

Received: 2015.09.15
Accepted: 2016.06.14
Published: 2016.11.14

Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS)*

Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation

Agata Sarniak¹, Joanna Lipińska³, Karol Tytman², Stanisława Lipińska¹

¹Zakład Fizjologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

²Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

³Klinika Kardiologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Główne źródła reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach to: mitochondrialny łańcuch oddechowy i wybuch oddechowy fagocytów z udziałem oksydazy NADPH. ROS są wytwarzane również w retikulum endoplazmatycznym, peroksysomach, z udziałem oksydazy ksantynowej i oksydazy śródbłonkowej oraz w procesie autooksydacji małych molekuł.

W warunkach prawidłowych ROS powstają jako produkt uboczny wieloetapowego procesu fosforylacji oksydacyjnej prowadzącej do syntezy ATP. Wytwarzanie ROS w czasie aktywowanego (np. zakażeniem) wybuchu oddechowego fagocytów odbywa się również wieloetapowo. Głównym enzymem odpowiedzialnym za to zjawisko jest oksydaza NADPH, a powstające ROS są wykorzystywane do walki organizmu z infekcjami.

W opracowaniu omówiono aktualny stan wiedzy o budowie i funkcji mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, w którym produktem ubocznym są ROS oraz o budowie oksydazy NADPH, a także funkcji poszczególnych jej elementów w wybuchu oddechowym fagocytów.

Słowa kluczowe:

wolne rodniki tlenowe • mitochondrialny łańcuch oddechowy • oksydaza NADPH

Summary

The main cellular source of reactive oxygen species (ROS) is mitochondrial respiratory chain and active NADPH responsible for "respiratory burst" of phagocytes. Whatsmore ROS are produced in endoplasmic reticulum, peroxisomes, with the participation of xanthine and endothelial oxidase and during autoxidation process of small molecules. Mitochondrial respiratory chain is the main cellular source of ROS. It is considered that in aerobic organisms ROS are mainly formed during normal oxygen metabolism, as byproducts of oxidative phosphorylation, during the synthesis of ATP. The intermembranous phagocyte enzyme – activated NADPH oxidase, responsible for the "respiratory burst" of phagocytes, which is another source of ROS, plays an important role in defense of organism against infections.

The aim of this article is to resume actual knowledge about structure and function of the mitochondrial electron transport chain in which ROS are the byproducts and about NADPH oxidase as well as the function of each of its components in the "respiratory burst" of phagocytes.

Key words:

reactive oxygen species • mitochondrial elctron transport chain • NADPH oxidase

*Praca finansowana z działalności statutowej Zakładu Fizjologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Nr 503/0-079-05/503-01-001.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1224259>

Word count: 5553

Tables: –

Figures: 5

References: 118

Adres autorki: dr hab. n.med. Stanisława Lipińska, Zakład Fizjologii Ogólnej, Międzywydziałowa Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: stanislawa.lipinska@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **CGD** – przewlekła choroba ziarniniakowa, **DNA** – kwas dezoksyrybonukleinowy, **ERO1** – oksydoreduktaza retikulum endoplazmatycznego, **FAD** -, **FADH** -, **fMLP** – chemotaktyczny peptyd bakteryjny, **FMN** – mononukleotyd flawinowy, **GDP** – guanozynodwufosforan, **GTP** – guanozynotrójfosforan, **IP3** – inozytolotrójfosforan, **IPS** – białko żelazowo-siarkowe, **MPO** – mieloperoksydaza, **NADH** -, **NADPH** -, **PDI** – izomeraza białkowo-dwusiarczkowa, **NOX** – oksydazy śród błonkowe, **RE** – retikulum endoplazmatyczne, **ROS** – reaktywne formy tlenu.

Reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species, ROS) to określenie powszechnie stosowane do opisu wysoko reaktywnych molekuł, które są pochodnymi tlenu cząsteczkowego. ROS mają na powłoce walencyjnej co najmniej jeden niesparowany elektron, który warunkuje ich wysoką reaktywność, a w następstwie destrukcyjne działanie na komponenty komórkowe, są więc zagrożeniem dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Organizmy mają układ antyoksydacyjny, do którego należą enzymy antyoksydacyjne oraz antyoksydanty nieenzymatyczne, który redukuje niekorzystne działanie ROS. Umożliwia on zachowanie stanu równowagi między prooksydantami i antyoksydantami, tak zwanej „redox - homeostazy”. Zachwianie tego stanu równowagi na rzecz oksydantów nosi nazwę „stresu oksydacyjnego” [41,78].

Wykazano jednak, że obecność ROS w niewielkich stężeniach jest niezbędna do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych [41]. Pozorny paradoks określający rolę ROS jako związków regulatorowych, a z drugiej strony jako toksycznych produktów metabolizmu komórkowego, można wyjaśnić tym, iż sposób ich działania zależy głównie od ich stężenia.

Nadmierne wytwarzanie ROS jest uważane za główny czynnik odpowiedzialny za patogenezę wielu chorób, między innymi: nowotworów, chorób serca i układu krążenia, chorób niedokrwiennych, cukrzycy, zwłóknienia płuc, reumatoidalnego zapalenia stawów, bezdechu nocnego, chorób neurodegeneracyjnych (Alzheimera, Parkinsona) oraz za proces starzenia się organizmu [13,78,85].

Celem pracy jest przedstawienie głównych miejsc wytwarzania ROS w komórkach oraz aktualnego stanu wiedzy o wewnątrzkomórkowych mechanizmach ich powstawania w warunkach fizjologicznych i w czasie wybuchu oddechowego fagocytów.

GŁÓWNE ŹRÓDŁA REAKTYWNYCH FORM TLENU W ORGANIZMIE

Wybuch oddechowy fagocytów jest procesem, w którym główną rolę w walce organizmu z infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi odgrywa oksydaza NADPH. Enzym ten jest odpowiedzialny za zjawisko zwane „wybuchem oddechowym” fagocytów, którego pierwotnym efektem jest anionorodnik ponadtlenkowy - $O_2^{\cdot-}$, powstający w wyniku transferu elektronów z NADPH, znajdującego się po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej, na tlen cząsteczkowy. Aktywacja oksydazy NADPH jest poddana procesom regulacji, które mają na celu ograniczenie nadmiernego, niekontrolowanego wytwarzania ROS, prowadzącego do niebezpiecznego dla funkcjonowania organizmu zjawiska zwanego „stresem oksydacyjnym”. Następujące po sobie procesy fosforylacji, translokacji i zmiany konformacyjne poszczególnych komponentów enzymu, umożliwiają osiągnięcie przez ten kompleks enzymatyczny zdolności do wytwarzania O_2 [45,80].

Mitochondrialny łańcuch oddechowy, a właściwie proces fosforylacji oksydacyjnej, który dostarcza ponad 90% adenozynotrifosforanu - ATP, głównego nośnika energii w organizmie, jest równocześnie podstawowym źródłem ROS w komórkach.

Tlen cząsteczkowy jest akceptorem elektronów dla mitochondrialnej oksydazy cytochromowej, enzymatycznego kompleksu kończącego łańcuch transportu elektronów w mitochondriach i katalizującego reakcję czteroelektronowej redukcji O_2 do H_2O . Podczas transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego dochodzi do niekontrolowanego „wycieku” części elektronów. Jest to wynik pewnej niesprawności mitochondrialnego systemu enzymatycznego. Około 1-4% tlenu zużywanego przez mitochondria ulega jednoelektronowej redukcji do anionorodnika ponadtlenkowego [15,79,91].

Retikulum endoplazmatyczne (RE) - organellum komórkowe, jego podstawową rolą jest biosynteza lipidów i białek, ma również enzymy katalizujące reakcje detoksykacji wielu leków, pestycydów oraz szkodliwych produktów przemiany materii. Do najlepiej poznanych należy cytochrom P-450 i cytochrom b_5 (wchodzące w skład tzw. mikrosomalnego łańcucha transportu elektronów), które mogą utleniać nienasycone kwasy tłuszczowe i ksenobiotyki, redukując tlen molekularny do O_2^- i H_2O_2 [16,92].

Podobny do mikrosomalnego łańcucha transportu elektronów układ enzymatyczny znajduje się w błonach jądra komórkowego, jednak jego funkcja nie jest do końca poznana. Przypuszcza się, że przeciek elektronów z tego łańcucha transportu elektronów może być źródłem ROS, które stanowią zagrożenie dla DNA w jądrze komórkowym *in vivo* [16].

W retikulum endoplazmatycznym w nowo utworzonych białkach dochodzi do utleniania grup tiolowych SH i tworzenia mostków disulfonidowych S-S pomiędzy cząsteczkami cysteiny. Reakcje te są katalizowane przez obecną w RE oksydoreduktazę ERO1 (Endoplasmatic Reticulum Oxidoreductin) i izomerazę PDI (protein disulfide isomerase) czemu towarzyszy transfer elektronów za pośrednictwem cząsteczki FAD na tlen cząsteczkowy i powstanie H_2O_2 [18,20]. Stres oksydacyjny związany z RE może przyczyniać się do inicjacji apoptozy, a także wielu chorób metabolicznych i neurodegeneracyjnych [84].

Peroksysomy mogą zarówno wytwarzać, jak i rozkładać H_2O_2 , gdyż zawierają liczne oksydazy flawinowe, katalizujące reakcje, których produktem ubocznym jest H_2O_2 [22,51,91]. W zależności od rodzaju tkanek mamy do czynienia z: oksydazą glikolanową, oksydazą D-aminokwasową, oksydazą L- α -hydroksykwasową, oksydazą acylokoenzymu A i oksydazą moczaniową [16]. Reakcje oksydacyjne są szczególnie ważne w komórkach wątroby i nerek, gdzie peroksysomy unieszkodliwiają wiele toksycznych związków (np. etanol). Kolejną ważną funkcją reakcji oksydacyjnych, które zachodzą w peroksysomach jest β oksydacja kwasów tłuszczowych. Większość powstającego H_2O_2 jest utylizowana przez katalazę znajdującą się w peroksysomach [16,92].

Peroksysomy są również źródłem anionorodnika ponadtlenkowego, wytwarzanego przez oksydazę ksantynową oraz obecny w błonach tych organelli łańcuch transportu elektronów, który składa się z reduktazy NADH i cytochromu b_5 . Reduktaza NADH jest akceptorem elektronów wewnątrz peroksysomu, następnie przekazuje elektrony cytochromowi b_5 , który zużywa je do redukcji różnych substratów lub przekazuje je na tlen cząsteczkowy, co prowadzi do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego [15].

