

УДК 577.352

МЕХАНИЗМ ЗАПАСАНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В МИТОХОНДРИЯХ НА МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЕ ВОДА-МЕМБРАНА

Обзор

© 2022 С.В. Нестеров^{1,2}, Е.Г. Смирнова³, Л.С. Ягужинский^{2,3,4*}

¹ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: yag@genebee.msu.ru

⁴ НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.12.2021

После доработки 11.01.2022

Принята к публикации 13.01.2022

В данном аналитическом обзоре на модельных и природных системах рассмотрены разные способы генерации мембраносвязанных протонов, использующие различные внешние источники энергии. Анализ показал, что все три рассмотренных типа реакций содержат одинаковую ключевую стадию синтеза мембраносвязанных протонов – диссоциацию электронейтральных кислот Бренстеда на межфазной границе при переходе из гидрофобной фазы в воду с низкой диэлектрической постоянной. Особое внимание в работе обращается на то, что на одной из анализируемых модельных систем мембраносвязанные протоны обеспечивают энергией реакцию синтеза АТФ. В обзоре приводятся данные, показывающие, что аналогичный механизм синтеза мембраносвязанных протонов в системе окислительного фосфорилирования осуществляется также на природных мембранах, в частности, на мембранах митопластов и митохондрий. Анализ показал, что энергия окислительных реакций, которая обеспечивает синтез АТФ, на промежуточной стадии запасается не только в форме трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода, но также, и может быть даже в первую очередь, в форме фракции ионов водорода, лабильно связанных с поверхностью внутренней мембраны митохондрий. Процесс запасания энергии в митохондриях неразрывно связан с переносом ионов водорода, которые одновременно исполняют две функции. Фракция ионов водорода на поверхности мембраны является переносчиком и носителем свободной энергии и в то же время непосредственным субстратом (рабочим телом), обеспечивающими движение рабочих элементов сложной биологической машины, которой является F_1F_0 -АТФ-синтаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембраносвязанный протон, ион водорода, мембрана, митохондрии, окислительное фосфорилирование, суперконденсатор.

DOI: 10.31857/S0320972522020063

ВВЕДЕНИЕ

В настоящем обзоре проведён анализ данных об участии протона в начальной стадии запасания энергии в митохондриях. Акцент в обзоре сделан на работах, выполненных ранее в нашей лаборатории, однако анализ данных осуществляется с учётом экспериментов других исследовательских групп. Показано, что запасание энергии в митохондриях осуществляется путём реакции связывания ионов водорода с мембраной с образованием фракции мембраносвязанных протонов, обладающих избытком

свободной энергии Гиббса, то есть той энергии, которая может быть использована для совершения системой полезной работы. В работе на основе имеющихся опубликованных экспериментальных данных анализируются свойства мембраносвязанных протонов и показывается их участие в реакциях синтеза АТФ. Фракция мембраносвязанных протонов, согласно проведённому анализу, обладает свободной энергией в двух формах. Часть этой энергии обусловлена локальным концентрационным потенциалом, создаваемым градиентом ионов водорода в примембранном слое. Другая часть обусловлена особенностями гидратной оболочки H^+ -ионов, образуемой в процессе их сольватации на межфазной границе. Далее в тексте именно эти компоненты энергии будут подразумеваться под избытком свободной энергии фракции

Принятые сокращения: БЛМ – бислоенная липидная мембрана; ОКСФОС – окислительное фосфорилирование.

* Адресат для корреспонденции.

мембраносвязанных протонов, а процессы, приводящие к их формированию, подробно проанализированы.

Как известно, П. Митчелл постулировал, что первичным аккумулятором энергии окислительных реакций митохондрий является электрорхимический потенциал ионов водорода, который образуется при трансмембранном переносе протонов [1]. Гипотеза Митчелла была многократно экспериментально подтверждена, в частности, работами Skulachev et al. [2], Liberman et al. [3] и Drachev et al. [4], которые доказали присутствие электрического поля на внутренней мембране митохондрий в процессе работы системы окислительного фосфорилирования (ОКСФОС). Одновременно с П. Митчеллом в 1961 г. Р. Вильямс предложил модель протонного сопряжения, в которой начальной стадией запасаения энергии является реакция прямого взаимодействия ионов водорода с полупроницаемой мембраной [5]. Позднее Д. Келл в 1979 г. на основе модели П. Митчелла, согласно которой протон, не взаимодействуя с мембраной, пересекает её, предложил свою модель, согласно которой, напротив, протоны взаимодействуют с мембраной и накапливаются в непосредственной близости от неё. Это позволило ему объяснить наблюдаемый на алкалофильных бактериях эффект синтеза АТФ при чрезвычайно низком градиенте ионов водорода [6]. Однако следует отметить, что введение в модель Митчелла дополнительной стадии торможения ионов водорода при взаимодействии их с мембраной фактически трансформировало модель Митчелла в модель Вильямса, согласно которой начальной стадией запасаения энергии является взаимодействие протона с мембраной. Важно указать, что в алкалофильных бактериях, согласно модели Келла, система ОКСФОС функционирует в полном согласии с моделью Вильямса, поскольку начальная стадия взаимодействия протона с мембраной действительно контролирует работу всей системы ОКСФОС. Интересно отметить, что П. Митчелл в одной из своих поздних работ тоже признал, что большая часть протонов локализована в примембранных зонах и лишь незначительная часть протонного тока обеспечивается протонами в объёмной фазе [7].

Для того чтобы реализовалось прямое протонное сопряжение по Вильямсу, ион водорода должен некоторое время удерживаться на мембране, образуя с ней лабильную связь. Впервые эффект связывания ионов водорода с поверхностью мембран был обнаружен на фотосистемах: в работах Юнге на мембранах тилакоидов (согласно [6]) и в работе Драчева и соавт. на родопсиновых бляшках [8]. В нашей

лаборатории в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, совместно с лабораторией Института электрохимии РАН на модельной системе было показано, что энергия ионов водорода, образующихся на межфазной границе, может быть использована АТФ-синтазой в реакции синтеза АТФ [9]. Дальнейшие исследования в ряде лабораторий показали, что связанные с мембраной ионы водорода обладают высокой подвижностью и переносятся вдоль мембранной границы гораздо быстрее, чем обмениваются с водной фазой [10–15]. Так как энергия мембранной фракции протонов достаточна для обеспечения синтеза АТФ [9, 16, 17], стадия транспорта протонов вдоль поверхности мембраны, по-видимому, включена в работу суперкомплекса ОКСФОС, содержащего электрон-транспортную систему (за исключением комплекса II) и АТФ-синтазу [18].

Несмотря на значительный прогресс, точный механизм удержания протонов на межфазной границе до сих пор является предметом дискуссий [19, 20]. Первая часть настоящего аналитического обзора посвящена в основном описанию реакций мембраносвязанных протонов на модельных системах и в митохондриях. Во второй части дано описание реакций синтеза АТФ, протекающих с участием мембраносвязанных протонов.

ОБРАЗОВАНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

В работе рассмотрены три способа синтеза мембраносвязанных протонов, обладающих избытком свободной энергии, но при этом использующих разные внешние источники энергии. Анализ показал, что все три типа реакций протекают в одинаковых условиях — на межфазной границе гидрофобной фазы с водой, то есть в зоне, где вода, как известно, обладает сниженной диэлектрической постоянной [21]. Во всех случаях мембраносвязанные ионы водорода синтезируются из электронейтральных кислот Бренстеда в процессе их диссоциации на границе раздела фаз при переходе из гидрофобной фазы в воду с низкой диэлектрической постоянной, в результате чего вновь образовавшаяся гидратная оболочка протона имеет размер меньший, чем в водной фазе. Первый способ — перенос протона на межфазную границу в процессе K^+/H^+ -обмена на липидном бислое (за счёт использования энергии градиента ионов калия). Второй способ — синтез мембраносвязанных протонов на межфазной границе октанового раствора в условиях диссоциации кислоты Бренсте-

да; регистрация синтеза АТФ за счёт избытка свободной энергии ионов водорода, связанных с межфазной границей. Третий способ – образование мембраносвязанных протонов (caged-H^+) в результате гидролиза электрофильных соединений на гидрофобной поверхности на границе раздела. Все эти способы более подробно будут рассмотрены далее.

Анализ показал, что во всех трёх случаях, независимо от источников энергии и природы исходной химической реакции, терминальная стадия синтеза энергизованных мембраносвязанных протонов протекает по одинаковому механизму, и энергия запасается в форме фракции энергизованных протонов. Энергия этой фракции распределена между мембраносвязанными ионами водорода и мембраной.

Для регистрации и измерения величины граничных потенциалов на мембране при образовании фракции мембраносвязанных ионов водорода наиболее часто используют метод компенсации внутримембранного поля [22] и метод регистрации изменений поверхностного заряда (ζ -потенциала) [23, 24]. В последнем случае часто используется прибор Malvern Zetasizer, который сочетает метод электрофореза в переменном электрическом поле с регистрацией скорости движения объекта [23]. Вышеуказанные методы дают различающиеся величины потенциалов, однако из ζ -потенциала может быть рассчитан граничный потенциал по модели Гуи–Чепмена с учётом того, что расстояние от поверхности мембраны до плоскости скольжения для липидных мембран составляет около 0,2 нм [25].

Генерация мембраносвязанных протонов на искусственных бислойных липидных мембранах (БЛМ) с использованием градиента ионов калия. С помощью метода регистрации внутримембранного поля было впервые зарегистрировано образование фракции мембраносвязанных протонов на БЛМ из фосфолипидов [26]. Для наглядной демонстрации этих ключевых экспериментов на БЛМ они будут подробно описаны далее и схематично проиллюстрированы на рис. 1 и 2. Эффект генерации фракции мембраносвязанных протонов был зарегистрирован в условиях индукции K^+/H^+ -обмена на БЛМ. Для этого был использован электронейтральный K^+/H^+ -обменник, нигерицин, со стехиометрией 1 : 1. В молекуле нигерицина роль переносчика протона выполняет протонированная карбоксильная группа, диссоциация которой происходит на межфазной границе с образованием мембраносвязанного протона. В качестве источника энергии для индукции потока ионов водорода через мембрану был создан высокий

градиент ионов калия [26]. Полная схема переноса протона через мембрану с помощью нигерицина при наличии градиента ионов калия представлена на рис. 1. На рисунке также показано, что в этих условиях образуются две фракции ионов водорода – фракция мембраносвязанных протонов на поверхности липидного бислоя и, как отмечалось выше, фракция ионов водорода в так называемом неперемешиваемом слое воды. Толщина неперемешиваемого слоя водной фазы порядка 100 мкм, и его необходимо отличать от межфазной границы вода-мембрана, где находятся мембраносвязанные протоны, и толщина которой составляет всего несколько ангстрем. При K^+/H^+ -обмене закисление неперемешиваемого слоя происходит в результате протекания непрерывного процесса отрыва мембраносвязанных ионов водорода от «cis»-поверхности БЛМ.

На рис. 1 показано, что фракция мембраносвязанных протонов возникает и существует как стационарное состояние системы. При этом роль источника энергии выполняет градиент ионов K^+ . Объём этой фракции определяется соотношением скоростей подачи и отрыва H^+ -ионов на «cis»-поверхности БЛМ. Фракция мембраносвязанных протонов является стационарной (но неравновесной) энергозависимой структурой, возникающей в системе «БЛМ/нигерицин/градиент K^+ ». Таким образом, весь объём фракции мембраносвязанных протонов, пока существует градиент ионов калия, непрерывно обновляется. При этом в результате отрыва мембраносвязанных протонов от поверхности мембраны поддерживается низкое значение рН в неперемешиваемом водном слое. Повторная гидратация протонов на «cis»-стороне мембраны происходит в гидрофобной фазе примембранного слоя с низкой диэлектрической постоянной [21]. При этом формируется новая гидратная оболочка меньших размеров. Свойства воды на заряженных межфазных границах описаны в работе Gonella et al. [27]. Фракция мембраносвязанных протонов, образовавшаяся в результате переноса нигерицин- H^+ через мембрану, на рис. 1 обведена красным овалом.

Для измерения закисления в неперемешиваемом слое у поверхности БЛМ был использован разработанный метод [28], который позволил проводить регистрацию быстрых изменений рН. В систему добавлялся разбавитель (протонофор), который трансформировал локальный градиент рН на БЛМ в электрохимический потенциал ионов водорода, который уже может быстро измеряться потенциометрическим методом. Результаты таких измерений приведены на рис. 2. На рис. 2, б приведены

Механизм образования мембраносвязанного протона H^+ при переносе через мембрану в присутствии нигерицина (Nig)

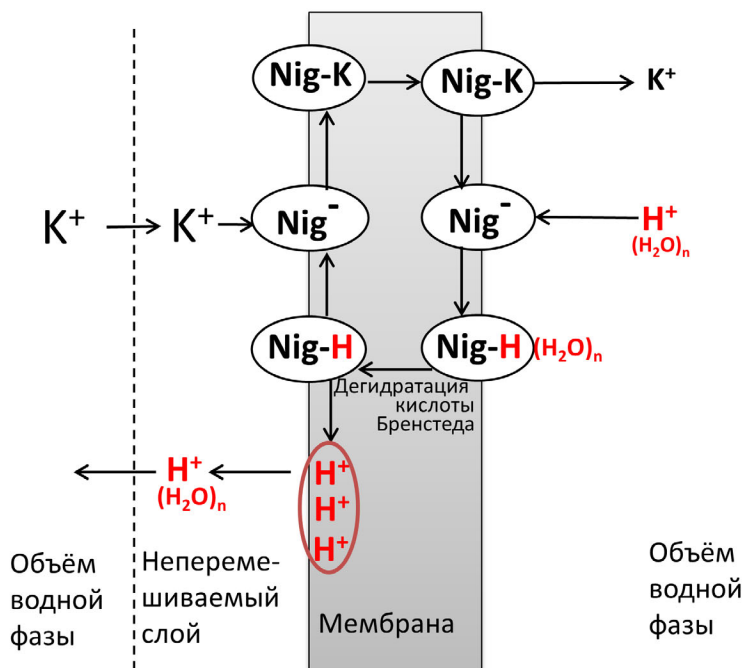


Рис. 1. Схема генерации фракции мембраносвязанных протонов на БЛМ на межфазной границе при K^+/H^+ -обмене на нигерицине. Неравновесно связанные с мембраной протоны имеют изменённую гидратную оболочку (то есть в среднем отличающуюся от таковой в объёме) и обладают избытком свободной энергии. На рисунке фракция этих протонов обозначена красным овалом

кривые изменения потенциала, происходящие при изменении активности H^+ в примембранном слое в присутствии разбавителя.

