

1. STRESZCZENIE

Koenzym Q (Q) jest kluczowym nośnikiem elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym oraz ważnym przeciwutleniaczem chroniącym przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, obecnym we wszystkich błonach komórki. Z jednej strony zredukowany Q (ubichinol, QH_2) zapobiega powstawaniu wolnych rodników, z drugiej strony niepełna redukcja Q prowadzi do tworzenia rodnika semichinonowego, będącego źródłem powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) w łańcuchu oddechowym, które mogą prowadzić do stresu oksydacyjnego i uszkodzeń oksydacyjnych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie powiązania produkcji mitochondrialnych RFT (mRFT) ze stopniem redukcji mitochondrialnego Q (mQ) w warunkach fosforylujących (podczas syntezy ATP) i niefosforylujących. Materiałem użytym w pracy były mitochondria izolowane z komórek organizmu jednokomórkowego, ameby *Acanthamoeba castellanii* a także różne tkanki szczura, tj. płuca, mózg, serce i wątroba, oraz izolowane z nich mitochondria. Wykorzystanie różnych organizmów, różnych tkanek zwierzęcych oraz badanie wpływu treningu wytrzymałościowego na poziomie tkankowym i mitochondrialnym pozwoliło na szeroką, wielopoziomową analizę powiązania produkcji mRFT z poziomem redukcji mQ.

Przeprowadzona w mitochondriach *A. castellanii* szczegółowa analiza kinetyczna po raz pierwszy pokazała, że produkcja mRFT jest bezpośrednią funkcją poziomu redukcji mQ. Zwiększeniu poziomu redukcji mQ towarzyszy większa produkcja mRFT i odwrotnie. Zależność tworzenia mRFT od poziomu redukcji mQ jest różna dla dwóch dróg utleniających mQH_2 , tj. drogi cytochromowej (kompleks III i IV) oraz oksydazy alternatywnej. Zaproponowano, że poziom redukcji endogennej puli mQ może być użytecznym wskaźnikiem pozwalającym oszacować całkowity poziom produkcji RFT w mitochondriach.

Następnie badano wpływ treningu wytrzymałościowego na produkcję mRFT pod kątem tkankowej i mitochondrialnej puli Q, zwłaszcza QH_2 . Badając wpływ treningu wytrzymałościowego w płucach szczura wykazano odwrotną regulację Q na poziomie tkankowym i mitochondrialnym. Zwiększeniu poziomu Q jako przeciwutleniacza w komórkach płuc towarzyszył spadek mQ jako nośnika elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów, prowadząc (wraz z innymi zmianami na poziomie łańcucha oddechowego) do zmniejszenia produkcji mRFT.

Po raz pierwszy badano zmianę w produkcji mRFT, która następuje w wyniku przejścia z warunków niefosforylujących do warunków fosforylujących w mitochondriach różnych tkanek szczura o różnej zawartości zredukowanego mQ. Zmiana ta, obrazowana przez zaproponowany przez nas nowy parametr, tj. kontrolę oddechową produkcji RFT (KO_{RFT}), pokazuje zakres zmian produkcji mRFT podczas funkcjonowania mitochondriów, gdy łańcuch oddechowy nie jest hamowany. Różnice obserwowane w tkankach szczurów i ich mitochondriach w wielkości puli zredukowanego Q, w tym mQ, odzwierciedlają różne poziomy produkcji mRFT, a zatem mogą wskazywać różne zapotrzebowanie na zredukowany Q jako przeciwutleniacz.

Badając wpływ treningu wytrzymałościowego na zawartość Q oraz tworzenie mRFT w tkankach szczura o dużym zapotrzebowaniu na energię, tj. w sercu, wątrobie i mózgu, stwierdzono, że trening może indukować różną odpowiedź tkankową i mitochondrialną związaną z Q działającym jako przeciwutleniacz i nośnik elektronów w łańcuchu oddechowym. Obserwowane po treningu zmiany w produkcji mRFT w mitochondriach poszczególnych tkanek mogą być związane ze zmianami w aktywności i ilości poszczególnych komponentów systemu fosforylacji oksydacyjnej oraz jego molekularnej organizacji, jak również z wielkością puli utlenionego mQ, działającego jako nośnik elektronów w łańcuchu oddechowym.