Oksydaza ksantynowa wraz z innymi rozpuszczalnymi enzymami, takimi jak: oksydaza aldehydowa, dehy-

drogenaza dihydroorotanowa, dioksygenaza tryptofanowa mogą katalizować reakcje, w których powstają ROS [16]. Oksydaza ksantynowa jest enzymem, który nie tylko katalizuje reakcje utleniania ksantyny do kwasu moczowego, lecz również reakcje utleniania puryny do hipoksantyny i hipoksantyny do ksantyny. Katalizuje również reakcje utleniania aldehydów do kwasów karboksylowych. Akceptorem elektronów w wymienionych reakcjach jest tlen cząsteczkowy, ulegający jedno- lub dwuelektronowej redukcji do O_2^- i H_2O_2 [15,92].

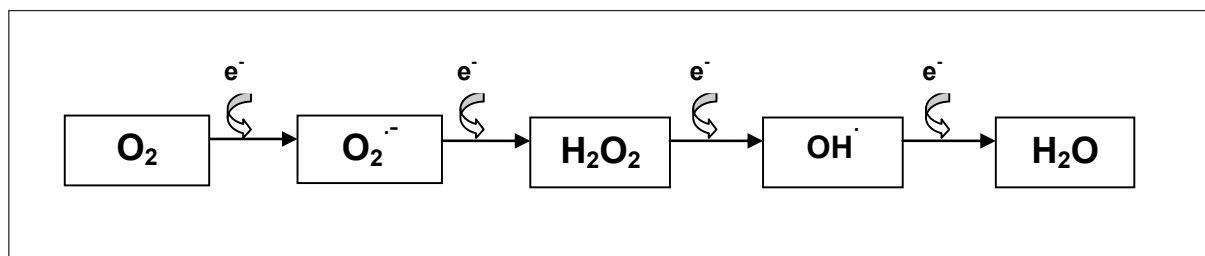
Autooksydacja małych molekuł: dopaminy, noradrenaliny, flawin, tioli i hydrochinonów może prowadzić do produkcji ROS (w większości przypadków do uwalniania O_2^- [16,92]. Sugeruje się, że samoutlenianie dopaminy do melaniny, przyczynia się do postępującego obumierania neuronów substancji czarnej mózgu w chorobie Parkinsona, a także w procesach starzenia się organizmu [3,21,38].

Oksydazy śródbłonowe Nox redukujące tlen cząsteczkowy do O_2^- , podobne, jednak nieidentyczne z katalityczną podjednostką gp91^{phox}/NOX2 fagocytarnej oksydazy NADPH, występują m.in. w komórkach płuc, nerek, okrężnicy i tarczycy, a także w komórkach nabłonka, śródbłonka, fibroblastach, chondrocytach, a także w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych [16,45,111]. W ostatnich latach odkryto 6 homologów cytochromowej podjednostki NOX2: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 i DUOX2 [17,75]. Są to flawocytochromy, które przenoszą elektrony głównie z NADPH na O_2 .

Funkcja niefagocytarnych oksydaz NADPH należących do rodziny NOX, pomimo wielu podobieństw w budowie, różni się znacząco od roli oksydazy występującej w komórkach fagocytów. ROS generowane w komórkach niefagocytujących są zaangażowane głównie w procesy komunikacji wewnątrzkomórkowej, jak również międzykomórkowej. Sugeruje się, że oksydazy NOX zapewniają warunki umożliwiające transport kationów skutkujący zmianami pH, co umożliwia przepływ sygnału i prawidłowe funkcjonowanie komórek [16].

Pierwszym zidentyfikowanym homologiem podjednostki gp91^{phox} w komórkach ssaków była niefagocytarna oksydaza NADPH - NOX1 występująca w komórkach śródbłonka i komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a także w macicy, gruczołach krokowym i w żołądku [108]. Podjednostka NOX1 występuje również we wszystkich komórkach okrężnicy, a szczególnie w komórkach nabłonkowych, jednak jej fizjologiczna rola w jelicie grubym nie jest do końca poznana [53,71]. Wykazano natomiast, iż oksydaza NOX1 przeciwdziała nadciśnieniu tętniczemu indukowanemu angiotensyną II [39,87].

Niefagocytarna oksydaza NOX1 tworzy heterodimer z podjednostką p22^{phox} [5,60,72]. Aktywacja NOX1 wymaga obecności białek regulatorowych Nox1 (Nox organizator 1) i Noxa1 (Nox activator 1), homologów jednostek p47^{phox}



Ryc. 1. Schemat tworzenia ROS wg [27]

i p67^{phox} [14,28,54]. Podobnie jak w fagocytarnej oksydazie ważną rolę w aktywacji NOX1 odgrywa drobnocząsteczkowe białko Rac. Usprawnia ono interakcję NOX1 z aktywatorem Noxa 1 [90].

W komórkach ssaków występują trzy homologii tego białka: wszechobecne Rac1, Rac2 - głównie w komórkach mieloidalnych i Rac3 w komórkach nerwowych [16].

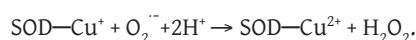
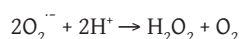
WYTWARZANIE ROS W WYBUCHU ODDECHOWYM FAGOCYTÓW

Aktywacja komórek fagocytujących (granulocytów, monocytów, makrofagów), która jest wynikiem zakażenia ciała gospodarza przez bakterie, grzyby i pasożyty, prowadzi do produkcji anionorodnika nadadtlenkowego - O₂^{•-}. Anionorodnik nadadtlenkowy jest prekursorem innych, bardziej efektywnych ROS, które są wykorzystywane przez fagocyty do zabijania, atakujących komórki gospodarza, mikroorganizmów [58,77,93,96,100].

W 1933 r. po raz pierwszy Baldrige i Gerard zaobserwowali, że komórki fagocytujące, a w szczególności granulocyty obojętnochłonne, w czasie fagocytozy zużywają zwiększoną ilość tlenu [13]. Pierwotnie sugerowano, że zjawisko to wiąże się ze wzrostem zapotrzebowania energetycznego związanego z przebiegiem fagocytozy, a w związku z tym ze wzrostem intensywności oddychania mitochondrialnego. Dopiero w 1961 r. Iyer, Islami Quastel wskazali, że zwiększone pobieranie tlenu w czasie fagocytozy jest związane z produkcją nadadtlenku wodoru - H₂O₂, który wykazuje właściwości bakteriobójcze [70]. Powstający H₂O₂ już wtedy nie był uważany za jedyny czynnik w pełni odpowiedzialny za walkę z mikroorganizmami, a jedynie stanowił jeden z wielu związków należących do arsenału wykorzystywanego przez fagocyty do zabijania bakterii i grzybów. Zjawisko związane ze wzmoczoną konsumpcją tlenu towarzyszącą fagocytozie, jest ściśle związane z przekształcaniem większości pochłanianego przez neutrofile i monocyty tlenu. Zostało to opisane w 1984 r. przez Babiora i nazwane „wybuchem oddechowym” [10].

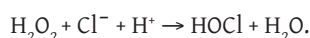
Anionorodnik nadadtlenkowy - O₂^{•-} jest pierwotnym, mało toksycznym produktem „wybuchu oddechowego” fagocytów, przez co nie jest wykorzystywany do zabijania mikroorganizmów, lecz ulega spontanicznej dysmutacji do nadadtlenku wodoru - H₂O₂. Enzymem katalizującym reakcję dysmutacji jest dysmutaza nadadtlen-

kowa - SOD, dzięki której efektywność tego procesu jest niezwykle wysoka (wzrasta ponad 10⁴ razy) [45,57,96].

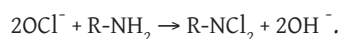
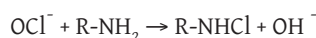


Nadtlenek wodoru nie jest wolnym rodnikiem, jest jednak związkiem bardziej stabilnym niż O₂^{•-}, mającym zdolność migracji przez błony komórkowe. Podobnie jak anionorodnik nadadtlenkowy, nie należy do związków bardzo toksycznych i jedynie w dużych stężeniach wykazuje właściwości bakteriobójcze [68]. Większość H₂O₂ produkowanego przez neutrofile jest zużywana przez mieloperoksydazę - MPO. Mieloperoksydaza jest enzymem stanowiącym podstawowy składnik azurochłonnych ziarnistości neutrofila. W procesie degranulacji dochodzi do uwalniania MPO do wnętrza fagosomu, gdzie wraz z nadtlenkiem wodoru i jonami Cl⁻ tworzy układ odpowiedzialny za produkcję bardzo efektywnego arsenału związków silnie bakteriobójczych, do którego należą: kwas podchlorawy, chloroaminy, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy oraz ozon. Pierwotnym produktem reakcji utleniania jonów chlorkowych Cl⁻ przez H₂O₂, w reakcji katalizowanej przez MPO, jest bardzo silny oksydant (najbardziej bakteriobójczy związek produkowany przez neutrofile) kwas podchlorawy - HOCl [73,118].