Такой подход позволил также отделить процесс закисления в примембранном слое от процессов на межфазной границе. Образующийся избыток протонов в неперемешиваемом водном слое препятствовал прямой регистрации фракции мембраносвязанных протонов и исследованию её свойств. Для регистрации вклада фракции мембраносвязанных протонов в граничный потенциал на БЛМ закисление в неперемешиваемом слое необходимо было устранить. Это было достигнуто за счёт создания противоположно направленного потока протонов через мембрану на ацетате (рис. 2, а) [29]. Как показали эксперименты, отрицательно заряженный ацетат-анион, как и разбавители, не способен взаимодействовать с мембраносвязанными протонами. Однако при этом ацетат связывается с протонами в неперемешиваемом слое, после чего в нейтральной форме переходит вместе с захваченным протоном через межфазную границу на другую сторону мембраны (рис. 2). Избирательное удаление избытка про-

тонов из неперемешиваемого слоя с помощью ацетата позволило отдельно исследовать фракцию мембраносвязанных протонов, которая не взаимодействует с ацетатом.

Важно указать ещё раз, что эффект образования мембраносвязанных протонов, представленный на рис. 2, был получен в присутствии разбавителя. Этот результат показал, что разбавитель в обычно используемых концентрациях (1–10 мкМ) не рассеивает энергию мембраносвязанных протонов. Для взаимодействия с этой фракцией протонов были синтезированы специальные поверхностно-активные разбавители (более подробно эти соединения обсуждались в обзоре Eretneev и Yaguzhinsky [30]).

Катализ реакции отрыва протона от поверхности мембраны. Как было показано в работе Antonenko et al. [26], в присутствии нигерицина и градиента K^+ на БЛМ формируется фракция мембранных протонов, которая может быть удалена с поверхности добавлением слабых оснований Льюиса (в концентрации порядка 10 мМ). Поскольку слабые основания, как известно, обладают буферными свойствами, подобные эффекты многие авторы объясняют

действием этих веществ в качестве буферов. Согласно такому объяснению, следовало ожидать, что добавление буферов в систему, представленную на рис. 1, будет уменьшать скачок рН в примембранном слое при K^+/H^+ -обмене. Однако, как показал эксперимент, добавление в систему, представленную на рис. 2, б, слабого основания Льюиса (цитрата) вызывает прямо противоположный эффект. Добавление цитра-

та, напротив, резко увеличивает градиент рН (только в условиях K^+/H^+ -обмена), что свидетельствует об ускорении реакции отрыва мембраносвязанного протона от поверхности бислоя. Это полностью противоречит ожидаемому буферному эффекту цитрата, который должен проявляться как снижение градиента рН. Необходимо отметить, что при повышении концентраций оснований Льюиса иногда мож-

- а Удаление протонов из неперемешиваемого слоя с помощью индукции потока H^+ -ионов V_2 в связанной с ацетатом форме ($RCOOH$) в направлении, противоположном потоку протонов на нигерицине V_1 . Полное удаление достигается при $V_1=V_2$

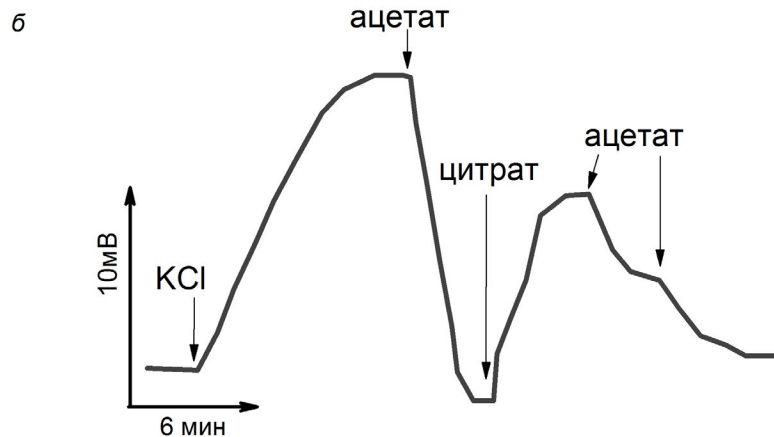
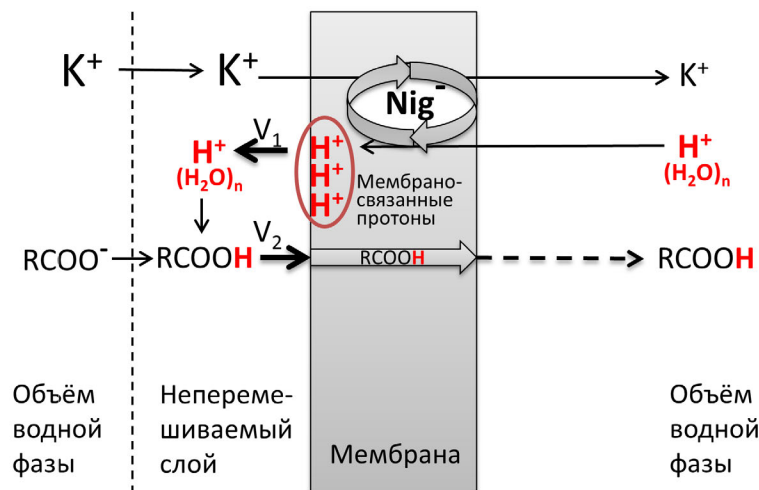


Рис. 2. Метод встречных потоков протонов. а – Схема удаления (путём титрования ацетатом) локального градиента рН, возникающего в неперемешиваемом слое при переносе протонов через мембрану на нигерицине (Nig), с помощью создания противоположно направленного потока протонов. б – Пример использования потенциометрического метода для регистрации изменений рН в примембранном слое БЛМ в процессе его удаления нарастающими концентрациями ацетата. Величина ΔpH пропорциональна величине мембранного потенциала, возникающего на мембране в присутствии разбавителя (см. выше). Величина первой добавки ацетата, полностью снимающей градиент рН, определена путём титрования в предварительных экспериментах. После удаления «первичного» градиента рН в примембранном слое добавка катализатора отрыва протона (цитрата) повторно создаёт рН-градиент в примембранном слое БЛМ за счёт увеличения скорости V_1 . Полное удаление вновь появившегося градиента рН достигается с помощью титрования небольшими порциями ацетата. Рисунок построен по данным работы [31]

