Pharmacology of adenosine receptors: the state of the art, *Physiol. Rev.*, **98**, 1591-1625, doi: 10.1152/physrev.00049.2017.
51. Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP, *J. Neurosci.*, **28**, 4702-4711, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008.
52. Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., et al. (2010) Pannexin 1 channels mediate "find-me" signal release and membrane permeability during apoptosis, *Nature*, **467**, 863-867, doi: 10.1038/nature09413.
53. Roos, A., and Boron, W. F. (1981) Intracellular pH, *Physiol. Rev.*, **61**, 296-434, doi: 10.1152/physrev.1981.61.2.296.
54. Aickin, C. C. (1986) Intracellular pH regulation by vertebrate muscle, *Annu. Rev. Physiol.*, **48**, 349-361, doi: 10.1146/annurev.ph.48.030186.002025.
55. Inserte, J., Barba, I., Hernando, V., Abellán, A., Ruiz-Meana, M., Rodríguez-Sinovas, A., and Garcia-Dorado, D. (2008) Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage, *Cardiovasc. Res.*, **77**, 782-790, doi: 10.1093/cvr/cvm082.
56. Pullman, M. E., and Monroe, G. C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3762-3769, PMID: 14109217.
57. Di Lisa, F., Blank, P. S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H. S., Stern, M. D., and Hansford, R. G. (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition, *J. Physiol.*, **486**, 1-13, doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020786.
58. Queliconi, B. B., Kowaltowski, A. J., and Gottlieb, R. A. (2016) Bicarbonate increases ischemia-reperfusion damage by inhibiting mitophagy, *PLoS One*, **11**, e0167678, doi: 10.1371/journal.pone.0167678.
59. Zorov, D. B., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Vorobjev, I. A., Pevzner, I. B., et al. (2017) Mitochondrial aging: is there a mitochondrial clock? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 1171-1179, doi: 10.1093/gerona/glw184.
60. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2002) Copper, zinc superoxide dismutase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*, **277**, 34674-34678, doi: 10.1074/jbc.M204726200.
61. Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer, *IUBMB Life*, **59**, 255-262, doi: 10.1080/15216540701230511.
62. Queiroz, R. F., Paviani, V., Coelho, F. R., Marques, E. F., Di Mascio, P., and Augusto, O. (2013) The carbonylation and covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol, *Biochem. J.*, **455**, 37-46, doi: 10.1042/BJ20130180.
63. Queliconi, B. B., Marazzi, T. B., Vaz, S. M., Brookes, P. S., Nehrke, K., Augusto, O., and Kowaltowski, A. J. (2013) Bicarbonate modulates oxidative and functional damage in ischemia-reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.*, **55**, 46-53, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.007.
64. Kumar, S., Flacke, J., Kostin, S., Appukuttan, A., Reusch, H. P., and Ladilov, Y. (2011) SLC4A7 sodium bicarbonate cotransporter controls mitochondrial apoptosis in ischaemic coronary endothelial cells, *Cardiovasc. Res.*, **89**, 392-400, doi: 10.1093/cvr/cvq330.
65. Alka, K., and Casey, J. R. (2014) Bicarbonate transport in health and disease, *IUBMB Life*, **66**, 596-615, doi: 10.1002/iub.1315.



66. Nozik-Grayck, E., Huang, Y.-C. T., Carraway, M. S., and Piantadosi, C. (2003) Bicarbonate-dependent superoxide release and pulmonary artery tone, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, 2327-2335, doi: 10.1152/ajpheart.00507.2003.
67. Acin-Perez, R. Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R., and Manfredi, G. (2009) Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation, *Cell Metabol.*, **9**, 265-276, doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.012.
68. Zeylemaker, W. P., Klaasse, A. D. Slater, E. C., and Veeger, C. (1970) Studies on succinate dehydrogenase. VI. Inhibition by monocarboxylic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 415-422, doi: 10.1016/0005-2744(70)90120-8.
69. Kasho, V. N., and Boyer, P. D. (1984) Relationships of inosine triphosphate and bicarbonate effects on F1-ATPase to the binding change mechanism, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **16**, 407-419, doi: 10.1007/BF00743235.
70. Roveri, O. A., and Calcaterra, N. B. (1985) Steady-state kinetic of F1-ATPase. Mechanism of anion activation, *FEBS Lett.*, **192** 123-127, doi: 10.1016/0014-5793(85)80056-9.
71. Lodeyro, A. F. Calcaterra, N. B., and Roveri, O. A. (2001) Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1506**, 236-243, doi: 10.1016/s0005-2728(01)00221-3.
72. Khailova, L. S., Vygodina, T. V., Lomakina, G. Y., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Bicarbonate suppresses mitochondrial membrane depolarization induced by conventional uncouplers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **530**, 29-34, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.131.

## NONPHOSPHORYLATING OXIDATION IN MITOCHONDRIA AND RELATED PROCESSES

### Review

**D. B. Zorov<sup>1,2\*</sup>, N. V. Andrianova<sup>1</sup>, V. A. Babenko<sup>1,2</sup>, L.E. Bakeeva<sup>1</sup>, S. D. Zorov<sup>3</sup>, L. D. Zorova<sup>1,2</sup>, I. B. Pevzner<sup>1,2</sup>, V. A. Popkov<sup>1,2</sup>, E. Y. Plotnikov<sup>1,2,4</sup>, and D. N. Silachev<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: zorov@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 117997 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia*

Received July 28, 2020

Revised September 17, 2020

Accepted September 17, 2020

The mechanism of oxidative phosphorylation and its regulation remain one of the main problems of bioenergetics. Efficiency of the mitochondrial energization is determined by the relationship between the rate of generation of electrochemical potential of hydrogen ions and the rate of its expenditure on the synthesis of ATP and the use of ATP in endergonic reactions. Uncoupling (partial or complete), which occurs in the process of uncontrolled and controlled leakage of ions through the inner mitochondrial membrane, on the one hand leads to the decrease in the relative synthesis of ATP, and on the other, being consistent with the law of conservation of energy, leads to the formation of heat, generation of which is an essential function of the organism. In addition to increased thermogenesis, the increase of non-phosphorylating oxidation of various substrates is accompanied by the decrease in transmembrane potential, production of reactive oxygen species, and activation of oxygen consumption, water and carbon dioxide production, increase in the level of intracellular ADP and acidification of the cytosol. In this review, each of these factors will be considered separately for its role in regulating metabolism.

*Keywords:* mitochondria, water, thermogenesis, swelling, bioenergetics, uncoupling