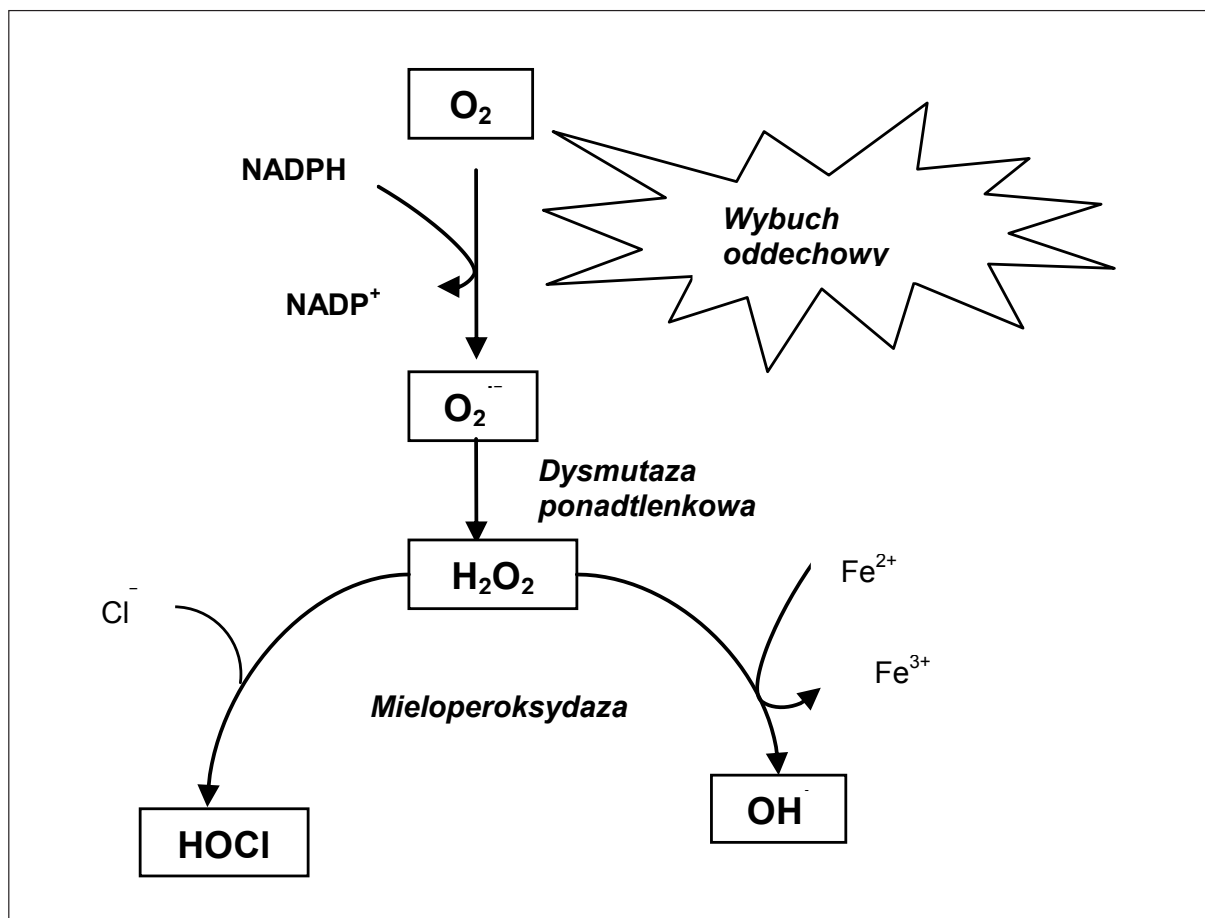
MPO



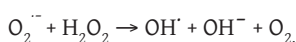
Kwas podchlorawy oprócz swoich wyjątkowo silnych właściwości bakteriobójczych jest prekursorem dla chloramin. Może reagować z wieloma związkami zawierającymi grupy aminowe R-NH₂, tworząc pochodne azotowo-chlorowe typu monochloramin R-NHCl i dichloramin R-NCl₂, które są trwalsze od podchlorynów i silnie bakteriobójcze [74,97].



Kolejnym produktem aktywowanych fagocytów jest rodnik hydroksylowy - OH[•], silny oksydant, który powstaje w reakcji Habera-Weissa między anionorodnikiem nadadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru [73,118].

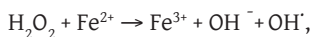


Ryc. 2. Schemat zależnej od mieloperoksydazy produkcji RFT w trakcie wybuchu oddechowego fagocytów zmodyfikowano wg Champe [27]

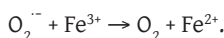


Bardziej skuteczna w wytwarzaniu rodnika hydroksylowego jest reakcja Fentona, zachodząca przy katalitycznym udziale jonów żelaza Fe^{2+}/Fe^{3+} [36].

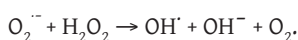
Mechanizm powstawania OH^{\cdot} w układach biologicznych zakłada istnienie cyklu dwóch reakcji: jedna z nich jest właściwą reakcją Fenona:



druga natomiast to reakcja regenerująca jony Fe^{2+} , drogą redukcji przez anionorodnik ponadtlenkowy jonu żelaza Fe^{3+} , powstającego w wyniku pierwszej reakcji:

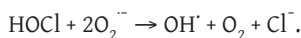


Sumując oba równania, otrzymujemy prezentowaną wcześniej reakcję Habera-Weissa katalizowaną przez jony żelaza:



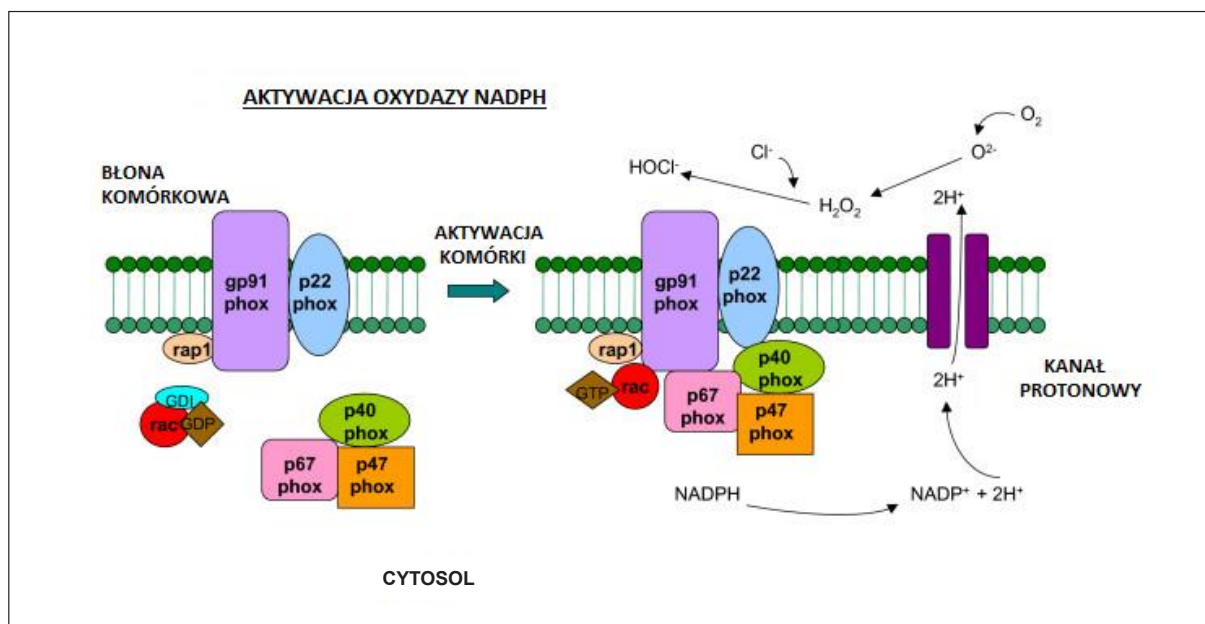
Reakcję tę mogą katalizować nie tylko jony żelaza, również jony miedzi (Cu^+/Cu^{2+}), a także innych metali przejściowych. Występowanie nawet w bardzo małych stężeniach jonów Fe lub Cu w płynach ustrojowych jest wystarczające do produkcji rodnika hydroksylowego [15].

Wytwarzanie rodnika hydroksylowego przez aktywne neutrofile zachodzi również dzięki mechanizmowi zależnemu od MPO, które katalizuje powstawanie $HOCl$ w reakcji utleniania jonów Cl^- przez H_2O_2 , a następnie kwas podchlorawy reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym, tworząc rodnik hydroksylowy OH^{\cdot} [102], zgodnie z reakcją:



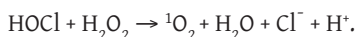
Wytwarzanie OH^{\cdot} jest hamowane w wyniku działania dysmutazy ponadtlenkowej - SOD, przekształcającej anionorodnik ponadtlenkowy w nadtlenek wodoru, a także w wyniku działania katalazy rozkładającej nadtlenek wodoru oraz w wyniku działania azydków, które są inhibitorami mieloperoksydazy [73].

Dzięki systemowi zależnemu od MPO w neutrofilach dochodzi również do powstania tlenu singletowego (1O_2), wysoce



Ryc. 3. Schemat budowy oksydazy NADPH, zmodyfikowano wg Assari [7]

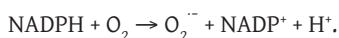
energetycznej formy tlenu, której dwa niesparowane elektrony na zewnętrznej orbicie posiadają przeciwny spin i dzięki temu mogą bardzo szybko reagować z innymi parami elektronów. Tlen singletowy powstaje w reakcji kwasu podchlоровego z nadtleniem wodoru [45,106]:



W ostatnim czasie również ozon - O_3 jest uważany za produkt wybuchu oddechowego neutrofilii. Do syntezy ozonu jest wykorzystywany ${}^1\text{O}_2$ (tworzony przez system zależny od MPO). Ozon posiada właściwości bakterio-bójcze, jednak jego toksyczność w stosunku do mikroorganizmów w powiązaniu z nadtleniem wodoru, jest wyraźnie wyższa niż w przypadku działania tych związków oddzielnie [11,116].

OKSYDAZA NADPH

W 1964 r. Rossi i Zatti po raz pierwszy zasugerowali, że enzymem odpowiedzialnym za wybuch oddechowy fagocytów jest oksydaza NADPH, a w 1973 r. Babior, Kipnes i Curnutte ogłosili, że pierwotnym produktem oksydazy NADPH jest anionorodnik ponadtlenny, powstający zgodnie z reakcją [8,98]:



Oksydaza NADPH jest śródbłonowym enzymem, dzięki któremu dochodzi do przeniesienia elektronu ze zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego - NADPH powstającego w cyklu pentozowym i znajdującego się po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej, na tlen cząsteczkowy, znajdujący się w płynie zewnątrzkomórkowym lub we wnętrzu

tworzącego się fagosomu, powodując jednoelektronową redukcję cząsteczki tlenu do anionorodnika ponadtlennego $\text{O}_2^{\cdot -}$ [15,17].

Oksydaza NADPH to enzym składający się z 5 podjednostek: p40^{phox} , p47^{phox} , p67^{phox} , p22^{phox} i $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (zwanej również NOX2).

Nazewnictwo poszczególnych jednostek oksydazy NADPH jest związane z ich budową chemiczną, gdzie: p - protein, gp - glycoprotein, natomiast liczba występująca po p lub gp - oznacza masę cząsteczkową podjednostki. Symbol phox - jest związany z przynależnością komórkową i pochodzi od phagocyte oxidase [11,45].