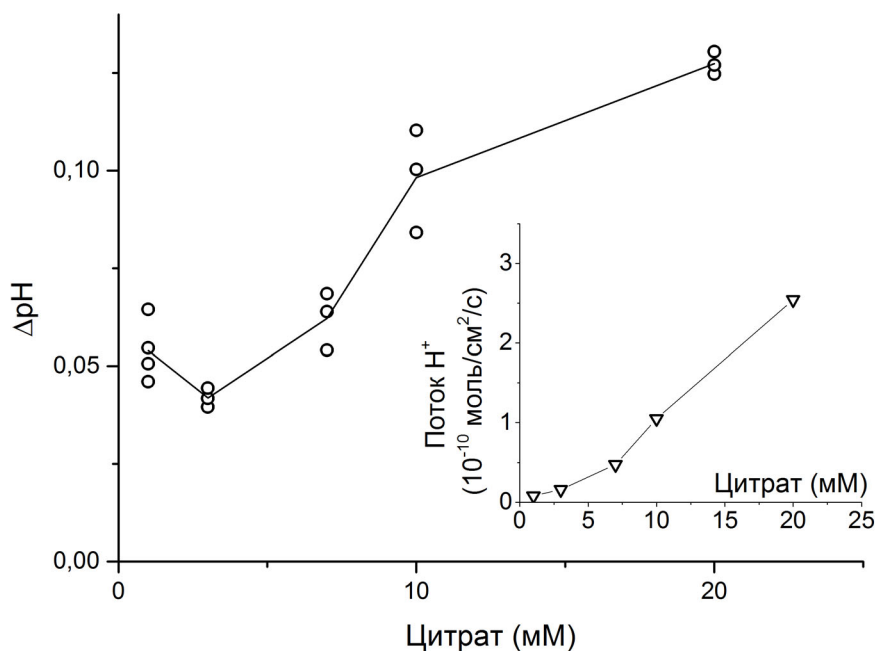


Рис. 3. Прямая регистрация с помощью рН-микроэлектрода изменений рН в примембранном слое БЛМ при нарастающей скорости отрыва мембранных протонов (прямое доказательство увеличения скорости отрыва мембранных протонов под действием катализатора – слабого основания Льюиса). Измерения проводились в условиях генерации мембранных протонов на «cis»-стороне БЛМ в присутствии нигерицина и градиента ионов K^+ . Ускорение отрыва протонов с «cis»-стороны БЛМ достигалось за счёт увеличения концентрации катализатора отрыва протонов – цитрата. На вставке – возрастание величины потока H^+ -ионов через мембрану (10^{-10} моль/см²/с) при увеличении концентрации цитрата. Рисунок взят из работы [32] (с разрешения издательства Wiley)

но также наблюдать их слабый буферный эффект. Таким образом, удаление градиента рН в примембранном слое [26] позволило показать присутствие граничного потенциала на БЛМ в условиях K^+/H^+ -обмена и независимо доказать каталитический механизм реакции отрыва ионов водорода от поверхности мембраны.

Данные работы Evtodienko et al. [32] (рис. 3), в которой при помощи микроэлектрода было проведено прямое измерение рН в примембранном слое БЛМ, также показали, что слабые основания не только не снижают градиент рН, но резко повышают концентрацию ионов водорода в примембранном слое. В этой работе также была измерена скорость трансмембранного потока ионов водорода, которая увеличивалась при добавлении цитрата (вставка на рис. 3), что явно свидетельствует не о буферном, а о каталитическом эффекте слабых оснований. Таким образом, было надёжно зарегистрировано наличие каталитической активности слабых оснований Льюиса в реакции отрыва протона от мембраны. Это является прямым доказательством существования неравновесной фракции связанных с мембраной протонов, которая в форме граничного потенциала запасает энергию градиента ионов калия.

Синтез мембраносвязанных протонов в реакции гидролиза электрофильных соединений (caged- H^+) в зоне межфазной границы мембрана-вода. Генерацию мембраносвязанных протонов можно осуществить за счёт высвобождения сильной кислоты при гидролизе caged- H^+ на межфазной границе. Caged- H^+ принято называть соединения, относящиеся к классу электрофильных веществ (например, эфиров сульфокислот или галоидалкиламинов), которые на поверхности мембран митохондрий и БЛМ могут гидролизироваться с выделением сильных H^+ -кислот. Высвобождающиеся при этом протоны, как и в случае трансмембранного переноса, какое-то время удерживаются на межфазной границе мембрана-вода. Этот подход был реализован в нашей лаборатории в начале 80-х гг. прошлого века с использованием электрофильных соединений ряда β -галоидалкиламинов, обладающих спонтанной реакционной способностью, гидролиз которых эффективно происходит на межфазной границе мембрана-вода [33]. В результате было показано, что генерация избытка протонов на поверхности внутренней мембраны митохондрий блокирует работу всех трёх протонных помп за счёт резкого повышения локальной активности ионов водорода.

Важность этих результатов в том, что они получены на митохондриях. При этом очевидно, что мембраносвязанные протоны стабилизированы на поверхности митохондриальных мембран и не подвергаются избыточной гидратации и отщеплению от мембраны митохондрий. Эти результаты хорошо согласуются с более поздними работами на модельных мембранах, в том числе с теми, в которых был реализован более удобный и контролируемый вариант saged-H^+ , в которых реакция освобождения ионов водорода индуцируется ультрафиолетовым (УФ) излучением [34]. Результаты, полностью согласующиеся с выводами работ на БЛМ с нигерицином, описанными выше, были независимо подтверждены при генерации мембраносвязанных протонов с помощью высвобождения saged-H^+ (возбуждения УФ-излучением молекул 2-метокси-5-нитрофенилсульфата) [22]. Во всех случаях регистрировалось образование фракции мембраносвязанных протонов, которая каталитически удалялась с поверхности мембраны слабыми основаниями Льюиса.

Особенно необходимо отметить экспериментальные исследования кинетики диффузии протона вдоль плоской бислойной мембраны, проведённые П. Полем и Ю. Антоненко с соавт., с использованием УФ-активируемых saged-H^+ [35]. Связанные с мембраной saged-H^+ высвобождали с помощью УФ-вспышек, и отслеживали их диффузию на различное расстояние в отдалённые области мембраны, которая регистрировалась по флуоресценции встроенного в мембрану рН-зонда. В результате удалось показать высокую подвижность протона на поверхности (одного порядка, но меньшую, чем в объёмной фазе дистиллированной воды), а также то, что расстояние, преодолеваемое протоном вдоль поверхности, снижается при увеличении концентрации мобильных рН-буферов (катализаторов отрыва протонов) [35]. Исследование химически различных бислойных мембран позволило также показать, что быстрая диффузия протонов по поверхности происходит за счёт движения протона по молекулам воды по механизму Гроттгуса [36], а не за счёт скачков между закреплёнными на мембране участками связывания протонов (иммобилизованными рН-буферами), как предполагалось до этого в ряде работ (см. ссылки в [36]).

Эксперименты по исследованию кинетики движения мембраносвязанных протонов позволили также оценить энергию активации отрыва протона от поверхности мембраны в водную фазу для различных липидов и показать, что она на порядок превышает тепловую энергию [15, 36]. Суммарно, согласно выводам авторов этих ра-

бот, такая высокая энергия отрыва протонов от поверхности мембраны связана с необходимостью перестройки цепочек водородных связей в больших кластерах молекул воды при удалении протона с межфазной границы [15].

О роли молекул воды в связывании протонов с поверхностью искусственных мембран. С целью выяснения участия молекул воды в образовании связи протонов с поверхностью мембран были проведены эксперименты с использованием тяжёлой воды. В экспериментах на БЛМ с нигерицином, где скорость реакции отрыва мембраносвязанных протонов от поверхности мембраны лимитировала скорость переноса протонов в объём водной фазы, было обнаружено, что в тяжёлой воде скорость потока протонов через мембрану снижается [31]. При малых концентрациях катализатора отрыва протонов (цитрата) изотопный эффект при замене H_2O на D_2O составлял лишь 30%. Однако при высоких каталитических концентрациях (20–100 мМ) наблюдался очень высокий изотопный эффект, который достигал более 400% [31]. Вышеприведённые результаты с нигерицином находятся в согласии с экспериментами на родопсине и цитохром *c*-оксидазе, в которых присутствовали высокие концентрации катализаторов отрыва протона. Лимитирующая стадия отрыва протона от фермента в водную фазу [37] при замене H_2O на D_2O как в родопсине [38], так и в цитохром *c*-оксидазе [39, 40] замедляется более чем в пять раз. Наблюдаемые эффекты D_2O однозначно указывают на участие молекул воды в связывании ионов водорода с межфазной границей (вода-липид или вода-белок). Таким образом, было показано, что эффективность катализатора по ускорению процесса переноса иона водорода от поверхности границы раздела в объём водной фазы гораздо ниже в D_2O по сравнению с H_2O .