Wyniki pracy doktorskiej podkreślają istotną rolę Q jako nośnika elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym oraz jako komórkowego przeciwutleniacza. Poziom produkcji mRFT zależy od szeregu wzajemnie powiązanych czynników, które wpływają na poziom redukcji mQ, m. in. od ilości Q w mitochondriach i tkankach, aktywności łańcucha oddechowego (w tym szlaków utleniających mQH_2 i redukujących mQ) a także poziomu stresu oksydacyjnego. Homeostaza redoks mQ jest kluczowym czynnikiem w modulowaniu produkcji mRFT.

2. SUMMARY

Coenzyme Q (Q) is a key electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and an important antioxidant against oxidative damage, present in all cell membranes. On the one hand, reduced Q (ubiquinol, QH₂) prevents the formation of free radicals, on the other hand, incomplete reduction of Q leads to the formation of a semiquinone radical, which is the source of reactive oxygen species (ROS) formation in the respiratory chain, resulting in oxidative stress and oxidative damage.

The aim of this dissertation was to investigate the relationship between the production of mitochondrial ROS (mROS) and the reduction level of mitochondrial Q (mQ) under phosphorylating (during ATP synthesis) and nonphosphorylating conditions. In this study, we used mitochondria isolated from the unicellular organism, amoeba *Acanthamoeba castellanii* as well as various rat tissues, i.e., lung, brain, heart and liver, and mitochondria isolated from them. The use of various organisms, various animal tissues and the study of the impact of endurance training at the tissue and mitochondrial levels allowed for a broad, multi-level analysis of the relationship between mROS production and the mQ reduction level.

A detailed kinetic analysis in *A. castellanii* mitochondria showed for the first time that mROS production is a direct function of the mQ reduction level. Increasing the level of mQ reduction is accompanied by greater production of mROS and vice versa. The dependence of mROS formation on the mQ reduction level is different for two mQH₂-oxidizing pathways, i.e., the cytochrome pathway (complex III and IV) and the alternative oxidase pathway. It has been proposed that the reduction level of the endogenous mQ pool may be a useful reporter to estimate the total level of ROS production in mitochondria.

The effect of endurance training on mROS production was then investigated in terms of tissue and mitochondrial Q pools, especially QH₂. When examining the effect of endurance training in rat lung, Q was shown to be inversely regulated at the tissue and mitochondrial levels. The increase in the level of Q as an antioxidant in lung cells was accompanied by a decrease in mQ as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain, leading (along with other changes at the level of the respiratory chain) to a decrease in mROS production.

For the first time, the change in mROS production, which occurs as a result of a transition from nonphosphorylating conditions to phosphorylating conditions in the mitochondria of various rat tissues with different content of reduced mQ, was investigated. This change, illustrated by proposed new parameter, i.e., respiratory control of ROS production

($R_{CR_{ROS}}$), shows the extent of changes in mROS production during mitochondrial function when the respiratory chain is not inhibited. The differences observed in rat tissues and their mitochondria in reduced Q pool size, including mQ, reflect different levels of mROS production and may therefore indicate a different need for reduced Q as an antioxidant.

By examining the effect of endurance training on Q content and the formation of mROS in rat tissues with high energy requirements, i.e., in the heart, liver and brain, it was found that training can induce a different tissue and mitochondrial response associated with Q acting as an antioxidant and an electron carrier in the chain respiratory. The changes in mROS production in the mitochondria of individual tissues observed after training may be related to changes in the activity and amount of individual components of the oxidative phosphorylation system and its molecular organization, as well as the size of the oxidized mQ pool, acting as an electron carrier in the respiratory chain.

The results of the presented dissertation emphasize the important role of Q as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and as a cellular antioxidant. The level of mROS production depends on a number of interrelated factors that affect the level of mQ reduction, including the amount of Q in mitochondria and tissues, the activity of the respiratory chain (including mQH₂-oxidizing and mQ-reducing pathways), and the level of oxidative stress. Redox homeostasis of mQ is a key factor in modulating mROS production.