W komórkach fagocytów będących w stanie spoczynku 3 z 5 podjednostek: p40^{phox} , p47^{phox} i p67^{phox} znajdują się w cytosolu, gdzie tworzą kompleks zawierający po jednej kopii każdej podjednostki [80,88,89]. Dwie pozostałe jednostki: p22^{phox} i $\text{gp91}^{\text{phox}}$ występują w postaci heterodimeru, zawierającego również po jednej kopii każdej podjednostki i są zlokalizowane w nieaktywnych fagocytach w 85% w błonach ziarnistości swoistych - wtórnych i w błonach pęcherzyków wydzielniczych [45]. Natomiast pozostałe 15% znajduje się w błonie plazmatycznej, gdzie wraz z jedną cząsteczką dinukleotydu flawinoadeninowego - FAD i dwoma różnymi ugrupowaniami hemowymi tworzą cytochrom b_{558} [11,56,102]. Cząsteczka FAD w cytochromie b_{558} pełni rolę miejsca wiążącego cząsteczkę NADPH, a grupy hemowe biorą udział w transporcie elektronów na tlen. Jedna z grup hemowych selektywnie wiąże się z podjednostką $\text{gp91}^{\text{phox}}$, a druga łączy $\text{gp91}^{\text{phox}}$ z p22^{phox} , przez co mogą być niezbędne w czasie łączenia się oksydazy NADPH w aktywny kompleks enzymatyczny [1,37,55,56].

Aktywacja oksydazy NADPH powoduje przemieszczenie całej puli cytochromu b_{558} do błon plazmatycznych lub fagosomalnych, gdzie dochodzi do połączenia się jednostek cytosolowych z cytochromem b_{558} i prawdopodobnie białkiem Rap1A [17,74,101]. Translokacja jednostek cytosolowych jest poprzedzona fosforylacją niektórych białkowych elementów oksydazy [23]. Utrzymanie oksydazy NADPH w stanie aktywnym wymaga stałego przemieszczania się podjednostek cytosolowych do błony fagosomalnej lub plazmatycznej, natomiast rozdzielanie jednostek cytosolowych od cytochromu b_{558} gwarantuje, że oksydaza NADPH jest nieaktywna w komórkach fagocytów będących w stanie spoczynku [11,113].

Oprócz wymienionych białkowych podjednostek cytosolowych, w cytoplazmie występują również drobno-cząsteczkowe białka Rac2 i Rac1 niezbędne w procesie aktywacji oksydazy NADPH [47]. Białka Rac nie są uważane za podjednostki oksydazy NADPH, ponieważ odpowiadają też za regulację innych funkcji komórkowych, a w szczególności organizację cytoszkieletu i proces chemotaksji [17,72]. Białko Rac2 należy do rodziny Rho białek G i jest dominującym białkiem wiążącym nukleotydy guaninowe w ludzkich neutrofilach [47,55,77].

W fagocytach będących w stanie spoczynku Rac2 występuje w kompleksie z cząsteczką GDI (dissociation inhibitor, GDP), która jest inhibitorem dysocjacji białka Rac2 i cząsteczki GDP. Aktywacja zaś komórek fagocytujących prowadzi do rozpadu kompleksu Rac2 - GDP-dissociation inhibitor, czemu towarzyszy przekształcenie cząsteczki GDP w GTP. Białko Rac2 związane z GTP migruje do błony fagosomalnej lub plazmatycznej, co w konsekwencji umożliwia transfer cytochromu b_{558} , znajdującego się w błonach pęcherzyków wydzielniczych do błony plazmatycznej [1,11,77,99,105]. W błonie plazmatycznej Rac2 wiąże się bezpośrednio z $p67^{phox}$, nie łączy się natomiast z jednostkami $p40^{phox}$ i $p47^{phox}$ [55,83].

Interakcja między aktywnym (związanym z GTP) białkiem Rac i $p67^{phox}$ jest podstawowa dla aktywacji oksydazy NADPH, gdyż stanowi swego rodzaju rusztowanie umożliwiające dokładne zakotwiczenie białka $p67^{phox}$ w cytochromie b_{558} [55]. Prawidłowe oddziaływanie między tymi jednostkami prowadzi do zmian konformacyjnych w podjednostce $p67^{phox}$, co wpływa na jej aktywację [99].

W białku Rac2 zidentyfikowano dwa ważne dla aktywności oksydazy NADPH regiony: „effector region” odpowiedzialny za wiązanie $p67^{phox}$ i „insert region”, który prawdopodobnie odpowiada za interakcję z cytochromem b_{558} [93].

W cytochromie b_{558} cząsteczka FAD i 2 grupy hemowe stanowią ścieżkę redox, umożliwiającą transport elektronów ze zredukowanego NADPH znajdującego się w cytosolu, poprzez błonę plazmatyczną na tlen cząsteczkowy [17,34,55,99,115].

Transfer elektronów jest wieloetapowy. Początkowo elektrony z NADPH są przenoszone na cząsteczkę FAD, a proces jest regulowany przez podjednostkę $p67^{phox}$. Następnie pojedynczy elektron ze zredukowanego $FADH_2$ przechodzi na cząsteczkę hemu znajdującą się po wewnętrznej stronie membrany. Ponieważ atom żelaza w grupie hemowej może przyjąć tylko pojedynczy elektron, konieczne jest przed przyjęciem drugiego elektronu z częściowo zredukowanej cząsteczki FAD dalsze przeniesienie elektronu na drugi (zewnątrzny) hem, a następnie na tlen, co prowadzi do utworzenia anionorodnika ponadtlenkowego [30,32,104]. Cząsteczka FAD jest uważana za element niezbędny w transporcie elektronów. Aktywność oksydazy NADPH zostaje utracona, gdy cytochrom b_{558} zostaje pozbawiony cząsteczki FAD (co wynika z zablokowania ścieżki transportu elektronów) i przywrócona powtórnie, kiedy nastąpi rekonstrukcja cytochromu b_{558} cząsteczką FAD. Poza tym aktywność oksydazy zostaje utracona w wyniku działania antagonistów FAD, takich jak: deaza-FAD i DPI (jodonian dwufenylowy) [30,55,61,102]. W komórkach będących w stanie spoczynku FAD znajduje się w stanie równowagi między formą związaną i niezwiązaną z cytochromem b_{558} . Najprawdopodobniej dzięki tak luźnemu i niedokładnemu powiązaniu cząsteczki FAD w cytochromie b_{558} , przydatkowe powstawanie ROS jest ograniczone, gdyż mało prawdopodobny wydaje się przepływ elektronów w tak niedoskonałym układzie, chociaż dalsze badania wydają się konieczne, by określić mechanizm, dzięki któremu FAD może działać jako regulator aktywności oksydazy NADPH [30,61].

Pod wpływem działania czynników aktywujących komórki fagocytów, struktura miejsca wiązania cząsteczki FAD w cytochromie b_{558} ulega modyfikacji, co skutkuje ścisłym połączeniem, wcześniej wolnego FAD z cytochromem b_{558} . Następnym tego ścisłego powiązania jest przyłączenie białkowych podjednostek cytosolowych, które odgrywają znaczącą rolę w utrzymaniu cząsteczki FAD w cytochromie b_{558} w aktywnej oksydazie. Maskowanie wiązania cząsteczki FAD w cytochromie przez jednostki cytosolowe gwarantuje wysoką stabilność aktywnej oksydazy, między innymi przez osłanianie miejsca wiązania FAD i grup hemowych przed działaniem licznych związków chemicznych, powszechnie uważanych za inhibitory transportu elektronów, do których należą: cyjanki, azydki, tlenek węgla i pirydyna [30,69,86].

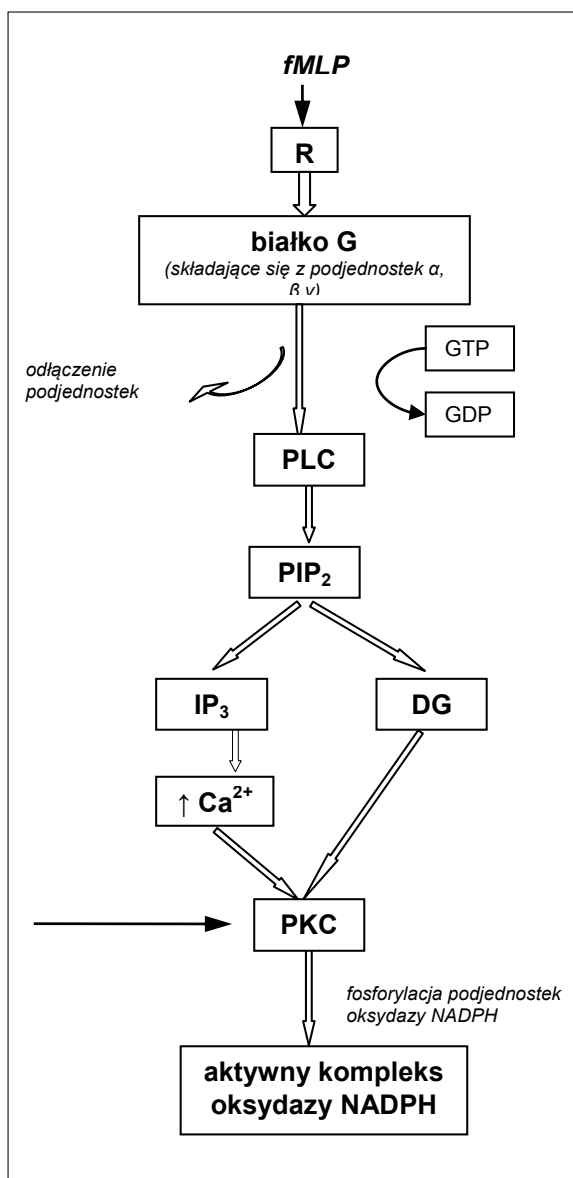
Ważnym czynnikiem umożliwiającym poznanie fizjologicznego znaczenia poszczególnych jednostek białkowych dla aktywności oksydazy NADPH było odkrycie przewlekłej choroby ziarniakowej - CGD (chronic granulomatous disease), objawiającej się bardzo ciężkimi i nawracającymi infekcjami bakteryjnymi i grzybiczymi. Choroba charakteryzuje się brakiem lub znaczącym ograniczeniem aktywności enzymatycznej oksydazy NADPH, a w związku z tym zahamowaniem „wybuchu oddechowego” w komórkach fagocytów. Przyczyną jest całkowita nieobecność, niedobór lub zmiany struktury

ralne w budowie białek, będących elementami składowymi oksydazy NADPH [7,64,89].