Снижение скорости реакции отрыва протона в тяжёлой воде лимитировано свойствами кластера тяжёлой воды, который определяет прочность связи иона водорода с межфазной границей и его способность взаимодействовать с молекулой катализатора. Это предположение хорошо согласуется с результатами работы в модельной системе межфазной границы *n*-декана с водой [41], где показали возможность удержания ионов водорода на межфазной границе и снижение подвижности ионов водорода в тяжёлой воде. Вывод об участии молекул воды в удержании протонов на мембране также делается в работе по изучению латерального переноса протона вдоль мембран [36].

Участие мембраносвязанных протонов в синтезе АТФ в модельной системе. Ещё в середине 70-х гг.

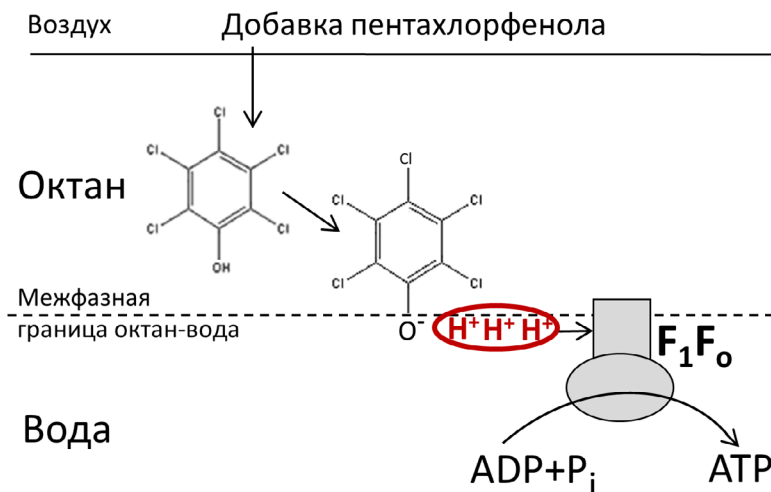


Рис. 4. Схема эксперимента по синтезу АТФ на межфазной границе октан-вода. Источником ионов водорода на межфазной границе служила кислота Бренстеда (пентахлорфенол). Высвобождение протонов происходило при диссоциации пентахлорфенола в момент контакта с водой. Синтез АТФ наблюдался при отсутствии окислительных реакций и при отсутствии трансмембранного потенциала

прошлого века в нашей лаборатории были поставлены эксперименты, в которых для синтеза АТФ использовалась сорбированная на межфазной границе октан-вода (со стороны водной фазы) F_1F_0 -АТФазы, выделенная из митохондрий сердца быка. В качестве источника энергии для синтеза АТФ со стороны гидрофобной фазы добавлялся безводный раствор электронейтральной H^+ -кислоты Бренстеда – пентахлорфенола [9]. В этих экспериментах ионы водорода на межфазной границе образовывались в результате диссоциации пентахлорфенола в момент контакта с водной фазой. Образование ионов водорода происходило в приграничном слое воды, имеющем низкую диэлектрическую постоянную. В таких условиях, как отмечалось в предыдущих модельных экспериментах, на межфазной границе формируется фракция ионов водорода (фракция мембраносвязанных протонов), обладающих избытком свободной энергии (рис. 4). В этих условиях на межфазной границе осуществлялся синтез АТФ при отсутствии трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода. Эти эксперименты показали, что объёмные параметры гидратной оболочки иона водорода, образовавшегося в воде с низкой диэлектрической постоянной, действительно невелики и соответствуют диаметру входного протонного канала F_1F_0 -АТФ-синтазы. Приведённые выше результаты недавно получили надёжное независимое экспериментальное подтверждение в работе Sjöholm et al. [17], в которой на липосомах (со встроенными АТФ-синтазой и комплексом IV) было показано, что синтез АТФ происходит за счёт фракции мембрано-

связанных протонов, которые переносятся вдоль поверхности липосомальной мембраны от респирасом на АТФ-синтазу.

ОБНАРУЖЕНИЕ ФРАКЦИИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ НА ПРИРОДНЫХ МЕМБРАНАХ

Фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митопластов (митохондриях без внешней мембраны). Можно было ожидать, что при включении протонных помп положительный поверхностный заряд на поверхности митопластов повысится в результате образования фракции мембраносвязанных протонов. Регистрация изменений поверхностного заряда на мембранах митопластов проводилась на приборе Malvern Zetasizer. Было показано, что поверхность мембраны митопластов несёт на себе большой отрицательный заряд, но включение работы протонных помп практически не уменьшает его. Синтез фракции мембраносвязанных протонов был достоверно продемонстрирован в опытах с добавлением катализатора отрыва протона (слабого основания NEPES 20 мМ). Включение протонных помп в присутствии катализатора приводило к достоверному снижению величины отрицательного заряда, что указывало на появление фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митопластов [23]. Результаты действия катализатора на заряд митопластов приведены на рис. 5. Наблюдаемый эффект катализа на митопластах показал, что на природных мембранах связь протона

с мембраной качественно не отличается от связи мембраносвязанных протонов с БЛМ.

Важно отметить, что при выключенных протонных помпах добавление катализатора отрыва протонов не оказывает влияния на поверхностный заряд митопластов. Это связано с тем, что при неработающих протонных помпах слой протонноионов на поверхности мембраны образуется ионами калия (основными катионами в используемой среде измерения), а двойной электрический слой находится в состоянии равновесия. При включении протонных помп ионы калия замещаются ионами водорода, при этом система выходит из состояния равновесия. Состояние с избыточной концентрацией протонов на поверхности мембраны является стационарным и поддерживается работой протонных помп. Добавление катализатора увеличивает скорость отрыва протонов в объёмную фазу воды и смещает стационарное состояние, что и наблюдается как увеличение отрицательного заряда мембраны. Этот эффект не наблюдается в равновесном состоянии (при отсутствии источника энергии).

При исследовании функциональной роли фракции мембраносвязанных протонов было показано, что их удаление с поверхности митопластов с помощью катализатора (HEPES 20 мМ) увеличивало скорость работы протонных помп, оцениваемую по скорости дыхания митопластов (рис. 6). Таким образом, было показано, что фракция мембраносвязанных протонов, связанная с внутренней мембраной митохондрий, исполняет также роль регулятора активности электрон-транспортной цепи системы ОКСФОС.

Наличие этой фракции тормозит работу протонных помп по механизму обратной связи. Аналогичный эффект можно наблюдать также при образовании мембраносвязанных протонов в результате гидролиза caged- H^+ [33]. Наблюдаемый в этих экспериментах эффект торможения дыхания избытком мембраносвязанных протонов показал, что природа их связи с поверхностью мембраны качественно отличается от связи ионов калия с мембраной в равновесном состоянии. Скорее всего, связь ионов калия с поверхностью митопласта определяется прямым электростатическим взаимодействием катионов с отрицательным зарядом поверхности, в то время как связь протонов с поверхностью митопластов в энергизованной системе близка по своим свойствам к водородной связи. Именно этот тип связи, как показывает эксперимент, чувствителен к действию катализатора.

Из данных рис. 5 и 6 видно, что разобшитель не взаимодействует с мембраносвязанными протонами, но эффективно взаимодействует с ними после их отрыва от мембраны с помощью катализатора. Это обусловлено слабым взаимодействием аниона разобшителя с ионами водорода, которые сорбированы на мембране. Этот эффект наблюдается также при синтезе АТФ [9].

Фракции мембраносвязанных протонов на поверхности митохондрий. Внешняя мембрана хорошо проницаема для ионов водорода, и поэтому было необходимо ответить на вопрос о том, существует ли перенос мембраносвязанных протонов между внешней и внутренней мембранами. При этом было обнаружено, что поверхность фосфорилирующих митохондрий, так же,



Рис. 5. Обнаружение мембраносвязанных протонов, обладающих избытком свободной энергии, на поверхности митопластов в условиях работы протонных помп. В таблице приведены ζ-потенциалы в пяти экспериментах на разных препаратах митопластов по данным работы [23]. На диаграмме показаны усреднённые данные по всем пяти препаратам

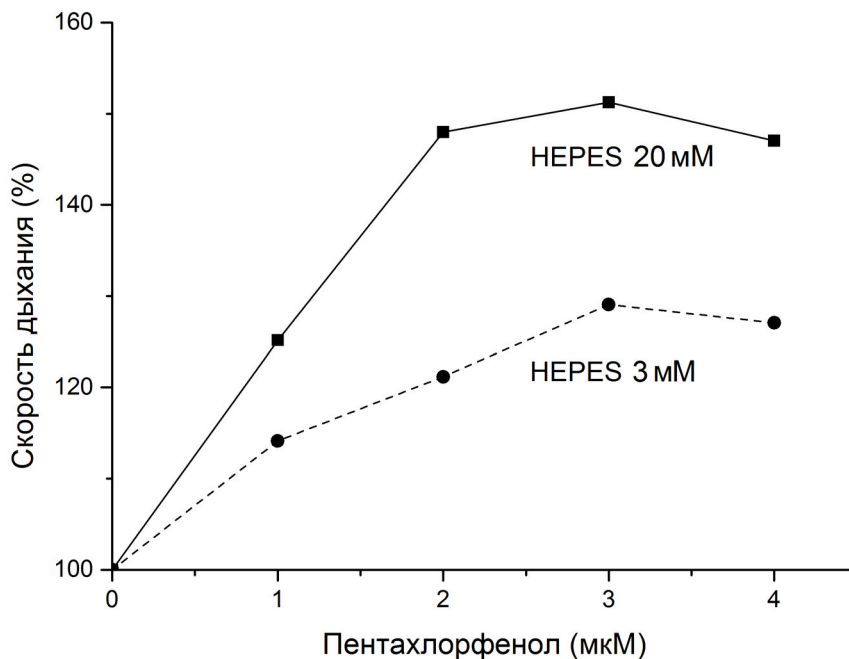


Рис. 6. Увеличение скорости дыхания митопластов (скорости функционирования протонных помп) в присутствии классического разобщителя при повышении концентрации катализатора отрыва мембранных протонов НЕРЕС. Рисунок модифицирован по данным работы [23]

как и поверхность митопластов, может нести на себе значительный отрицательный заряд. Эксперименты показали, что перенос мембраносвязанных протонов в нормальных изотонических условиях протекает малоэффективно. Однако межмембранный перенос активируется в условиях слабого осмотического стресса (при 120 мОсм в среде инкубации митохондрий), когда, по данным электронной микроскопии, можно наблюдать стыковку внешней и внутренней мембран, обусловленную набуханием матрикса [24]. Удаление мембраносвязанных протонов с помощью катализатора (НЕРЕС 20 мМ) увеличивает скорость работы протонных помп в препаратах набухших митохондрий [42] аналогично тому, как это происходит на митопластах.

Участие мембраносвязанных протонов в реакциях синтеза АТФ в митохондриях. Мембраносвязанные протоны напрямую участвуют в реакциях синтеза АТФ [43]. Опыты проводили на интактных митохондриях в гипотонических и изотонических средах, в присутствии и при отсутствии катализатора реакции отрыва мембраносвязанных протонов (НЕРЕС 20 мМ). Результаты этих экспериментов приведены на рис. 7.

Можно видеть, что катализатор резко снижает эффективность функционирования ОКСФОС, уменьшая АДФ/О на 20–40%. Эффект наблюдался в условиях гипотонии, но в некоторых

экспериментах он появлялся и в изотонических условиях. Эти и ранее описанные данные позволяют сделать заключение о том, что энергия фракции мембранных протонов используется в реакции синтеза АТФ при работе ОКСФОС. Неустойчивость эффекта вызвана тем, что точность среды является не единственным фактором, который контролирует слипание мембран митохондрий и действие катализатора. В связи между протонами и мембранами включены, как было показано выше на модельных системах, молекулы воды, и такого рода связи могут меняться при небольших изменениях внешних условий.

МИТОХОНДРИИ КАК ПРОТОННЫЙ СУПЕРКОНДЕНСАТОР (ИОНИСТОР)

Приведённые ранее данные показывают накопление ионов водорода в двойном электрическом слое на поверхности внутренней мембраны митохондрий. Это даёт возможность сравнить митохондрии с суперконденсатором (ионистором) — техническим устройством, энергия в котором запасается в двойном электрическом слое на границе с электродом [44]. Недавние модельные исследования гидратации фосфолипидов демонстрируют, что ионы на межфазной границе с фосфолипидным бислоем локализо-

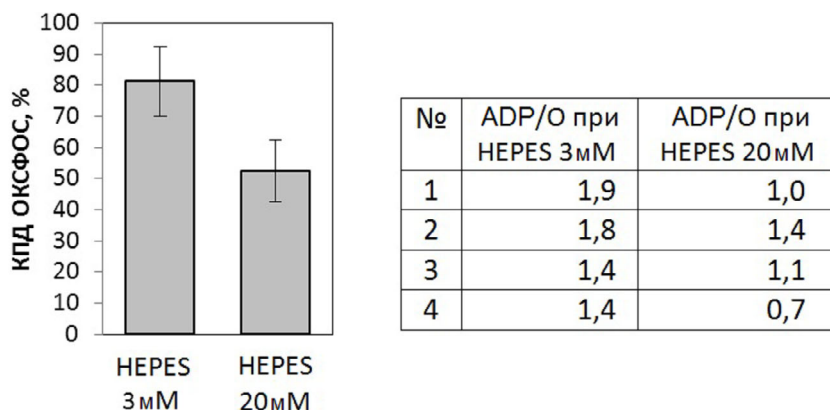


Рис. 7. Снижение коэффициента полезного действия (КПД) ОКСФОС при удалении фракции мембраносвязанных протонов с помощью катализатора (HEPES 20 мМ). На диаграмме приведены усреднённые данные из работы [43], полученные на четырёх разных препаратах митохондрий. КПД оценивали по средней величине параметра ADP/O, отражающего количество атомов кислорода, используемое митохондриями для синтеза одной молекулы АТФ из ADP и фосфата. За 100% принимали параметр ADP/O = 2, соответствующий теоретическому максимуму при окислении сукцината

ваны не только в слабосвязанном слое Гуи–Чепмена, но и адсорбируются в полярной зоне липидного бислоя вблизи фосфатных групп [45]. Это даёт возможность для образования высокоустойчивых структур, аналогичных таковым в пористых электродах ионисторов. При этом электрический заряд протонов распределён на большой поверхности, а расстояние между разномёнными зарядами очень мало (менее 3 Å). Важно отметить, что, в отличие от ионистора, где носителями заряда служат любые ионы электролита, в митохондриях идёт процесс трансмембранного переноса протонов (в результате функционирования комплексов дыхательной цепи), в результате чего примембранный слой связанных катионов формируется преимущественно из протонов. Последующий обмен протонов на другие ионы, приходящие из водной фазы, возможен, однако имеет достаточно высокую энергию активации. Именно этот процесс отрыва протонов от мембраны (или обмена на другой ион) катализируется слабыми основаниями. Поскольку протоны, запасённые на межфазной границе, могут использоваться АТФ-синтазой для осуществления синтеза АТФ [9, 17], такие структуры с высокой электрической ёмкостью могут выполнять функцию промежуточного аккумулятора энергии в митохондриях.