Białkowa podjednostka cytosolowa p67^{phox} przez interakcję z białkiem Rac i cytochromem b₅₅₈ wpływa na aktywność oksydazy NADPH [34,44,99]. Jest ona niezbędnym elementem, gdyż umożliwia transport elektronów do cząsteczki FAD w cytochromie b₅₅₈, nawet w przypadku braku podjednostki p47^{phox} [30,58,88,90]. Stwierdzono również, że w tej jednostce znajduje się miejsce wiązania dla NADPH, aczkolwiek miejsca takie występują również w cytochromie b₅₅₈ [28,33,82,105]. Podjednostka p67^{phox} w komórkach w stanie spoczynku stale ulega procesom fosforylacji i defosforylacji [35,102]. Aktywacja neutrofilów wiąże się również z procesem fosforylacji p67^{phox}, jednak jej znaczenie dla aktywacji oksydazy NADPH nadal pozostaje niejasne [34,89]. Na podstawie obserwacji pacjentów z CGD, którzy posiadają mutację w jednostce p67^{phox} stwierdzono, że nie ma ona zdolności wiązania z białkiem Rac2, a ponadto nie dochodzi u nich do przemieszczania się jednostek cytosolowych do błony plazmatycznej w wyniku aktywacji oksydazy [8]. Dane te nie są jednak jednoznaczne, gdyż według innych źródeł brak p67^{phox} uniemożliwia tylko przemieszczanie się białka p40^{phox}, a translokacja i fosforylacja p47^{phox} pozostaje niezmienną [12,30,88,94,104,114].

Jednostka p47^{phox} w głównej mierze jest odpowiedzialna za transport kompleksu cytosolowego do błon plazmatycznych w czasie aktywacji oksydazy NADPH i jest swego rodzaju łącznikiem między cytochromem b₅₅₈ i podjednostkami cytosolowymi [17,75]. Pierwszym etapem aktywacji jest fosforylacja trzech reszt serynowych w autoinhibitorowym regionie w podjednostce p47^{phox} prowadząca do zmian konformacyjnych, odsłaniających domenę PX odpowiedzialną za wiązanie z difosforanem fosfatydyloinozytolu, przez co możliwe jest połączenie z p22^{phox} [6,81,99,114]. Proces fosforylacji p47^{phox} to mechanizm umożliwiający kontrolę tworzenia aktywnego kompleksu enzymatycznego oraz zapobiegający niezamierzonej aktywacji enzymu. Po przyłączeniu grup fosforanowych do reszt serynowych następuje przemieszczenie podjednostki p47^{phox} połączonej z p67^{phox} i p40^{phox} do błony plazmatycznej, w celu współdziałania z elementami błonowymi [6,44].

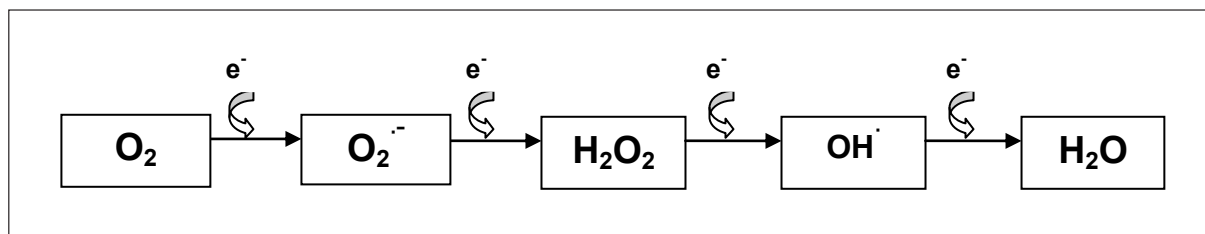
Brak podjednostki p47^{phox} jest przyczyną występowania jednej z form CGD. U osób pozbawionych podjednostki p47^{phox} białka p67^{phox}, p40^{phox} i Rac2 tracą zdolność do przemieszczania się z cytosolu do błony plazmatycznej w wyniku aktywacji drogą receptorową chemotaktycznym peptydem bakteryjnym - fMLP i estrem forbolu - PMA, który jest bezpośrednim aktywatorem kinazy białkowej C [43,103]. Jednak w doświadczalnych układach bezkomórkowych, zawierających wyizolowany cytochrom b₅₅₈ i podjednostki cytosolowe stwierdzono, że obecność podjednostki p47^{phox} nie jest konieczna do aktywacji oksydazy pod warunkiem, że w układach tych podjednostka p67^{phox} i białko Rac2 występują w wysokich stężeniach. Obecność p47^{phox} powoduje jednak pra-



Ryc. 4. Schemat aktywacji oksydazy NADPH. R - receptor, PLC - fosfolipaza C, PIP₂ – difosforan fosfatydyloinozytolu, IP₃ -1,4,5 inozytolotrifosforan, DG – 1,2 diacyloglicerol, ↑Ca²⁺ - uwolnienie Ca²⁺ z magazynów wewnątrzkomórkowych do cytoplazmy oraz transport wapnia ze środowiska zewnętrznego poprzez błonę komórkową, PMA – ester forbolu (bezpośredni aktywator kinazy białkowej C), PKC – kinaza białkowa C

wie 100-krotny wzrost siły wiązania poszczególnych podjednostek w aktywnej oksydazie [4,41,52,76,83].

Rola podjednostki 40^{phox} w aktywacji oksydazy NADPH jest słabo poznana [25,88]. Przypuszczano, iż najprawdopodobniej pełni ona rolę regulatorową, jednak wyniki badań nie są jednoznaczne. Z jednej strony ufosforylowana podjednostka p40^{phox} hamuje aktywność oksydazy, natomiast według innych doniesień fosforylacja tej jednostki przez kinazę białkową C (PKCδ) jest niezbędna dla przemieszczenia się podjednostki p47^{phox} do błon fago-



Ryc. 5. Schemat budowy łańcucha oddechowego, zmodyfikowano wg [27]

somu i osiągnięcie pełnej aktywacji oksydazy w komórkach neutrofilii myszy [29,61,63,82].

Do niedawna nie było informacji o przypadku braku jednostki $p40^{phox}$ ani ważnych pod względem funkcjonalnym zmian w budowie tego elementu oksydazy NADPH w jakiegokolwiek postaci CGD [19,102]. Jednak ostatnio opisano przypadek pacjenta z CGD, u którego stwierdzono mutację w podjednostce $p40^{phox}$. Przypadek ten potwierdza, iż $p40^{phox}$ poprzez wiązanie trifosforanu fosfatydyloinozytolu (IP₃) odgrywa ważną rolę w aktywacji oksydazy NADPH w czasie fagocytozy, umożliwiając połączenie podjednostek cytosolowych z membraną plazmatyczną [29,56,95,99].

Lipidy błony plazmatycznej, oprócz fosforylacji cytosolowych podjednostek, biorą udział w regulacji aktywności oksydazy NADPH [23,69]. Wytwarzanie diacyloglicerolu i inozytolotrifosforanu - IP₃ (odpowiadającego za uwalnianie Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych) przez fosfolipazę C prowadzi do aktywacji kinazy białkowej C i fosforylacji podjednostki $p47^{phox}$ oraz innych elementów oksydazy [2,83].

MITOCHONDRIA - GŁÓWNE ŹRÓDŁO REAKTYWNYCH FORM TLENU

Mitochondria to główne źródło reaktywnych form tlenu (ROS) w organizmach aerobowych. Zdecydowaną większość komórkowej produkcji ROS, szacowaną nawet na 90%, przypisuje się właśnie mitochondriom [12,65,91]. W warunkach prawidłowych wytwarzanie ROS jest nieuniknione i może przyczyniać się do narastania „stresu oksydacyjnego”, ale cząsteczki te mogą pełnić istotną rolę w redox-zależnych procesach przepływu informacji [16,26,41,94,112].

W warunkach patologicznych powstawanie ROS jest wyraźnie wzmożone. Nadmierna ich ilość poprzez oksydację białek, lipidów i DNA przyczynia się do uszkodzenia komórek, co prowadzi do zaburzeń ich funkcji biologicznych, a w konsekwencji do licznych chorób dotykających niemal wszystkich części ludzkiego organizmu, a w szczególności dwóch najważniejszych narządów, tj.: serca i mózgu [6,46,48,67,81,103]. Ponadto, ROS u ludzi zdrowych przyczyniają się do procesów starzenia się organizmu [42,108]. Dotychczasowe wyniki badań śledzących proces produkcji ROS w mitochondriach nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić czy w warunkach patologicznych akumulacja ROS

uwalnianych podczas fosforylacji oksydacyjnej jest pierwotnym czynnikiem, czy też konsekwencją innych dysfunkcji komórkowych.

W mitochondriach jest kontynuowany proces katabolizmu związków (węglowodanów, białek i lipidów) będących źródłem energii w organizmie. Obejmuje on przemianę reszt acetylowych w cyklu kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa, cykl kwasu cytrynowego). Wynikiem jest powstanie wysokoenergetycznych związków NADH i $FADH_2$ (tzw. równoważników wodorowych), będących donorami elektronów, które są przenoszone za pośrednictwem mitochondrialnego łańcucha oddechowego na tlen cząsteczkowy. Wieloetapowa, cztero-elektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania H_2O [79]. Jednak niewielka część elektronów przedwcześnie „wycieka” z łańcucha oddechowego, powodując jednoelektronową redukcję tlenu i powstanie anionorodnika ponadtlenkowego [4,15,49,91].

BUDOWA MITOCHONDRIALNEGO ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO

W budowie mitochondrialnego łańcucha oddechowego strukturalnie i funkcjonalnie wyróżnić można 4 złożone, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną kompleksy białkowe:

kompleks I - oksydoreduktaza NADH: ubichinon (dehydrogenaza NADH),

kompleks II - oksydoreduktaza bursztynian: ubichinon (dehydrogenaza bursztynianowa),

kompleks III - oksydoreduktaza ubichinon: utleniony cytochrom c (kompleks cytochromów b - c₁),

kompleks IV - oksydaza cytochromowa (oksydoreduktaza zredukowany cytochrom c: tlen).

Poszczególne ogniwa łańcucha oddechowego nie kontaktują się ze sobą bezpośrednio. Elementami spinającymi poszczególne kompleksy są: zakotwiczony w wewnętrznej membranie mitochondrialnej wysoce hydrofobowy ubichinon (Q) i rezydujący w przestrzeni międzymembranowej hydrofilowy cytochrom c [79].