О СВОЙСТВАХ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ПРОТОНОВ

Эффект удержания протонов на межфазной границе наблюдается в условиях связывания ионов водорода на поверхности мембраны ми-

тохондрий, митопластов и на модельных системах: на БЛМ и на межфазной границе октан-вода. Важнейшей особенностью мембраносвязанных протонов является их способность при отрыве от мембраны непосредственно участвовать в работе АТФ-синтазы (ключевой биологической машины) в качестве рабочего тела. В работе дано описание специфических свойств мембраносвязанных протонов.

- Фракция мембраносвязанных протонов формируется в границах двойного электрического слоя и находится в плотном слое противоионов (в пределах внешней плоскости Гельмгольца и плоскости скольжения). При работе протонных помп сохраняется заряд первого слоя противоионов (величина поверхностного заряда митохондрий не меняется), так как ионы водорода замещают в нём ионы калия.
- Фракция мембранных протонов является неравновесной и обладает избытком свободной энергии. Она существует только в условиях генерации протонов на межфазной границе. Это принципиально отличает её от равновесной фракции противоионов слоя Штерна.
- Высокие концентрации мембраносвязанных протонов ингибируют работу протонных помп за счёт формирования запирающего слоя из прочно удерживающихся на межфазной границе ионов водорода.
- Мембраносвязанные протоны способны к быстрому латеральному движению без отрыва в водную фазу (подвижность одного порядка с подвижностью протона в объёме).
- Мембраносвязанные протоны обладают избытком свободной энергии, и поэтому могут быть удалены с мембраны добавлением катализаторов отрыва протонов — высокими концент-

рациями слабых оснований (буферов HEPES, Tris, MES) или анионов слабых кислот (цитрат).

- Отрыв протонов от мембраны и их латеральный перенос происходят с участием молекул воды.

- Протоны на межфазной границе обладают избытком свободной энергии, которая используется АТФ-синтазой в реакции синтеза АТФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ показал, что энергия окислительных реакций, которая используется в синтезе АТФ, запасается не только в форме электрохимического потенциала ионов водорода на митохондриальной мембране, но также, а может быть и в первую очередь, в форме фракции ионов водорода, лабильно связанных с поверхностью мембраны. Процесс запасаения энергии в митохондриях неразрывно связан с переносом ио-

нов водорода, которые одновременно исполняют две функции – переносчика и носителя свободной энергии протонов и в то же время являются субстратами (рабочими телами), обеспечивающими направленное движение рабочих элементов в сложной биологической машине, которой является F_1F_0 -АТФ-синтаза.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00835), а также при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (тематический план «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В рамках настоящей статьи не проводилось каких-либо экспериментов с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144-148.
- Skulachev, V. P., Sharaf, A. A., and Liberman, E. A. (1967) Proton conductors in the respirator chain and artificial membranes, *Nature*, **216**, 718-719, doi: 10.1038/216718a0.
- 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.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
- Williams, R. J. P. (1961) Possible functions of chains of catalysts, *J. Theor. Biol.*, **1**, 1-17, doi: 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
- Kell, D. B. (1979) On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation: An electrodic view, *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 55-99, doi: 10.1016/0304-4173(79)90018-1.
- Mitchell, P. (1991) Foundations of vectorial metabolism and osmochemistry, *Biosci. Rep.*, **11**, 297-346, doi: 10.1007/BF01130212.
- Drachev, L. A., Kaulen, A. D., and Skulachev, V. P. (1984) Correlation of photochemical cycle, H^+ release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **178**, 331-335, doi: 10.1016/0014-5793(84)80628-6.
- Yaguzhinsky, L. S., Boguslavsky, L. I., Volkov, A. G., and Rakhmaninova, A. B. (1976) Synthesis of ATP coupled with action of membrane protonic pumps at the octane-water interface, *Nature*, **259**, 494-496, doi: 10.1038/259494a0.
- Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., Oesterhelt, D., and Dencher, N. A. (1994) Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer, *Nature*, **370**, 379-382, doi: 10.1038/370379a0.
- Alexiev, U., Mollaaghababa, R., Scherrer, P., Khorana, H. G., and Heyn, M. P. (1995) Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 372-376.
- Gopta, O. A., Cherepanov, D. A., Junge, W., and Mulikidjanian, A. Y. (1999) Proton transfer from the bulk to the bound ubiquinone QB of the reaction center in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides*: Retarded conveyance by neutral water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13159-13164, doi: 10.1073/pnas.96.23.13159.
- Cherepanov, D. A., Junge, W., and Mulikidjanian, A. Y. (2004) Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: dependence on the fixed and mobile pH buffers, on the size and form of membrane particles, and on the interfacial potential barrier, *Biophys. J.*, **86**, 665-680, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74146-6.
- Medvedev, E., and Stuchebrukhov, A. (2012) Mechanism of long-range proton translocation along biological membranes, *FEBS Lett.*, **587**, doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.010.
- Weichselbaum, E., Österbauer, M., Knyazev, D. G., Batishchev, O. V., Akimov, S. A., et al. (2017) Origin of proton affinity to membrane/water interfaces, *Sci. Rep.*, **7**, 4553, doi: 10.1038/s41598-017-04675-9.
- Toth, A., Meyrat, A., Stoldt, S., Santiago, R., Wenzel, D., et al. (2020) Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 2412-2421, doi: 10.1073/pnas.1917968117.
- Sjöholm, J., Bergstrand, J., Nilsson, T., Šachl, R., Ballmoos, C., et al. (2017) The lateral distance between a proton pump and ATP synthase determines the ATP-synthesis rate, *Sci. Rep.*, **7**, 1-12, doi: 10.1038/s41598-017-02836-4.
- Nesterov, S., Chesnokov, Y., Kamyshinsky, R., Panteleeva, A., Lyamzaev, K., et al. (2021) Ordered clusters of the

- complete oxidative phosphorylation system in cardiac mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22031462.
19. Morelli, A. M., Ravera, S., Calzia, D., and Panfoli, I. (2019) An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane, *Open Biol.*, **9**, doi: 10.1098/rsob.180221.
 20. Lee, J. W. (2021) Mitochondrial energetics with transmembrane electrostatically localized protons: do we have a thermotrophic feature? *Sci. Rep.*, **11**, 14575, doi: 10.1038/s41598-021-93853-x.
 21. Teschke, O., Ceotto, G., and de Souza, E. F. (2001) Interfacial water dielectric-permittivity-profile measurements using atomic force microscopy, *Phys. Rev. E*, **64**, 011605, doi: 10.1103/PhysRevE.64.011605.
 22. Ташкин В. Ю., Вишнякова В. Е., Щербаков А. А., Финогенова О. А., Ермаков Ю. А., и др. (2019) Изменение емкости и граничного потенциала бислоистой липидной мембраны при быстром освобождении протонов на ее поверхности, *Биол. Мемб.*, **36**, 101-108.
 23. Моисеева В. С., Мотовилов К. А., Лобышева Н. В., Орлов В. Н., Ягужинский Л. С. (2011) Образование метастабильной связи ионов водорода с поверхностью митопластов, *Доклады Академии Наук*, **438**, 555-558.
 24. Eroshenko, L. V., Marakhovskaya, A. S., Vangeli, I. M., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., et al. (2012) Bronsted acids bounded to the mitochondrial membranes as a substrate for ATP synthase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **444**, 158-161.
 25. Ermakov, Y. A., and Nesterenko, A. M. (2017) Boundary potential of lipid bilayers: Methods and interpretations, *J. Phys. Conf. Ser.*, **780**, 012002, doi: 10.1088/1742-6596/780/1/012002.
 26. Antonenko, Y. N., Kovbasnjuk, O. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1993) Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipid membrane to bulk water, *Biochim. Biophys. Acta*, **1150**, 45-50, doi: 10.1016/0005-2736(93)90119-K.
 27. Gonella, G., Backus, E. H. G., Nagata, Y., Bonthuis, D. J., Loche, P., et al. (2021) Water at charged interfaces, *Nat. Rev. Chem.*, **5**, 466-485, doi: 10.1038/s41570-021-00293-2.
 28. Antonenko, Yu. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1982) Generation of potential in lipid bilayer membranes as a result of proton-transfer reactions in the unstirred layers, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **14**, 457-465, doi: 10.1007/BF00743071.
 29. Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1990) Effect of changes in cation concentration near bilayer lipid membrane on the rate of carrier-mediated cation fluxes and on the carrier apparent selectivity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026**, 236-240, doi: 10.1016/0005-2736(90)90069-Z.
 30. Eremeev, S. A. and Yaguzhinsky, L. S. (2015) On local coupling of electron transport and ATP-synthesis system in mitochondria. Theory and experiment, *Biochemistry Moscow*, **80**, 576-581, doi: 10.1134/S0006297915050089.
 31. Kovbasnjuk, O. N., Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1991) Proton dissociation from nigericin at the membrane-water interface, the rate-limiting step of K^+/H^+ exchange on the bilayer lipid membrane, *FEBS Lett.*, **289**, 176-178, doi: 10.1016/0014-5793(91)81063-E.
 32. Evtodienko, V. Y., Antonenko, Y. N., and Yaguzhinsky, L. S. (1998) Increase of local hydrogen ion gradient near bilayer lipid membrane under the conditions of catalysis of proton transfer across the interface, *FEBS Lett.*, **425**, 222-224, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00233-6.
 33. Драгунова С. Ф., Красинская И. П., Ягужинский Л. С. (1981) Регуляция переноса протона через двойной электрический слой на мембране митохондрий, *Биохимия*, **46**, 1087-1095.
 34. Geißler, D., Antonenko, Y. N., Schmidt, R., Keller, S., Krylova, O. O., et al. (2005) (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1195-1198, doi: 10.1002/anie.200461567.
 35. Serowy, S., Saparov, S. M., Antonenko, Y. N., Kozlovsky, W., Hagen, V., et al. (2003) Structural proton diffusion along lipid bilayers, *Biophys. J.*, **84**, 1031-1037.
 36. Springer, A., Hagen, V., Cherepanov, D. A., Antonenko, Y. N., and Pohl, P. (2011) Protons migrate along interfacial water without significant contributions from jumps between ionizable groups on the membrane surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14461-14466, doi: 10.1073/pnas.1107476108.
 37. Zaslavsky, D., Sadoski, R. C., Rajagukguk, S., Geren, L., Millett, F., et al. (2004) Direct measurement of proton release by cytochrome c oxidase in solution during the F \rightarrow O transition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10544-10547, doi: 10.1073/pnas.0401521101.
 38. Le Coutre, J., and Gerwert, K. (1996) Kinetic isotope effects reveal an ice-like and a liquid-phase-type intramolecular proton transfer in bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **398**, 333-336, doi: 10.1016/S0014-5793(96)01254-9.
 39. Salomonsson, L., Brändén, G., and Brzezinski, P. (2008) Deuterium isotope effect of proton pumping in cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 343-350, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.09.009.
 40. Salomonsson, L., Faxén, K., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) The timing of proton migration in membrane-reconstituted cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17624-17629, doi: 10.1073/pnas.0505431102.
 41. Zhang, C., Knyazev, D. G., Vereshaga, Y. A., Ippoliti, E., Nguyen, T. H., et al. (2012) Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9744-9749, doi: 10.1073/pnas.1121227109.
 42. Yurkov, V. I., Fadeeva, M. S. and Yaguzhinsky, L. S. (2005) Proton transfer through the membrane-water interfaces in uncoupled mitochondria, *Biochemistry Moscow*, **70**, 195-199, doi: 10.1007/s10541-005-0101-8.
 43. Солодовникова И. М., Юрков В. И., Тоньшин А. А., Ягужинский Л. С. (2004) О локальном сопряжении процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени крысы, *Биофизика*, **49**, 47-56.
 44. Conway, B. E. (1999) *Electrochemical Supercapacitors: Scientific Fundamentals and Technological Applications*, Springer Science & Business Media, New York.
 45. Deplazes, E., White, J., Murphy, C., Cranfield, C. G., and Garcia, A. (2019) Competing for the same space: Protons and alkali ions at the interface of phospholipid bilayers, *Biophys. Rev.*, **11**, 483-490, doi: 10.1007/s12551-019-00541-2.

**MECHANISM OF ENERGY STORAGE AND TRANSFORMATION
IN MITOCHONDRIA AT THE WATER-MEMBRANE INTERFACE****Review****S. V. Nesterov^{1,2}, E. G. Smirnova³, and L. S. Yaguzhinsky^{2,3,4*}**¹ *National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*² *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*³ *Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: yag@genebee.msu.ru*⁴ *Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 115404 Moscow, Russia*

In this analytical review various methods for the generation of membrane-bound protons with the use of different energy sources were considered at model and natural systems. The analysis showed that all three considered types of reactions contain the same key stage of membrane-bound protons synthesis. It is the dissociation of electrically neutral Brønsted acids at the interface during the transition from hydrophobic phase to water with a low dielectric constant. Particular attention is paid to the fact that in one of the analyzed model systems, membrane-bound protons provide energy for the ATP synthesis reaction. The review provides data showing that a similar mechanism for the synthesis of membrane-bound protons was also carried out on natural membranes of the OXPHOS system, in particular, on the membranes of mitoplasts and mitochondria. The analysis showed that the energy of oxidative reactions, which provides the synthesis of ATP, at the intermediate stage is stored not only in the form of the transmembrane electrochemical potential of hydrogen ions. It is also and perhaps even primarily, stored in the form of hydrogen ion fraction bounded to the inner mitochondrial membrane. The process of energy storage in mitochondria is linked with the transfer of hydrogen ions, which simultaneously perform two functions. The fraction of hydrogen ions on the membrane surface is a free energy carrier and, at the same time, a direct substrate (working body) providing the movement of F₁F₀-ATP-synthase biological machine.

Keywords: membrane bound proton, hydrogen ion, membrane, mitochondria, oxidative phosphorylation, supercapacitor