Kompleks I (oksydoreduktaza NADH: ubichinon) jest pierwszym ogniwem mitochondrialnego łańcucha oddechowego, katalizującym pierwszy etap fosforylacji oksy-

dacyjnej zachodzącej w mitochondriach. Enzym ten katalizuje utlenianie NADH w matriks i przeniesienie 2 elektronów z NADH za pośrednictwem mononukleotydu flawinowego FMN i serii centrów żelazowo-siarkowych na ubiquinon, znajdujący się w wewnętrznej membranie mitochondrialnej [25,66]. Cząsteczka FMN ulega redukcji do FMNH₂, następnie elektrony przechodzą na centra żelazowo-siarkowe, które jednorazowo mogą przyjąć tylko jeden elektron, czemu towarzyszy redukcja jonów żelaza: Fe³⁺ → Fe²⁺. Utlenianie cząsteczki FMNH₂ jest możliwe jedynie dzięki dwóm jednoelektronowym reakcjom, zachodzącym po sobie i prowadzącym do wytworzenia produktu przejściowego semichinonu - Q (będącego wolnym rodnikiem), którego dalsza redukcja prowadzi do powstania cząsteczki hydrochinonu (ubichinolu) - QH₂. Przeniesieniu 2 elektronów z NADH na ubiquinon towarzyszy przeniesienie 4 protonów z matriks do przestrzeni międzylonowej, skutkujące wytworzeniem w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej elektrochemicznego gradientu protonowego, tzw. siły protonomotorycznej (Δp). Siła protonomotoryczna jest komponentą dwóch składników: gradientu pH (gradientu chemicznego) oraz elektrycznego potencjału transbłonowego (ΔΨ), wynikającego z różnicy rozmieszczenia ładunków elektrycznych po obu stronach błony. Elektrochemiczny gradient protonowy jest formą tymczasowego magazynowania energii, stopniowo uwalnianej w czasie przepływu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego, który następnie jest wykorzystywany do napędzania syntazy ATP (transportującej H⁺) i tworzenia w obecności ADP i P_i wysokoenergetycznego adenylozotrifosforanu - ATP. Kompleks I generuje około 40% całkowitego gradientu protonowego, jaki jest tworzony w wyniku utleniania NADH przez cały łańcuch oddechowy [62,98].

Kompleks I jest największym kompleksem proteinowym zakotwiczonym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Jest multikompleksem zbudowanym z 45 polipeptydów, o całkowitej masie cząsteczkowej ok. 1 MDa (980 kDa), niekwalencyjnie związanych z mononukleotydem flawinowym FMN oraz centrami żelazowo-siarkowymi [24,62,65]. Kompleks ma kształt litery L, z jednym hydrofobowym łańcuchem, zakotwiczonym w błonie mitochondrialnej i drugim ramieniem hydrofilowym, skierowanym w kierunku mitochondrialnej matriks [19,63,66,92,117].

7 spośród 45 subkompleksów jest kodowane przez mitochondrialne DNA, a pozostałe 38 to produkty jądrowego genomu, które z cytoplazmy są przenoszone do mitochondrium.

Podjednostki kodowane przez mitochondrialne DNA i 7 podjednostek kodowanych przez jądrowe DNA, tworzą tzw. „core subunits” i stanowią katalityczny rdzeń enzymu. Wymienione podjednostki wiążą się z FMN, 8 lub 9 centrami żelazowo-siarkowymi i jedną lub więcej cząsteczkami ubiquinonu [62,98].

Pozostałe 31 podjednostek polipeptydowych, które są określane jako tzw. „supernumerary”, nie bierze bezpo-

średnio udziału w transporcie elektronów, jak również w generowaniu gradientu protonowego. Najprawdopodobniej odgrywają one ważną rolę w utrzymaniu stabilności kompleksu, jednak funkcja większości z nich nie została do tej pory poznana [63,66].

Dzięki dysocjacji kompleksu I odkryto, że miejsce wiązania cząsteczki NADH i wszystkich centrów redoks (tzn. FMN oraz centrów żelazowo-siarkowych) znajdują się w peryferyjnym ramieniu, natomiast struktury uczestniczące w mechanizmie „pompowania” protonów do przestrzeni międzylonowej, najprawdopodobniej są usytuowane w hydrofobowym łańcuchu ściśle związanym z błoną mitochondrialną.

W kompleksie I występuje 8-9 centrów żelazowo-siarkowych: N1a, N1b - [2Fe-2S] i N2, N3, N4, N5, N6a, N6b i N7 - [4Fe-4S]. U wielu gatunków w dehydrogenazie NADH kompleks N7 nie występuje, stąd najprawdopodobniej nie jest on częścią ścieżki przepływu elektronów [95,98].

Kompleks II - oksydoreduktaza bursztynianu: ubiquinon pełni w komórkach podwójną funkcję, gdyż jest to enzym katalizujący reakcję utleniania bursztynianu do fumaranu w przemianach cyklu kwasu cytrynowego (cykl Krebsa), jest również częścią mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, gdzie katalizuje reakcję utleniania bursztynianu do fumaranu, połączoną z redukcją ubiquinonu (Q) do hydrochinonu (ubichinolu - QH₂).

W kompleksie II wyróżnić można 2 części składowe: podjednostkę hydrofilową składającą się z flawoproteiny - SdhA, w której kowalencyjnie związana cząsteczka dinukleotydu flawinoadeninowego FAD jest częścią katalitycznego centrum enzymu oraz białko żelazowo-siarkowe - SdhB, w którym znajdują się trzy centra żelazowo-siarkowe: [2Fe-2S]²⁺, [4Fe-4S]²⁺, [3Fe-4S]¹⁺, stanowiące ścieżkę transportu elektronów z cząsteczki FAD na związany z błoną mitochondrialną ubiquinon.

Budowa cząsteczki flawoproteinowej i białka żelazowo-siarkowego w podjednostce hydrofilowej kompleksu II charakteryzuje się dużym stopniem podobieństwa u różnych gatunków. Część hydrofilowa kompleksu wiąże się z błoną mitochondrialną dzięki interakcji białka SdhB z dwiema hydrofobowymi podjednostkami SdhC i SdhD, które tworzą w komórkach ssaków cytochrom b, zawierający cząsteczkę hemu i kotwiczą cały enzym w błonie mitochondrialnej [2,65].

W czasie utleniania bursztynianu do fumaranu, następuje odłączenie 2 elektronów i 2 protonów, a kowalencyjnie związany kofaktor flawinowy FAD ulega redukcji do FADH₂, następnie ww. elektrony są pojedynczo przenoszone za pośrednictwem trzech centrów żelazowo-siarkowych na cząsteczkę ubiquinonu, zakotwiczoną w błonie mitochondrialnej i umożliwiającą ich wejście i dalszy przepływ wzdłuż łańcucha oddechowego, zaś 2 protony pochodzące z oksydacji bursztynianu są wykorzystywane do redukcji ubiquinonu.

Kompleks II nie generuje gradientu protonowego, gdyż nie dochodzi tutaj do pompowania protonów do przestrzeni międzymembranowej [28].

Cząsteczka ubichinonu jest elementem spinającym kompleks I i kompleks II z resztą mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

Kompleks III - (kompleks cytochromów b-c₁) w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym katalizuje reakcję przeniesienia elektronów z cząsteczki hydrochinonu (ubichinolu) na cytochrom c, połączoną z przemieszczeniem protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej.

W organizmach eukariotycznych kompleks III jest homodimerem o masie ok. 480 kDa. Każdy monomer składa się z 10 lub 11 podjednostek rozdystrybuowanych w trzech regionach: w mitochondrialnej matriks, w przestrzeni międzymembranowej i w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [48].

Do funkcjonowania enzymu są niezbędne 3 podjednostki związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną, stanowiące katalityczny rdzeń enzymu. Pierwszą z nich jest cytochrom b z 2 różnymi cząsteczkami *hemu* typu b: b_L (o niskim potencjale) i b_H (o wysokim potencjale). Druga to cytochrom c₁, w którym znajduje się cząsteczka *hemu* typu c. Trzecia to białko żelazowo-siarkowe IPS, z centrum żelazowo-siarkowym 2Fe-2S. Rola pozostałych podjednostek nie jest dokładnie poznana. Cytochrom b jest kodowany przez genom mitochondrialny, a pozostałe podjednostki mają swe źródło w genomie jądrowym [46].

W kompleksie III, a dokładniej w cytochromie b, występują dwa różne miejsca wiążące cząsteczkę ubichinonu, usytuowane po przeciwnych stronach błony i połączone wewnątrzmembranową ścieżką transferu elektronów. Pierwsze z nich to miejsce utlenienia hydrochinonu, tzw. *centrum P* (lub Q_P), znajdujące się po dodatniej stronie membrany i drugie miejsce, w którym dochodzi do redukcji ubichinonu, tzw. *centrum N* (lub Q_N), zlokalizowane po ujemnej stronie błony mitochondrialnej.

Pierwsza faza przemian obejmuje reakcję utleniania hydrochinonu, w czasie której dochodzi do odłączenia w miejscu Q_P dwóch elektronów z cząsteczki hydrochinonu i przeniesienie jednego z nich na cytochrom c za pośrednictwem białka żelazowo-siarkowego IPS i cytochromu c₁. Drugi elektron przechodzi w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej za pośrednictwem cząsteczki *hemu* b_L, a następnie *hemu* b_H, kończąc swą wędrówkę w miejscu Q_N, gdzie dochodzi do redukcji cząsteczki ubichinonu, z przejściowym wytworzeniem rodnika semichinonowego - Q, występującego w formie anionowej lub neutralnej, w zależności od kolejności transferu elektronów i protonów. Oksydacja kolejnej cząsteczki hydrochinonu w centrum P i przeniesienie następnego elektronu za pośrednictwem cytochromu b, prowadzi do dalszej redukcji rodnika

semichinonowego i powstania cząsteczki hydrochinonu, czemu towarzyszy pobranie dwóch protonów z mitochondrialnej matriks w centrum N (Q_N). W ciągu całego cyklu przemian w kompleksie III mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów dwie cząsteczki hydrochinonu ulegają utlenieniu w centrum P (Q_P), zaś w centrum N dochodzi do regeneracji jednej cząsteczki hydrochinonu. Cały wyżej opisany proces wiąże się z przeniesieniem czterech protonów do przestrzeni międzymembranowej, co skutkuje wytworzeniem siły protonomotorycznej [46,67].

Kompleks IV - (oksydaza cytochromowa) jest końcowym ogniwem mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W komórkach ssaków jest to heterooligomeryczny kompleks o masie ok. 200 kDa, składający się z 13 zakotwiczonej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej podjednostek białkowych, kodowanych przez genom mitochondrialny i jądrowy. Katalityczny rdzeń enzymu stanowią 3 podjednostki Cox 1, Cox 2 i Cox 3 (kodowane przez mDNA) [10,11,49].

Podjednostka Cox 1 jest największym, silnie hydrofobowym ogniwem oksydazy cytochromowej, w którym zachodzi właściwa reakcja redukcji tlenu. W podjednostce tej, relatywnie głęboko, znajdują się dwa centra redox: pierwsze to cząsteczka *hemu* a, natomiast drugie to heterobimetaliczny kompleks *cytochromu* a₃ i *jonu miedzi* Cu_B (*hem* a₃-Cu_B). Podjednostka Cox 2 jest najmniejszym i najmniej hydrofobowym elementem katalitycznego rdzenia enzymu, w której w tzw. centrum Cu_A znajdują się dwa jony miedzi Cu(I) i Cu(II). W centrum Cu_A dochodzi do wiązania cząsteczki cytochromu c. Jony miedzi Cu_A są pierwotnym akceptorem elektronów przepływających przez końcowy fragment łańcucha oddechowego. Elektrony uwalniane z cząsteczki cytochromu c przechodzą na centrum Cu_A, następnie dochodzi do redukcji *hemu* a, a stąd elektrony dalej są przenoszone do centrum *hem* a₃-Cu_B (jest to tzw. faza redukcyjna). Redukcja kompleksu *hem* a₃-Cu_B umożliwia wiązanie cząsteczki tlenu, która ulega czteroelektronowej redukcji do wody (jest to tzw. faza utleniania) [10,11,24].

Transfer każdego elektronu wiąże się z translokacją do przestrzeni międzybłonowej dwóch protonów. Protony niezbędne do redukcji tlenu cząsteczkowego, jak również protony wykorzystywane przez oksydazę do generowania gradientu protonowego są pobierane z mitochondrialnej matriks i transportowane w sąsiedztwo centrum *hem* a₃-Cu_B. W podjednostce Cox 1 są zlokalizowane dwie ścieżki transferu protonów: tzw. K-pathway i D-pathway. Pierwsza z nich odpowiada za dostarczenie jednego lub dwóch protonów w fazie redukcyjnej, natomiast przez D-pathway są przenoszone pozostałe dwa lub trzy protony niezbędne do wytworzenia cząsteczki wody. Tą samą drogą „pompowane” są również protony do przestrzeni międzymembranowej w czasie generowania gradientu protonowego [118].

Podjednostka Cox 3, podobnie jak Cox 1 jest również białkiem wysoce hydrofobowym rozciągającym się

w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W podjednostce tej nie ma żadnej grupy prostetycznej. Przypuszcza się, iż podjednostka ta zapewnia stabilność całego enzymu, moduluje transfer protonów przez podjednostki Cox 1 i Cox 2, a także reguluje dostęp tlenu do centrum hem a_3 -Cu₈ [66].

Pozostałe podjednostki oksydazy cytochromowej kodowane przez genom jądrowy są syntetyzowane w cytoplazmie, a następnie przenoszone do mitochondrium, gdzie otaczają katalityczne centrum enzymu i prawdopodobnie są zaangażowane w stabilizację i proces dimeryzacji enzymu. Ponadto odgrywają one istotną rolę w ochronie katalitycznego rdzenia enzymu przed działaniem reaktywnych form tlenu, a także regulują katalityczną aktywność enzymu [49].

Pomimo braku danych dających uzasadnienie funkcjonalnej roli dimeryzacji oksydazy cytochromowej, uważa się, że katalitycznie aktywny enzym jest dime-rem utrzymywanym przez oddziaływanie między podjednostkami Cox 6a i Cox 6b [91]. Obok grup prostetycznych (3 jonów Cu, hemu a i a_3) niezbędnych do

funkcjonowania enzymu w podjednostce Cox 5b znajduje się jon Zn(II), a na powierzchni podjednostek Cox 1 i Cox 2 są zlokalizowane jony Mg(II). Dodatkowo w Cox 1 znajduje się pojedynczy jon Na(I) [10,11]. Znaczenie tych trzech dodatkowych kofaktorów nie jest do końca wyjaśnione.

PODSUMOWANIE

Głównymi miejscami endogennej produkcji ROS są mitochondria, które wytwarzają ROS w każdej komórce w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym w warunkach prawidłowych oraz oksydaza NADPH występująca w komórkach fagocytycznych, w których zwiększone wytwarzanie ROS jest wykorzystywane do zabijania atakujących mikroorganizmów w mechanizmie „wybuchu oddechowego”. Oba układy transportu elektronów są wieloetapowymi skomplikowanymi układami enzymatycznymi, stąd wiele możliwości wycieku elektronów, co stwarza trudności w diagnozowaniu miejsca wycieku. Od wielu lat trwają badania nad mechanizmami prowadzącymi do wytwarzania ROS, ale wciąż są one nie w pełni poznane.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abo A., Webb M.R., Grogan A., Segal A.W.: Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.*, 1994, 298: 585-591
- [2] Ackrell B.A.: Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett.*, 2000; 466: 1-5
- [3] Adams J.D. Jr, Chang M.L., Klaidman L.: Parkinson's disease - redox mechanisms. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8: 809-814
- [4] Adam-Vizi V., Chinopoulos C.: Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006; 27: 639-645
- [5] Ambasta R.K., Kumar P., Griendling K.K., Schmidt H.H., Busse R., Brandes R.P.: Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 45935-45941
- [6] Andersen J.K.: Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.*, 2004; 10: 18-25
- [7] Assari T.: Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med. Immunol.*, 2006; 21: 5-4
- [8] Babior B.M.: NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93: 1464-1476
- [9] Babior B.M.: The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 1984; 73: 599-601
- [10] Babior B.M., Kipnes R.S., Curnutte J.T.: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, 1973; 52: 741-744
- [11] Babior B.M., Takeuchi C., Ruedi J., Gutierrez A., Wentworth P.Jr.: Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 3031-3034
- [12] Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T.: Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 2005; 120: 483-495
- [13] Baldrige C.W., Gerard R.W.: The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.*, 1933; 103: 235-236
- [14] Bánfi B., Clark R.A., Steger K., Krause K.H.: Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 3510-3513
- [15] Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo naukowe PWN, 2008
- [16] Bartosz G.: Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.*, 2009; 77: 1303-1315
- [17] Bedard K., Krause K.H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 245-313
- [18] Benham A.M., van Lith M., Sitia R., Braakman I.: Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2013; 368: 20110403
- [19] Berrisford J.M., Sazanov L.A.: Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 29773-29783
- [20] Bhandary B., Marahatta A., Kim H.R., Chae H.J.: An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 14: 434-456
- [21] Blum D., Torch S., Lamberg N., Nissou M.F., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M.: Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.*, 2001; 65: 135-172
- [22] Bonekamp N.A., Völkl A., Fahimi H.D., Schrader M.: Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors*, 2009; 35: 346-355
- [23] Brécharde S., Plançon S., Tschirhart E.J.: New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca²⁺ signaling. *Antioxid Redox Signal.*, 2013; 18: 661-676

- [24] Brunori M., Giuffrè A., Sarti P.: Cytochrome c oxidase, ligands and electrons. *J. Inorg. Biochem.*, 2005; 99: 324-336
- [25] Carroll J., Fearnley I.M., Skehel J.M., Shannon R.J., Hirst J., Walker J.E.: Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 32724-32727
- [26] Cecchini G., Maklashina E., Yankovskaya V., Iverson T.M., Iwata S.: Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett.*, 2003; 545: 31-38
- [27] Champe P.C., Harvey R.A.: *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 3rd edition*. Lippincott, Williams & Wilkins, 2005
- [28] Cheng G., Lambeth J.D.: NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 4737-4742
- [29] Cross A.R.: p40^{phox} participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47^{phox} for flavocytochrome b₅₅₈. *Biochem. J.*, 2000, 349: 113-117
- [30] Cross A.R., Curnutte J.T.: The cytosolic activating factor p47^{phox} and p67^{phox} have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 6543-6548
- [31] Cross A.R., Segal A.W.: The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1657: 1-22
- [32] Dang P.M., Babior B.M., Smith R.M.: NADPH dehydrogenase activity of p67^{phox}, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry*, 1999; 38: 5746-5753
- [33] Dang P.M., Morel F., Gougerot-Pocidallo M.A., El Benna J.: Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67^{phox} by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*, 2003; 42: 4520-4526
- [34] Dang P.M., Raad H., Derkawi R.A., Boussetta T., Paclat M.H., Belambri S.A., Makni-Maalej K., Kroviarski Y., Morel F., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J.: The NADPH oxidase cytosolic component p67^{phox} is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol.*, 2011; 82: 1145-1152
- [35] Davis W.B., Mohammed B.S., Mays D.C., She Z.W., Mohammed J.R., Husney R.M., Sagone A.L.: Hydroxylation of salicylate by activated neutrophils. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38: 4013-4019
- [36] DeLeo F.R., Burritt J.B., Yu L., Jesaitis A.J., Dinauer M.C., Nauseef W.M.: Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 13986-13993
- [37] Dexter D.T., Jenner P.: Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013; 62: 132-144
- [38] Dikalova A., Clempus R., Lassègue B., Cheng G., McCoy J., Dikalov S., San Martin A., Lyle A., Weber, D.S., Weiss D., Taylor W.R., Schmidt H.H., Owens G. K., Lambeth J.D., Griendling K.K.: Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice circulation. *Circulation*, 2005; 112: 2668-2676
- [39] Dinauer M.C.: Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2005; 2005: 89-95
- [40] Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 47-95
- [41] Dröge W.: Oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003; 543: 191-200
- [42] Dusi S., Donini M., Rossi F.: Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40^{phox}, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47^{phox} or p67^{phox}. *Biochem. J.*, 1996; 314: 409-412
- [43] El-Benna J., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A., Marie J.C., Braut-Boucher F.: p47^{phox}, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.*, 2009; 41: 217-225
- [44] El-Benna J., Dang P.M., Périanian A.: Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 80: 778-785
- [45] Esser L., Quinn B., Li Y.F., Zhang M., Elberry M., Yu L., Yu C.A., Xia D.: Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome b_c complex. *J. Mol. Biol.*, 2004; 341: 281-302
- [46] Ferro E., Goitre L., Retta S.F., Trabalzini L.: The interplay between ROS and Ras GTPases: physiological and pathological implications. *J. Signal Transduct.*, 2012; 2012: 365769
- [47] Fisher N., Meunier B.: Molecular basis of resistance to cytochrome b_c inhibitors. *FEMS Yeast Res.*, 2008; 8: 183-192
- [48] Fontanesi F., Soto I.C., Horn D., Barrientos A.: Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2006; 291: C1129-C1147
- [49] Foubert T.R., Bleazard J.B., Burritt J.B., Gripenrog J.M., Baniulis D., Taylor R.M., Jesaitis A.J.: Identification of a spectrally stable proteolytic fragment of human neutrophil flavocytochrome b composed of the NH2-terminal regions of gp91^{phox} and p22^{phox}. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 38852-38861
- [50] Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O.: Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1822: 1363-1373
- [51] Freeman J.L., Abo A., Lambeth J.D.: Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 19794-19801
- [52] Geiszt M., Lekstrom K., Brenner S., Hewitt S.M., Dana R., Malech H.L., Leto T.L.: NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91^{phox} in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J. Immunol.*, 2003; 171: 299-306
- [53] Geiszt M., Lekstrom K., Witta J., Leto T.L.: Proteins homologous to p47^{phox} and p67^{phox} support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 20006-20012
- [54] Gorzalczyk Y., Sigal N., Itan M., Lotan O., Pick E.: Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 40073-40081
- [55] Groemping Y., Rittinger K.: Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.*, 2005; 386: 401-416
- [56] Gutteridge J.M., Halliwell B.: Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 393: 561-564
- [57] Halliwell B.: Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.*, 2006; 31: 509-515
- [58] Han C.H., Lee M.H.: Activation domain in P67^{phox} regulates the steady state reduction of FAD in gp91^{phox}. *J. Vet. Sci.*, 2000; 1: 27-31
- [59] Hanna I.R., Hilenski L.L., Dikalova A., Taniyama Y., Dikalov S., Lyle A., Quinn M.T., Lassègue B., Griendling K.K.: Functional association of nox1 with p22^{phox} in vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37: 1542-1549
- [60] Hashida S., Yuzawa S., Suzuki N.N., Fujioka Y., Takikawa T., Sumimoto H., Inagaki F., Fujii H.: Binding of FAD to cytochrome b558 is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 26378-26386
- [61] Hinchliffe P., Sazanov L.A.: Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science*, 2005; 309: 771-774
- [62] Hirst J., Carroll J., Fearnley I.M., Shannon R.J., Walker J.E.: The

nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1604: 135-150

- [63] Holland S.M.: Chronic granulomatous disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2013; 27: 89-99
- [64] Horsefield R., Yankovskaya V., Sexton G., Whittingham W., Shio-mi K., Omura S., Byrne B., Cecchini G., Iwata S.: Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 7309-7316
- [65] Hosler J.P.: The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1655: 332-339
- [66] Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L.: Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc_1 complex. *FEBS Lett.*, 2003; 545: 39-46
- [67] Hyslop P.A., Hinshaw D.B., Scraufstatter I.U., Cochrane C.G., Kunz S., Vosbeck K.: Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 31-37
- [68] Isogai Y., Iizuka T., Makino R., Iyanagi T., Orii Y.: Superoxide-producing cytochrome b. Enzymatic and electron paramagnetic resonance properties of cytochrome b558 purified from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 4025-4031
- [69] Iyer G.Y., Islam D.M., Quastel J.H.: Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature*, 1961, 192: 535-541
- [70] Kawahara T., Kuwano Y., Teshima-Kondo S., Takeya R., Sumimoto H., Kishi K., Tsunawaki S., Hirayama T., Rokutan K.: Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, 2004; 172: 3051-3058
- [71] Kawahara T., Ritsick D., Cheng G., Lambeth J.D.: Point mutations in the proline-rich region of p22^{phox} are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 31859-31869
- [72] Klebanoff S.J.: Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 77: 598-625
- [73] Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M.: Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.*, 2013; 93:185-198
- [74] Kleniewska P., Piechota A., Skibska B., Gorąca A.: The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2012; 60: 277-294
- [75] Koshkin V., Lotan O., Pick E.: The cytosolic component p47^{phox} is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase but is required for optimal superoxide production. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 30326-30329
- [76] Lam G.Y., Huang J., Brumell J.H.: The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin. Immunopathol.*, 2010; 32: 415-430
- [77] Lambeth J.D.: Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 43: 332-347
- [78] Lanza I.R., Nair K.S.: Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflugers Arch.*, 2010; 459: 277-289
- [79] Lapouge K., Smith S.J., Groemping Y., Rittinger K.: Architecture of the p40-p47-p67^{phox} complex in the resting state of the NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 10121-10128
- [80] Lefer D.J., Granger D.N.: Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med.*, 2000; 109: 315-323
- [81] Lopes L.R., Dagher M.C., Gutierrez A., Young B., Bouin A.P., Fuchs A., Babior B.M.: Phosphorylated p40^{phox} as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry*, 2004; 43: 3723-3730
- [82] Madani S., Hichami A., Legrand A., Belleville J., Khan N.A.: Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.*, 2001; 15: 2595-2601
- [83] Malhotra J.D., Kaufman R.J.: Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.*, 2007; 9: 2277-2293
- [84] Manivannan S., Scheckhuber C.Q., Veenhuis M., van der Klei I.J.: The impact of peroxisomes on cellular aging and death. *Front Oncol.*, 2012; 2: 50
- [85] Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein I., Vivès C., Forest E., Fieschi E.: p47^{phox} molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 28980-28990
- [86] Matsuno K., Yamada H., Iwata K., Jin, D., Katsuyama M., Matsuki M., Takai S., Yamanishi K., Miyazaki M., Matsubara H., Yabe-Nishimura C.: Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*, 2005; 112: 2677-2685
- [87] Matute J.D., Arias A.A., Dinauer M.C., Patiño P.J.: p40^{phox}: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2005; 35: 291-302
- [88] Matute J.D., Arias A.A., Wright N.A., Wrobel I., Waterhouse C.C., Li X.J., Marchal C.C., Stull N.D., Lewis D.B., Steele M., Kellner J.D., Yu W., Meroueh S.O., Nauseef W.M., Dinauer M.C.: A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40^{phox} and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, 2009; 114: 3309-3315
- [89] Miyano K., Ueno N., Takeya R., Sumimoto H.: Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 21857-21868
- [90] Murphy M.P.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 2009; 417: 1-13
- [91] Musatov A., Robinson N.C.: Cholate-induced dimerization of detergent- or phospholipid-solubilized bovine cytochrome C oxidase. *Biochemistry*, 2002; 41: 4371-4376
- [92] Nauseef W.M.: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.*, 2004; 122: 277-291
- [93] Nemoto S., Takeda K., Yu Z.X., Ferrans V.J., Finkel T.: Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol. Cell Biol.*, 2000; 20: 7311-7318
- [94] Pohl T., Bauer T., Dörner K., Stolpe S., Sell P., Zocher G., Friedrich T.: Iron-sulfur cluster N7 of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is essential for stability but not involved in electron transfer. *Biochemistry*, 2007; 46: 6588-6596
- [95] Rada B., Hably C., Meczner A., Timár C., Lakatos G., Enyedi P., Ligeti E.: Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin. Immunopathol.*, 2008; 30: 237-253
- [96] Rees M.D., Pattison D.I., Davies M.J.: Oxidation of heparan sulphate by hypochlorite: role of N-chloro derivatives and dichloramine-dependent fragmentation. *Biochem. J.*, 2005; 391: 125-134
- [97] Rossi F., Zatti M.: Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*, 1964; 20: 21-23
- [98] Sarfstein R., Gorzalczy Y., Mizrahi A., Berdichevsky Y., Molshanski-Mor S., Weinbaum C., Hirshberg M., Dagher M.C., Pick E.: Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67^{phox}: a study based on mutagenesis of p67^{phox}-Rac1 chimeras. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 16007-16016
- [99] Segal A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005; 23: 197-223
- [100] Seguchi H., Kobayashi T.: Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils. *J. Electron Microsc.*, 2002; 51: 87-91

- [101] Shen Z., Wu W., Hazen S.L.: Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical. *Biochemistry*, 2000; 39: 5474-5482
- [102] Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Bannerjee A., Silliman C.C.: Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 78: 1025-1042
- [103] Shukla V., Mishra S.K., Pant H.C.: Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2011; 2011: 572634
- [104] Sigal N., Gorzalczyk Y., Pick E.: Two pathways of activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of phagocytes *in vitro* - distinctive effects of inhibitors. *Inflammation*, 2003; 27: 147-159
- [105] Smith R.M., Connor J.A., Chen L.M., Babior B.M.: The cytosolic subunit p67^{phox} contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 977-983
- [106] Steinbeck M.J., Khan A.U., Karnovsky M.J.: Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 13425-13433
- [107] Stiburek L., Hansikova H., Tesarova M., Cerna L., Zeman J.: Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol. Res.*, 2006; 55, Suppl. 2: S27-S41
- [108] Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chun A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999; 401: 79-82
- [109] Takeya R., Ueno N., Kami K., Taura M., Kohjima M., Izaki T., Nunoi H., Sumimoto H.: Novel human homologues of p47^{phox} and p67^{phox} participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 25234-25246
- [110] Terlecky S.R., Terlecky L.J., Giordano C.R.: Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. *World J. Biol. Chem.*, 2012; 3: 93-97
- [111] Thannickal V.J., Fanburg B.L.: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000; 279: L1005-L1028
- [112] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 44-84
- [113] van Bruggen R., Anthony E., Fernandez-Borja M., Roos D.: Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67^{phox} during phagocytosis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 9097-9102
- [114] Vergnaud S., Paclet M.H., El Benna J., Pocard M.A., Morel F.: Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 1059-1067
- [115] Vignais P.V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 1428-1459
- [116] Wentworth P. Jr, McDunn J.E., Wentworth A.D., Takeuchi C., Nieva J., Jones T., Bautista C., Ruedi J.M., Gutierrez A., Janda K.D., Babior B.M., Eschenmoser A., Lerner R.A.: Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, 2002; 298: 2195-2199
- [117] Wikström M.: Proton translocation by cytochrome c oxidase: a rejoinder to recent criticism. *Biochemistry*, 2000; 39: 3515-3519
- [118] Winterbourn C.C.: Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*, 2002; 181-182: 223-227

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.